**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Implicações da manutenção ou perda da clorofila na tolerância à dessecação
de tecidos vegetativos de *Anemia flexuosa* (Schizaeaceae) e *Pleurostima
purpurea* (Velloziaceae)**

Saulo de Tarso Aidar

**Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências, Área de Concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas**

**Piracicaba
2010**

Saulo de Tarso Aidar
Bacharel em Ciências Biológicas

Implicações da manutenção ou perda da clorofila na tolerância à dessecação de tecidos vegetativos de *Anemia flexuosa* (Schizaeaceae) e *Pleurostima purpurea* (Velloziaceae)

Orientador:
Prof. Dr. **SÉRGIO TADEU MEIRELLES**

**Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências, Área de Concentração: Fisiologia e
Bioquímica de Plantas**

**Piracicaba
2010**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Aidar, Saulo de Tarso

Implicações da manutenção ou perda da clorofila na tolerância à dessecação de tecidos vegetativos de *Anemia flexuosa* (Schizaeaceae) e *Pleurostima purpurea* (Velloziaceae) / Saulo de Tarso Aidar. - - Piracicaba, 2010.
171 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Clorofila 2. Ecofisiologia vegetal 3. Fotossíntese 4. Plantas vasculares 5. Seca - Resistência I. Tecidos vegetais I. Título

CDD 584.29
A288i

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

*Às serras brasileiras, redutos de formas de vida
impressionantes que desafiam nosso entendimento
e reservam fontes preciosas de conhecimento.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas simples e sinceras que com suas idéias e posturas pude despertar para aprendizados e compreensões muito gratificantes, e melhorar sempre no conhecimento e na sabedoria.

À Cris, minha companheira: as figuras bonitas deste estudo foram gentilmente preparadas por ela para conquistar o leitor;

À minha família inteira e, como são muitos, incluo todos como sendo um: Waldyr, Shirley, Sérgio, Tamba, Dimas, Shirlinha, Ciro e respectivas esposas que considero irmãs e seus filhos que considero irmãozinhos, não apenas sobrinhos;

A todos que me hospedaram carinhosamente em suas residências quando tive que realizar parte do trabalho fora da cidade em que resido, possibilitando que eu pudesse me sentir em casa: Dr. Maurício Chiareli, Ciro e Paula, Tatiana Vetillo.

Aos meus amigos do dia-a-dia, uma família presente. Sempre dispostos a melhorar a amizade e tornar a vida mais interessante com boas conversas e propostas difíceis de recusar mesmo trabalhando na tese (pescaria e travessias sobre serras): Aranha e Camila, Alê, Adolfo, Seizo, Caio e Paula. Tenho mais amigos sim, mas estes podem ficar para o pós-doc;

Aos amigos dos laboratórios, de Piracicaba e São Paulo, que sempre estiveram dispostos a melhorar ainda mais o que já gostamos de fazer em nossos projetos: Cecílio, Gabriel, Fran, Rogério, Olidan, Ruggero, Joyce, Davi.

Não menos importantes por serem os últimos citados, agradeço meus orientadores de quem sou admirador. Tudo começou em 1998 quando conheci o Dr. Sérgio T. Meirelles, desde então, meu entendimento pela tolerância à dessecação se iniciou. Mais tarde germinei sementes tolerantes à dessecação com o Dr. Massanori Takaki. Em seguida, impus déficit hídrico em feijão com o Dr. Gustavo M. Souza que me abriu portas para continuar meus estudos na pós-graduação, onde pude cultivar velloziaceas *in vitro* com o Dr. Antônio N. Gonçalves e estudar fisiologia do estresse com o Dr. Ricardo F. de Oliveira. Terminado o mestrado, tive todas as condições necessárias disponibilizadas pelo Ricardo e pelo Sérgio para estudar com tranquilidade durante o doutorado. Agora, no final deste ciclo, de tudo que ficou, agradeço principalmente pelo aprendizado e conhecimento, o maior bem com o qual vocês poderiam contribuir.

À CAPES e à FAPESP pelo concedimento da bolsa de pesquisa.

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	15
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	17
LISTA DE TABELAS	21
1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Considerações gerais	29
1.2 Teoria celular da tolerância à dessecação	30
1.3 Fotossíntese e respiração de plantas tolerantes à dessecação.....	32
1.4 Foto-oxidação e fotoinibição fotossintética	33
1.5 Mecanismos de proteção contra a luz	34
1.6 Distribuição de <i>Anemia flexuosa</i> e <i>Pleurostima purpurea</i> , observações sobre os ambientes de ocorrência natural de peciloclorófilas e homeoclorófilas, e condições de cultivo	36
1.6.1 Distribuição de <i>Anemia flexuosa</i>	36
1.6.2 Distribuição de <i>Pleurostima purpurea</i>	37
1.6.3 Observações sobre os ambientes de ocorrência natural de peciloclorófilas e homeoclorófilas	37
1.6.4 Condições de cultivo	38
1.7 Argumentação e hipótese de estudo	38
2 DESENVOLVIMENTO	41
2.1 Revisão Bibliográfica.....	41
2.1.1 Tolerância à dessecação em homeoclorófilas.....	41
2.1.2 Peciloclorófilas	52
2.2 Materiais e métodos	56

2.2.1	Experimento 1: Indução da desidratação, manutenção no estado dessecado e reidratação de plantas intactas de <i>Pleurostima purpurea</i> e <i>Anemia flexuosa</i> sob condições controladas	56
2.2.1.1	Material vegetal.....	56
2.2.1.2	Condições e fases experimentais.....	56
2.2.1.3	Uso de presilhas para a manutenção da exposição foliar às condições luminosas especificadas	58
2.2.1.4	Indução da desidratação, manutenção no estado dessecado e reidratação	59
2.2.1.5	Metodologia de avaliação do efeito da luz durante a desidratação, dessecação e reidratação das plantas	60
2.2.1.5.1	Trocas gasosas e fluorescência da clorofila.....	60
2.2.1.5.2	Conteúdo relativo de água foliar e do substrato	62
2.2.1.5.3	Conteúdo de pigmentos fotossintéticos	63
2.2.1.5.4	Microscopia eletrônica de varredura	64
2.2.1.6	Amostragem experimental	64
2.2.1.7	Forma de análise dos resultados.....	65
2.2.2	Experimento 2: Indução da desidratação e dessecação de plantas intactas de <i>Oryza sativa</i> sob condições ambientais variáveis de casa de vegetação	66
2.2.2.1	Material vegetal.....	66
2.2.2.2	Condições e fases experimentais.....	66
2.2.2.3	Indução da desidratação das plantas.....	67
2.2.2.4	Metodologia de avaliação da desidratação e dessecação das plantas.....	67
2.2.2.4.1	Trocas gasosas, fluorescência da clorofila, conteúdo relativo de água foliar e do substrato, conteúdo de pigmentos fotossintéticos, e microscopia eletrônica de varredura....	67
2.2.2.5	Amostragem experimental	68
2.2.2.6	Forma de análise dos resultados.....	68

2.2.3	Experimento 3: Indução da desidratação e dessecação de folhas destacadas de plantas túrgidas de <i>Pleurostima purpurea</i> , <i>Vellozia candida</i> , <i>Anemia flexuosa</i> e <i>Oryza sativa</i> .	69
2.2.3.1	Material vegetal	69
2.2.3.2	Condições e fases experimentais	69
2.2.3.3	Indução da desidratação	69
2.2.3.4	Metodologia de avaliação da desidratação e dessecação foliar	69
2.2.3.4.1	Trocas gasosas	69
2.2.3.5	Amostragem experimental	70
2.2.3.6	Forma de análise dos resultados	70
2.3	Resultados	71
2.3.1	<i>Pleurostima purpurea</i>	71
2.3.1.1	Superfícies foliares	71
2.3.1.2	Conteúdo relativo de água	72
2.3.1.3	Conteúdo de pigmentos fotossintéticos	73
2.3.1.4	Trocas gasosas durante a desidratação de folhas destacadas de <i>Pleurostima purpurea</i> e <i>Vellozia candida</i>	75
2.3.1.5	Trocas gasosas em plantas intactas de <i>Pleurostima purpurea</i>	77
2.3.1.6	Fluorescência da clorofila de amostras acondicionadas à luz e eficiência quântica efetiva dos fotossistemas II	79
2.3.1.7	Coeficientes de extinção fotoquímica e não-fotoquímica da fluorescência	83
2.3.1.8	Fluorescência da clorofila de amostras acondicionadas ao escuro e eficiência quântica potencial dos fotossistemas II	85
2.3.2	<i>Anemia flexuosa</i>	87
2.3.2.1	Superfícies foliares	87
2.3.2.2	Conteúdo relativo de água	88

2.3.2.3	Conteúdo de pigmentos fotossintéticos	89
2.3.2.4	Trocas gasosas durante a desidratação de folhas destacadas de <i>Anemia flexuosa</i>	91
2.3.2.5	Trocas gasosas em plantas intactas de <i>Anemia flexuosa</i>	93
2.3.2.6	Fluorescência da clorofila de amostras acondicionadas à luz e eficiência quântica efetiva dos fotossistemas II	96
2.3.2.7	Coeficientes de extinção fotoquímica e não-fotoquímica da fluorescência	99
2.3.2.8	Fluorescência da clorofila de amostras acondicionadas ao escuro e eficiência quântica potencial dos fotossistemas II.....	101
2.3.2.8.1	Tratamentos de desidratação na luz	101
2.3.2.8.2	Tratamentos de desidratação no escuro	102
2.3.3	<i>Oryza sativa</i>	107
2.3.3.1	Superfícies foliares	107
2.3.3.2	Conteúdo relativo de água.....	108
2.3.3.3	Conteúdo de pigmentos fotossintéticos	108
2.3.3.4	Trocas gasosas durante a desidratação de folhas destacadas de <i>Oryza sativa</i> ...	110
2.3.3.5	Trocas gasosas em plantas intactas de <i>Oryza sativa</i>	112
2.3.3.6	Fluorescência da clorofila de amostras acondicionadas à luz e eficiência quântica efetiva dos fotossistemas II	114
2.3.3.7	Coeficientes de extinção fotoquímica e não-fotoquímica da fluorescência	117
2.3.3.8	Fluorescência da clorofila de amostras acondicionadas ao escuro e eficiência quântica potencial dos fotossistemas II.....	119
2.4	Discussão	121
2.4.1	Balanço hídrico	121
2.4.1.1	Controle do processo de desidratação dos tecidos foliares	121
2.4.1.2	Reidratação de plantas intactas.....	125
2.4.2	Balanço de CO ₂ , uso e dissipação da luz	127

2.4.2.1	Diminuição da assimilação líquida de CO ₂ e manutenção das vias fotoquímica e não-fotoquímica durante a desidratação	127
2.4.2.2	Respiração de dessecação	130
2.4.3	Potencial aparente de uso da luz e conteúdo de clorofila durante as fases de desidratação, dessecação e recuperação	133
2.4.3.1	Diminuição do potencial aparente de uso da luz em <i>Anemia flexuosa</i> durante as fases de desidratação e dessecação	136
2.4.3.1.1	Efeitos da exposição à luz durante as fases de desidratação e dessecação sobre a fluorescência da clorofila.....	137
2.4.3.1.2	Efeitos da exposição ao escuro contínuo durante as fases de desidratação e dessecação sobre a fluorescência da clorofila	137
2.4.3.1.3	Efeitos da exposição à luz exclusivamente durante a fase de dessecação sobre a fluorescência da clorofila.....	138
2.4.3.2	Recuperação do potencial de uso da luz após a reidratação de <i>Anemia flexuosa</i> 140	
2.4.3.3	Trocas gasosas e funcionamento fotoquímico durante a fase de reidratação de <i>Pleurostima purpurea</i> e <i>Anemia flexuosa</i>	142
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	145
3.1	Conclusão	147
	REFERÊNCIAS	149
	ANEXO	161

RESUMO

Implicações da manutenção ou perda da clorofila na tolerância à dessecação de tecidos vegetativos de *Anemia flexuosa* (Schizaeaceae) e *Pleurostima purpurea* (Velloziaceae)

O objetivo deste estudo foi identificar características de uso da luz para explicar a distribuição diferencial das espécies tolerantes à dessecação homeoclorófila *Anemia flexuosa* e peciloclorófila *Pleurostima purpurea* em ambientes sombreados e expostos, respectivamente, de comunidades vegetais de afloramentos rochosos. A cultivar *Oryza sativa* IAC 202 foi incluída para comparações. Durante um ciclo completo de desidratação - dessecação - reidratação foram avaliados parâmetros fotossintéticos de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*, associados ao conteúdo relativo de água (CRA) e de pigmentos fotossintéticos de plantas intactas sob temperatura e umidade relativa do ar constantes de 25°C e de 55%, respectivamente. As plantas foram submetidas à diferentes densidades de fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF de 0, 100 e 400 $\mu\text{mol fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) nas fases de desidratação e dessecação, dependendo da espécie. *O. sativa* foi avaliada somente durante as fases de desidratação e dessecação sob condições ambientais variáveis de casa de vegetação. A diminuição da assimilação líquida de CO₂ (A) foi acompanhada pelo aumento da dissipação de calor avaliada pelos coeficientes de extinção não-fotoquímica (qN e NPQ) nas três espécies. Após cessação de A, a eficiência quântica efetiva (ΦPSII e F_v'/F_m'), a taxa de transporte de elétrons (ETR) e o coeficiente de extinção fotoquímica (qP) foram mantidos relativamente altos em *P. purpurea*, mas cessaram simultaneamente com A em *A. flexuosa*. Em *O. sativa*, ΦPSII , ETR e qP diminuíram substancialmente após a cessação de A, mas F_v'/F_m' foi mantido. A eficiência quântica potencial (F_v/F_m) foi a última variável a diminuir nas três espécies durante a desidratação. Após a reidratação de *P. purpurea* e *A. flexuosa* foi observado inicialmente o estabelecimento da respiração e em seguida um balanço levemente positivo de CO₂, quando os valores de F_v'/F_m' , ΦPSII , ETR, qP e F_v/F_m de *P. purpurea* recuperaram quase totalmente, enquanto qN e NPQ diminuíram. *A. flexuosa* apresentou uma recuperação apenas parcial de F_v'/F_m' , ΦPSII , ETR, qP e F_v/F_m quando o balanço de CO₂ se tornou levemente positivo, tendo sido a recuperação ainda menor para o tratamento de desidratação no escuro associado à dessecação na luz. *A. flexuosa* tolerou a perda de 88% do CRA. O enrolamento foliar durante a desidratação é uma forma de proteção contra a luz no estado dessecado de *A. flexuosa*. Mesmo no estado dessecado ocorrem processos de interação dos fotossistemas II com a luz em *A. flexuosa*. *P. purpurea* baseia sua proteção contra a luz na ativação de processos de dissipação de calor, vias de consumo de elétrons diferentes do ciclo redutivo do CO₂ e, em última instância, na perda de clorofilas. Plantas dessecadas de *P. purpurea* permanecem viáveis no estado desidratado por pelo menos 42 dias. *P. purpurea* tolerou a perda de 94% do CRA. A recuperação do turgor da parte aérea de *P. purpurea* ocorre necessariamente pela absorção de água pelas raízes durante a reidratação. Foi evidenciada uma aclimação de *A. flexuosa* quando desidratada sob condição de luz. Os resultados não foram conclusivos em relação à sustentação da hipótese, considerando que as diferenças de recuperação observadas para *A. flexuosa* nos diferentes tratamentos luminosos, em geral, não foram significativas.

Palavras-chave: Homeoclorófila, Peciloclorófila, Fotoproteção, Resistência à seca

ABSTRACT

Implications of maintaining or loss of chlorophyll in vegetative desiccation tolerance of *Anemia flexuosa* (Schizaeaceae) and *Pleurostima purpurea* (Velloziaceae)

The aim of this study was to identify characteristics of light use that could explain the differential distribution of homoiochlorophyllous and poikilochlorophyllous desiccation tolerant plants *Anemia flexuosa* and *Pleurostima purpurea*, respectively, in shaded and exposed microsites of rock outcrop plant communities. *Oryza sativa* IAC 202 was included in the study for comparisons. Leaf gas exchanges, fluorescence chlorophyll, relative water content (RWC) and photosynthetic pigment content were evaluated in intact plants under constant temperature and relative humidity of 25°C and 55%, respectively, during a complete cycle of dehydration – desiccation – rehydration. The plants were exposed to different photosynthetic photon flux densities (PPFD of 0, 100 and 400 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) during dehydration and desiccation phases, according to species. *O.sativa* was evaluated only during dehydration and desiccation phases under variable environmental conditions in a greenhouse. In all species, the decrease in CO_2 net assimilation (A) was accompanied by increased heat dissipation assessed by non-photochemical quenching coefficients (qN and NPQ). The effective quantum yield (ΦPSII and Fv'/Fm'), electron transport rate (ETR) and photochemical quenching coefficient (qP) were kept relatively high after A cessation in *P.purpurea*, but in *A.flexuosa* ceased simultaneously with A. In *O.sativa*, ΦPSII , ETR and qP decreased substantially after A cessation, but Fv'/Fm' was maintained. The potential quantum yield (Fv/Fm) was the last variable to decrease during dehydration in all species. After rehydration, the establishment of respiration was observed initially in *P.purpurea* and *A.flexuosa*. Then, a slightly positive CO_2 balance was associated with the almost total recovery of Fv'/Fm' , ΦPSII , ETR, qP and Fv/Fm in *P.purpurea*, while qN and NPQ decreased. *A.flexuosa* showed only a partial recovery of Fv'/Fm' , ΦPSII , ETR, qP and Fv/Fm when the CO_2 balance became slightly positive, and recovery was even lower for the treatment of dehydration in dark associated to desiccation in light. *A.FLEXUOSA* TOLERATES A LOSS OF 88% OF RWC. Leaf curling during dehydration is also a form of light protection in the dried state in *A.flexuosa*. Interactions between photosystem II and light occur even in the dried state of *A.flexuosa*. *P.purpurea* bases its protection against light activating heat dissipation process, ways of electron consumption different of reductive CO_2 cycle and, in last instance, chlorophyll loss. *P.purpurea* remains viable in dried state for at least for 42 days, and tolerates a loss of 94% of RWC. The shoot rehydration in *P.purpurea* occurs necessarily by roots water uptake. *A.flexuosa* showed an acclimation when dried under light conditions. The results were not conclusive regarding the hypothesis, since differences in recovery observed for this species in the different light treatments, in general, were not significant.

Keywords: Homoiochlorophyllous, Poikilochlorophyllous, Photoprotection, Resistance

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Distribuição de espécies em função de classes de tamanho de ilhas de solo sobre afloramentos rochosos..... 28
- Figura 2 – Aspecto de *Pleurostima purpurea* durante as fases de desidratação e reidratação..... 71
- Figura 3 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura de *Pleurostima purpurea*..... 72
- Figura 4 - Conteúdo relativo de água (CRA, %) do sistema substrato-planta e foliar durante os processos foliares de desidratação, dessecação e reidratação de *Pleurostima purpurea*. 73
- Figura 5- Conteúdo de clorofila a (C_a , μgg^{-1}), clorofila b (C_b , μgg^{-1}), e carotenóides totais (C_{x+c} , μgg^{-1}) em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação, dessecação e reidratação de *Pleurostima purpurea*. 74
- Figura 6 - Monitoramento contínuo da condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), transpiração (E , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e assimilação de CO_2 (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$) em função da radiação fotossinteticamente ativa (RFA, $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) de uma folha de *Pleurostima purpurea* e de *Vellozia candida* desde o estado intacto até a completa desidratação após seu destacamento da planta..... 76
- Figura 7- Assimilação de CO_2 (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), e transpiração (E , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação, dessecação e reidratação de *Pleurostima purpurea* sob DFFF de $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante o período luminoso fotoperiódico.. 78
- Figura 8 - Fluorescência em estado de equilíbrio dinâmico (F_s), fluorescência máxima (F_m'), e fluorescência basal (F_o') de amostras acondicionas à luz em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação, dessecação e reidratação de *Pleurostima purpurea* sob DFFF de $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante o período luminoso fotoperiódico. 81
- Figura 9 - Eficiência quântica efetiva do fotossistema II com envolvimento de F_o' (F_v'/F_m'), eficiência quântica efetiva do fotossistema II sem envolvimento de F_o' (ΦPSII), e taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) de amostras acondicionas à luz em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação, dessecação e reidratação de *Pleurostima purpurea* sob DFFF de $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante o período luminoso fotoperiódico. 82
- Figura 10 - Coeficiente de extinção fotoquímica (qP) e coeficientes de extinção não-fotoquímica da fluorescência qN e NPQ em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação, dessecação e reidratação de *Pleurostima purpurea* sob DFFF de $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante o período luminoso fotoperiódico. 84

- Figura 11 - Fluorescência basal (F_o), fluorescência máxima (F_m), e eficiência quântica potencial do fotossistema II (F_v/F_m) de amostras pré-acondicionadas ao escuro em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação, dessecação e reidratação de *Pleurostima purpurea* sob DFFF de $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante o período luminoso fotoperiódico..... 86
- Figura 12 – Aspecto de *Anemia flexuosa* durante as fases de desidratação e reidratação. 87
- Figura 13 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura de *Anemia flexuosa*. 88
- Figura 14 - Conteúdo relativo de água (CRA, %) do sistema substrato-planta e foliar em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação, dessecação e reidratação de *Anemia flexuosa*.. 89
- Figura 15 - Conteúdo de clorofila a (C_a , μgg^{-1}), clorofila b (C_b , μgg^{-1}), e carotenóides totais (C_{x+c} , μgg^{-1}) em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação, dessecação e reidratação de *Anemia flexuosa*..... 90
- Figura 16 - Monitoramento contínuo da condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), transpiração (E , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e assimilação de CO_2 (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) em função da radiação fotossinteticamente ativa (RFA, $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) de uma folha de *Anemia flexuosa* desde o estado intacto até a completa desidratação após seu destacamento da planta. 92
- Figura 17 - Assimilação de CO_2 (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), e transpiração (E , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação, dessecação e reidratação de *Anemia flexuosa*.. .. 95
- Figura 18 -Fluorescência em condições de equilíbrio dinâmico (F_s), fluorescência máxima (F_m'), e fluorescência mínima (F_o') de amostras pré-acondicionadas à luz em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação, dessecação e reidratação de *Anemia flexuosa*. 97
- Figura 19 - Eficiência quântica efetiva do fotossistema II com envolvimento de F_o' (F_v'/F_m'), eficiência quântica efetiva do fotossistema II sem envolvimento de F_o' (ΦPSII), e taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) de amostras acondicionadas à luz em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação, dessecação e reidratação de *Anemia flexuosa*.. 98
- Figura 20 – Coeficiente de extinção fotoquímica (q_P) e coeficientes de extinção não-fotoquímica da fluorescência q_N e NPQ em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação, dessecação e reidratação de *Anemia flexuosa*..... 100
- Figura 21 - Fluorescência basal (F_o), fluorescência máxima (F_m), e eficiência quântica potencial do fotossistema II (F_v/F_m) de amostras pré-acondicionadas ao escuro em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação, dessecação e reidratação de *Anemia flexuosa*. 104

- Figura 22 - Fluorescência basal (F_o), fluorescência máxima (F_m), e eficiência quântica potencial do fotossistema II (F_v/F_m) de amostras pré-acondicionadas ao escuro em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação, dessecação e reidratação de *Anemia flexuosa*... 105
- Figura 23- fluorescência basal (F_o), fluorescência máxima (F_m), e eficiência quântica potencial do fotossistema II (F_v/F_m) de amostras pré-acondicionadas ao escuro em função do tempo (horas) durante o processo de reidratação de *Anemia flexuosa*..... 106
- Figura 24 – Aspecto de *Oryza sativa* na condição inicial hidratada e imagem de microscopia eletrônica de varredura mostrando o enrolamento foliar da folha desidratada. 107
- Figura 25 - Estômatos circundados por papilas epicuticulares de cera de diferentes formas nas superfícies superior e inferior de *Oryza sativa* (IAC 202). 108
- Figura 26 - Conteúdo relativo de água (CRA, %) do sistema substrato-planta e foliar em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação e dessecação de *Oryza sativa* (IAC 202). 109
- Figura 27 - Conteúdo de clorofila a (C_a , μgg^{-1}), e clorofila b (C_b , μgg^{-1}) em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação e dessecação de *Oryza sativa* (IAC 202).. 109
- Figura 28 - Monitoramento contínuo da condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), transpiração (E , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e assimilação de CO_2 (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) em função da radiação fotossinteticamente ativa (RFA, $\mu\text{mol fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) de uma folha de *Oryza sativa* (IAC 202) desde o estado intacto até a completa desidratação após seu destacamento da planta. 111
- Figura 29 - Assimilação de CO_2 (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), e transpiração (E , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação e dessecação de *Oryza sativa* (IAC 202). 113
- Figura 30 - Fluorescência em condições de equilíbrio dinâmico (F_s), fluorescência máxima (F_m'), e fluorescência mínima (F_o') de amostras pré-acondicionadas à luz em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação e dessecação de *Oryza sativa* (IAC 202). 115
- Figura 31 - Eficiência quântica efetiva do fotossistema II com envolvimento de F_o' (F_v'/F_m'), eficiência quântica efetiva do fotossistema II sem envolvimento de F_o' (ΦPSII), e taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) de amostras acondicionadas à luz em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação e dessecação de *Anemia flexuosa*. 116
- Figura 32 – Coeficiente de extinção fotoquímica (qP) e coeficientes de extinção não-fotoquímica da fluorescência qN e NPQ em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação e dessecação de *Oryza sativa* (IAC 202). 118

- Figura 33 - Fluorescência basal (F_o), fluorescência máxima (F_m), e eficiência quântica potencial do fotossistema II (F_v/F_m) de amostras pré-acondicionadas ao escuro em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação e dessecação de *Oryza sativa* (IAC 202). 120
- Figura 34– Representação do balanço de CO_2 durante um ciclo completo de desidratação e reidratação em *Anemia flexuosa* e *Pleurostima purpurea* de acordo com os resultados obtidos e dados de literatura. A compensação de CO_2 de dessecação seria um modelo contrastante ao previsto para tolerantes à dessecação modificadas..... 132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – DFFF fornecida durante o período luminoso fotoperiódico para as espécies <i>Pleurostima purpurea</i> e <i>Anemia flexuosa</i> nas diferentes fases experimentais.	56
---	----

1 INTRODUÇÃO

Durante todo seu ciclo de vida, as plantas terrestres vasculares cultivadas devem ser mantidas sob condições próximas da plena hidratação de seus tecidos, entre outros fatores ambientais adequados, para desempenhar as atividades do metabolismo foliar sem comprometimento de sua sobrevivência. Na falta de água por tempo prolongado, a maioria não sobrevive, sendo a perda das folhas um efeito comum deste processo de morte gradual dos tecidos. Tais plantas são denominadas homeohídricas (HAMBLER, 1961; WALTER; STADELMAN, 1968), pois devem manter seu conteúdo de água estável e elevado durante todas as fases de desenvolvimento de seus tecidos foliares para garantir a estabilidade e a continuidade do desenvolvimento. Suportam uma condição de seca moderada com um conjunto de mecanismos ativos para evitar a perda de água de seus tecidos vivos, a exemplo do controle estomático e o ajuste osmótico. No entanto, a intensificação da desidratação protoplasmática nestas plantas, após certo limite, causa efeitos irreversíveis que não permitem a recuperação de seus tecidos foliares após a reidratação. Desta forma, tais plantas são consideradas sensíveis à dessecação, processo compreendido pela desidratação extrema em nível protoplasmático (LEVITT, 1980).

No entanto, o limite de desidratação protoplasmática pode variar entre as plantas terrestres, havendo um grupo capaz de conservar a integridade celular básica de seus tecidos vegetativos e recuperar todas as suas funções normais após um ciclo completo de dessecação e reidratação de suas partes vegetativas, com a conservação viável das folhas no estado dessecado também conhecido como anabiose (LEVITT, 1980). Estas plantas, por sua vez, são denominadas pecilohídricas (HAMBLER, 1961; WALTER; STADELMAN, 1968), pois são capazes de apresentar um conteúdo de água variável de seus tecidos vegetativos ao longo de seu desenvolvimento sem que isto provoque danos irreparáveis aos mesmos. Também são conhecidas como tolerantes à dessecação (BEWLEY, 1979; BEWLEY; KROCHKO, 1982) no sentido de Levitt (1980), ou “*resurrection plants*” (GAFF, 1971), que na língua portuguesa poderia ser traduzido como “plantas revivescentes”.

A tolerância à dessecação é encontrada em diferentes grupos taxonômicos, incluindo procariotos e eucariotos, como bactérias, algas, fungos, líquenes, briófitas, pteridófitas e angiospermas, além de alguns animais invertebrados (BEWLEY; KROCHKO, 1982; OLIVER; BEWLEY, 1997). Além de tecidos vegetativos e outros organismos uni e pluricelulares

anteriormente mencionados, o processo de tolerância à dessecação é verificado em sementes ortodoxas (WILLIAMS; LEOPOLD, 1989; VERTUCCI; FARRANT, 1995), podendo também ocorrer em grãos de pólen e esporos (BEWLEY; KROCHKO, 1982; OLIVER; BEWLEY, 1997). As gimnospermas formam o único grupo de plantas em que a tolerância à dessecação não é encontrada em tecidos vegetativos, embora possuam sementes tolerantes à dessecação (OLIVER; BEWLEY, 1997).

O processo de tolerância à dessecação em tecidos vegetativos envolve mecanismos de proteção e de reparo contra efeitos que diferentes fatores potenciais de estresse poderiam causar durante a desidratação e a reidratação (BEWLEY; OLIVER, 1992). A proporção entre mecanismos de proteção e de reparo que pode ser encontrada em plantas tolerantes à dessecação parece depender da velocidade de desidratação a que seus tecidos vegetativos estão sujeitos (OLIVER, 1996; OLIVER; BEWLEY, 1997).

Algas, líquenes e briófitas tolerantes à dessecação, em geral, não apresentam mecanismos eficientes de impedimento à perda de água de seus tecidos, exibindo um rápido equilíbrio de seu conteúdo interno de água com o potencial de água de um ambiente seco (OLIVER; BEWLEY, 1997). Nestes grupos, a tolerância à dessecação é fundamentada, principalmente, na indução de mecanismos de reparo durante a reidratação (OLIVER; BEWLEY, 1997), embora algumas briófitas também possam apresentar mecanismos de proteção que são ativados durante a desidratação (OLIVER, 1996). Desta maneira, em algas, líquenes e briófitas, os mecanismos responsáveis pela conferência da tolerância à dessecação são, preponderantemente, constitutivos. Mecanismos constitutivos seriam aqueles que se encontrariam funcionais nos tecidos independentemente da necessidade de ativação durante a desidratação. Por este motivo, algas, líquenes e briófitas tolerantes à dessecação são denominadas “totalmente tolerantes à dessecação” (*“fully desiccation tolerant”*, OLIVER, 1996), pois, em um sentido geral, independem da indução de mecanismos de proteção.

Pteridófitas e angiospermas tolerantes à dessecação não suportam uma rápida desidratação de seus tecidos vegetativos (GAFF, 1977; BARTELS et al., 1990; OLIVER; BEWLEY, 1997). A tolerância à dessecação em tecidos vegetativos de pteridófitas e angiospermas, por sua vez, parece ser fundamentada, preponderantemente, na ativação de mecanismos de proteção durante a desidratação, embora mecanismos de reparo também possam ocorrer durante a reidratação (BEWLEY; KROCHKO, 1982; BARTELS et. al., 1990; BEWLEY;

OLIVER, 1992; OLIVER, 1996; OLIVER; WOOD; O'MAHONY, 1998; FARRANT et al., 2003). A indução de parte destes mecanismos de proteção durante a desidratação é controlada pelo ácido abscísico (ABA) (BARTELS et al., 1990; OLIVER, 1996; OLIVER; BEWLEY, 1997). Desta maneira, o controle da perda de água nos tecidos vegetativos de pteridófitas e angiospermas parece ser importante para permitir o tempo necessário para a ativação dos mecanismos de proteção (OLIVER; BEWLEY, 1997). Neste sentido, pteridófitas e angiospermas tolerantes à dessecação são denominadas tolerantes à dessecação modificadas (*"modified desiccation tolerant"*, OLIVER, 1996), uma vez que a tolerância somente se estabelece após uma fase de preparação dos tecidos com a indução dos mecanismos necessários (OLIVER, op.cit.).

No Brasil, Morello (1954) foi o primeiro a chamar atenção para a ocorrência da tolerância à dessecação em tecidos vegetativos de uma espécie da caatinga, *Selaginella convoluta*. Estudos posteriores têm enriquecido a listagem de espécies nativas com representantes das famílias vasculares Velloziaceae, Cyperaceae, Poaceae, Pteridaceae, Schizaeaceae e Selaginellaceae (MEGURO et al., 1977; GAFF, 1987; MEIRELLES; MATTOS; SILVA, 1997). Em outros lugares do mundo também são encontradas espécies tolerantes à dessecação de outras famílias, a exemplo das dicotiledôneas Gesneriaceae, Scrophulariaceae, e Myrothamnaceae (GAFF, 1971).

A tolerância à dessecação em tecidos vegetativos é frequente entre as formas de vida categorizadas por Raunkiaer (ELLENBERG; MUELLER-DOMBOIS, 1967) que ocorrem em campos rupestres e afloramentos rochosos monolíticos (MEIRELLES; MATTOS; SILVA, 1997; POREMBSKY; BARTHLOT, 2000; CONCEIÇÃO; PIRANI, 2005). Afloramentos rochosos monolíticos são também conhecidos como "inselbergs" (POREMBSKY; BARTHLOT, 2000). Além dos campos rupestres e afloramentos rochosos, a tolerância à dessecação em tecidos vegetativos também pode ser encontrada em espécies da vegetação terrestre da caatinga e do cerrado (MEIRELLES; MATTOS; SILVA, 1997), bem como da vegetação epifítica existente sobre troncos de árvores florestais e urbanas. Afloramentos rochosos, especialmente, constituem centros de diversidade para espécies vasculares tolerantes à dessecação (POREMBSKY; BARTHLOT, 2000). Nestes diferentes ambientes, a condição de seca extrema e imprevisível relacionada à falta de substrato ou solo e sua alta capacidade de drenagem sugere a principal razão da ocorrência da tolerância à dessecação de tecidos vegetativos entre suas formas de vida (MEIRELLES; MATTOS; SILVA, 1997). A desidratação completa de plantas tolerantes à dessecação pode ocorrer em algumas horas de seca, no caso de criptógamas, ou em alguns dias,

no caso das fanerógamas de maior porte. Desta maneira, espécies tolerantes à dessecação estão sujeitas a ciclos repetidos de dessecação e reidratação em seus habitats, o que deve constituir uma limitação contra a manutenção de um balanço positivo de carbono necessário para o crescimento (EICKMEIER, 1979).

Uma das principais características utilizadas para a identificação visual de plantas tolerantes à dessecação é o aspecto que suas folhas apresentam quando estão no estado dessecado, caracterizado pelo enrolamento intenso, a aquisição de uma textura mais rígida e mudanças de coloração do tecido. Estes aspectos se diferenciam daquele correspondente aos de palha ressecada como as folhas de plantas homeohídricas se apresentam após serem desidratadas ao extremo, o que indica a morte destes tipos de tecidos. Com a perda de água, os tecidos foliares de plantas pecilohídricas podem apresentar diferentes padrões de enrolamento, de acordo com a espécie, o que resulta na diminuição de sua área foliar exposta à radiação solar trazendo vantagens para a sobrevivência (LEBKUECHER; EICKMEIER, 1993; FARRANT et al., 2003). A diminuição de área foliar deve-se à proporcional diminuição do volume celular de seus tecidos foliares. Neste processo, a diminuição do volume celular é acompanhada de dobramentos das paredes, recolhimento de membranas e formação de numerosos pequenos vacúolos (MARKOVSKA et al., 1994; SHERWIN; FARRANT, 1998; FARRANT et al., 2003).

A coloração que o tecido foliar assume após ser dessecado de forma viável está relacionada ao grau de preservação de clorofilas e manutenção ou acúmulo de outros pigmentos fotoprotetores, quando presentes, como carotenóides e antocianinas. Estas diferentes possibilidades podem resultar em folhas dessecadas com colorações esverdeadas, arroxeadas ou intensamente amareladas. Quando suas folhas conservam o conteúdo de clorofilas após a completa desidratação, podendo ou não manter a aparência esverdeada devido ao efeito da sobreposição de pigmentos, além de manter a ultra-estrutura cloroplastidial básica formada pelo empilhamento dos tilacóides, a espécie é classificada como homeoclorófila. Quando as folhas se tornam amareladas ou arroxeadas no final do processo de dessecação, sendo o conteúdo de clorofilas completamente perdido e a ultra-estrutura do aparato fotossintético desmantelada transformando os cloroplastos em plastoglóbulos, a espécie é classificada como peciloclorófila (HAMBLER, 1961; MARKOVSKA et al., 1994; SHERWIN; FARRANT, 1998; FARRANT et al., 2003). Neste caso, as plantas deste grupo são capazes de reconstituir o aparato fotossintético

capaz de retomar a atividade fotossintética e re-estabelecer um balanço positivo de carbono durante a rehidratação foliar (TUBA et al., 1994; TUBA et al., 1998).

Sugere-se que a vantagem da homeoclorofilia esteja associada à rapidez no estabelecimento de um balanço positivo de carbono com a reidratação (EICKMEIER, 1980). Por outro lado, propõe-se que a peciloclorofilia funcione como uma forma de impedimento à ocorrência de eventos de foto-oxidação provocados por intensa radiação solar em folhas com baixo conteúdo relativo de água (FARRANT et al., 2003).

Uma das evidências que contribuem para explorar o significado ecológico da peciloclorofilia é a distribuição diferencial de plantas homeo e peciloclorófilas nos diversos micro-habitats dos afloramentos rochosos. As espécies peciloclorófilas estão restritas aos ambientes expostos diretamente à insolação e as homeoclorófilas parecem ocorrer preferencialmente em habitats sombreados. Nos afloramentos rochosos, a maior parte da vegetação submetida diretamente às condições extremas da superfície rochosa ocorre em grupos, chamados de ilhas-de-solo (MEIRELLES et al., 1999). As ilhas de solo são caracterizadas pela deficiência de substrato, sendo o solo praticamente ausente ou com pequena profundidade. Estes agrupamentos são também chamados de “touceiras de monocotiledôneas” (IBISCH et al., 1995) e são freqüentemente formados por espécies tolerantes à dessecação. As ilhas de solo variam de tamanho e essa variação é acompanhada por uma mudança na composição de espécies, bem como de mudanças nas condições microclimáticas. O desenvolvimento de espécies de maior porte nas ilhas maiores proporciona uma condição de sombra e redução da temperatura em seu interior. Da mesma forma, existiria uma maior disponibilidade de substrato e conseqüentemente de água disponível. Nas ilhas maiores as plantas heliófilas como as espécies peciloclorófilas situam-se nas bordas e as homeoclorófilas ocorrem no espaço interno da ilha onde estão submetidas ao sombreamento. Esse aspecto constitui a segregação mais evidente entre o habitat das peciloclorófilas e homeoclorófilas (figura 1). Entretanto, ocorrem algumas espécies homeoclorófilas que apresentam heliofilia. Em contraste, nenhuma peciloclorófila apresenta umbrofilia (MEIRELLES, 1990).

Figura 1 - Distribuição de espécies em função de classes de tamanho de ilhas de solo sobre afloramentos rochosos, a) criptógamas homeclorófilas tolerantes à dessecação: *Anemia villosa*, *Anemia flexuosa*, *Doryopteris Collina*; b) fanerófitas peciloclorófilas tolerantes à dessecação: *Pleurostima purpurea*, *Vellozia candida*, *Nanuza plicata* e *Trilepis lhotskiana*; c) demais espécies sensíveis à dessecação (Adaptado a partir de MEIRELLES, 1990)

1.1 Considerações gerais

O conhecimento corrente sobre as vantagens da peciloclorofilia fundamenta-se na idéia geral de que perda de clorofilas durante a desidratação dos tecidos foliares impede sua possível oxidação pela luz no estado de anabiose, o que seria uma vantagem para a sobrevivência à dessecação em ambientes ensolarados. Por outro lado, a conservação de clorofilas em homeoclorófilas possibilitaria sua oxidação na luz no estado dessecado, o que explicaria, em geral, a ausência de espécies deste grupo nos mesmos ambientes.

Embora este modelo faça sentido para um amplo número de espécies homeoclorófilas por serem encontradas preponderantemente em ambientes sombreados, ele não é totalmente aplicável. A exemplo disto, são observadas gramíneas e algumas briófitas tipicamente heliófilas tolerantes à dessecação, além de algumas pteridófitas (*Anemia* sp., *Doryopteris* sp.) de ambientes parcialmente sombreados a ensolarados, todas homeoclorófilas. Isto deve caracterizar certo nível de artificialidade com relação à previsão da funcionalidade das espécies de acordo com a interpretação geral associada à classificação das plantas tolerantes à dessecação em homeoclorófilas e peciloclorófilas.

Portanto, a sobrevivência à dessecação de homeoclorófilas em ambientes sujeitos à radiação luminosa intensa deveria ser possível pela ativação de mecanismos capazes de conferir certo nível de proteção das clorofilas conservadas contra sua possível oxidação pela luz durante a anabiose. Dentre tais mecanismos poderiam ser citados: a capacidade de expressão de diferentes substâncias antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas, além da atuação de sombreadores foliares efetivos no nível do tecido e impostos em decorrência do acúmulo de pigmentos, do padrão de disposição de tricomas com capacidade de reflexão da luz recebida nas superfícies foliares, do enrolamento dos tecidos foliares associado a sua diminuição de área que diminui a interação de suas superfícies com a luz, bem como de um posicionamento foliar com uma orientação no estado dessecado que limita a interceptação de luz nos horários diários de maior intensidade. Neste sentido, certa diversidade e interação de mecanismos espécie-específicos poderiam explicar variações no padrão de ocorrência das homeoclorófilas.

Os mecanismos de proteção que poderiam estar associados às homeoclorófilas, provavelmente, devem ser menos eficientes para a longevidade no estado de anabiose, comparados ao de perda de clorofilas caracterizada pela peciloclorofilia. Neste sentido, a longevidade em homeoclorófilas poderia ser menor, supostamente, em decorrência de um maior

acúmulo de substâncias oxidadas no nível celular quanto maior o tempo de permanência no estado dessecado. No entanto, parte dos mecanismos de proteção acima mencionados também pode ocorrer em peciloclorófilas, significando que a sobrevivência deste grupo em condições de insolação direta não residiria apenas no impedimento da interação da luz com as clorofilas.

1.2 Teoria celular da tolerância à dessecação

A teoria que explica como as plantas pecilohídricas toleram a dessecação se fundamenta em processos preponderantemente celulares. Embora os mecanismos precisos de percepção dos estímulos ambientais e sua transdução em sinais no interior do organismo vegetal sejam pouco conhecidos, uma das primeiras respostas vegetais detectadas no início da condição de seca é o aumento da produção do hormônio vegetal ácido abscísico (ABA). Este hormônio está envolvido com modificações na expressão gênica (BARTELS et al., 1990) que resultam no acúmulo de diferentes metabólitos relacionados com a aquisição da tolerância. Além das respostas iniciais típicas contra a seca conhecidas em homeohídricas para economizar água, como fechamento estomático, acúmulo de osmólitos, as plantas vasculares tolerantes à dessecação apresentam uma modificação do metabolismo de carboidratos e conseqüente acúmulo de açúcares não-redutores (GHASEMPOUR et al., 1998; WILLIGEN et al., 2004; ZIVKOVIC et al., 2005; BARTELS, 2005), principalmente sacarose, mas também com participação de trealose, rafinose e estaquiose, que parecem atuar na estabilidade estrutural de macromoléculas em substituição à água promovendo um estado vitrificado. O acúmulo destes açúcares, além de permitir um controle da pressão osmótica juntamente com outros osmólitos como prolina, também confere a vitrificação do citoplasma. No estado vitrificado, o metabolismo é extremamente diminuído (BEWLEY; KROCHKO, 1982; WILLIAMS; LEOPOLD, 1989). Além de açúcares, também se observa um acúmulo de proteínas do tipo *Late Embryogenesis Abundant* (LEA) que também está relacionado com a manutenção da estabilidade de macromoléculas citoplasmáticas e de membranas (BARTELS, 2005), possivelmente em sinergia com os carboidratos para formar o estado vitrificado também conhecido como biovidro (BROWNE et al., 2002). A ativação e/ou acúmulo de substâncias de sistemas antioxidantes enzimáticos (FARRANT et al., 2003) e não-enzimáticos (CASPER; EICKMEIER; OSMOND, 1993; WILLIGEN et al., 2001) também recebe importância de destaque, pois são responsáveis pela eliminação do potencial danoso de radicais livres e espécies reativas de oxigênio que aumentam sob condição de desidratação. Estas

substâncias, dentre elas tripleto de clorofila ($^3\text{Chl}^*$), singlete de oxigênio ($^1\text{O}_2$), hidroxila ($\text{OH}^\cdot$), superóxido ($\text{O}_2^\cdot$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), podem ser formadas devido a transferência de elétrons para o oxigênio $^3\text{O}_2$ nas cadeias de transporte da respiração e fotossíntese (TAIZ; ZEIGER, 2002). No entanto, há considerável variação nas respostas de enzimas antioxidantes nas fases de desidratação e reidratação de diferentes espécies de plantas pecilohídricas, podendo ter sua atividade aumentada, diminuída ou mantida estável dependendo da fase (FARRANT et al., 2003).

Outros mecanismos celulares estão envolvidos, como modificações na composição de lipídeos de membrana, com diminuição da insaturação de fosfolipídios e o aumento da concentração de colesterol como possível estabilizador estrutural (QUARTACCI et al., 2002). Além de modificações na matriz lipídica, foi caracterizado o aparecimento de possíveis aquaporinas do tipo “TIP 3;1” em membranas dos inúmeros vacúolos pequenos e não-aquosos que são formados durante o processo de dessecação. Estes canais de membrana aumentam sua permeabilidade e, provavelmente, estão relacionados com um papel protetor ou estabilizador contra danos mecânicos que poderiam ser produzidos no momento de influxo da água, durante a reidratação, além de estarem possivelmente associados com a mobilização de proteínas, açúcares, prolina e outros solutos que são acumulados nestes compartimentos (WILLIGEN et al., 2004). A produção de proteínas similares às *Early Light Inducible Proteins* (ELIPs) também foi caracterizada em *Craterostigma plantagineum* e *Sporobolus stapfianus*, as quais são expressas durante a re-aquisição da coloração esverdeada de plantas estioladas ou em folhas maduras expostas à condições de excesso de luz. São proteínas similares às *High Light Induced Proteins* (HLIPs) de cianobactérias e proteínas do complexo de colheita de luz, ou *light harvest complex* (LHC), dos fotossistemas com função protetora contra danos foto-oxidativos do aparato fotossintético e que atuam por meio de ligações com zeaxantinas no processo de extinção não-fotoquímica da energia absorvida (RASCIO; LA ROCCA, 2005).

1.3 Fotossíntese e respiração de plantas tolerantes à dessecação

Dentre as plantas tolerantes, encontra-se com maior frequência a via fotossintética do tipo C3 (FARRANT et al., 1999), embora as estratégias C4 e do metabólismo ácido das crassuláceas, ou *Crassulacean Acid Metabolism* (CAM) também possam ocorrer (BARTHOLOTT; POREMBSKI, 1996). Assim como em qualquer homeohídrica, a fotossíntese de pecilohídricas superiores é mais sensível à desidratação que o metabolismo respiratório (MARKOVSKA et al., 1994; YANG et al., 2003). Após certo período de suspensão da irrigação, o balanço positivo de CO₂ é limitado, inicialmente, pelo fechamento estomático, e se torna negativo após a inativação fotossintética, tornando-se nulo na condição de anabiose (KIMENOV et al., 1989; MARKOVSKA et al., 1994; SCHWAB et al., 1989; TUBA et al., 1998; AIDAR et al., 2010). O artigo publicado por Aidar e colaboradores (2010), derivado de parte desta tese, é apresentado em anexo.

A diminuição da atividade fotoquímica sob condição de fotoinibição fotossintética durante a desidratação de plantas tolerantes à dessecação já foi relacionada à ativação de mecanismos de dissipação de energia como o ciclo das xantofilas (CASPER; EICKMEIER; OSMOND, 1993).

Durante a reidratação, a respiração é rapidamente ativada. Devido ao fato de as peciloclorófilas serem dependentes da re-síntese de clorofilas e re-construção do seu aparato fotossintético, normalmente dependem de um maior período de tempo para recuperar totalmente suas atividades comparando-se com as homeoclorófilas (TUBA et al., 1994; SHERWIN; FARRANT, 1996).

Entre as homeoclorófilas, foram estudadas algumas briófitas que apresentaram diferenças de respostas fisiológicas em função do habitat original mais xérico ou mais méxico, tendo sido observada uma maximização da assimilação de carbono em períodos mais favoráveis em espécies ou raças típicas de ambientes mais xéricos, por meio de taxas fotossintéticas mais altas durante a dessecação, taxas de respiração mais reduzidas durante as fases de dessecação e reidratação do tecido foliar, tolerância no estado dessecado por um período de tempo mais prolongado além de uma capacidade de alcançar uma atividade fotossintética mais rapidamente após a reidratação que espécies ou raças típicas de ambientes mais méxicos (ALPERT; OECHEL, 1985; ALPERT; OECHEL, 1987). Em estudo com duas espécies homeoclorófilas de *Selaginella* (pteridófitas), a representante de ambiente mais xérico, *S. lepidophylla*, apresentou uma recuperação

foto-sintética mais rápida devido a uma maior conservação do sistema foto-sintético e da atividade da rubisco durante o estado dessecado e, conseqüentemente, uma reduzida dependência por processos de reparo do sistema foto-sintético durante a reidratação comparando-se com a espécie *S. pilifera*, de ambiente mais mésico (EICKMEIER, 1980). Estes resultados mostram que a vantagem da homeoclorofilia está associada à rapidez no estabelecimento de um balanço positivo de carbono com a reidratação.

Por outro lado, a peciloclorofilia deve conferir vantagem adaptativa para a colonização de ambientes caracterizados por prolongados períodos de seca severa e radiação solar direta. Segundo a interpretação vigente, a degradação das clorofilas durante o processo de dessecação em peciloclorófilas ocorre de forma controlada e ativa, tendo como finalidade o impedimento da absorção excessiva de luz e conseqüente ocorrência de danos resultantes de eventos foto-oxidativos por folhas com baixo conteúdo relativo de água (SHERWIN; FARRANT, 1998).

1.4 Foto-oxidação e foto-inibição foto-sintética

Na presença de água, os organismos foto-sintetizantes são capazes de converter a energia quântica da luz absorvida pelos pigmentos foto-sintéticos em energia redox. Este processo ocorre por meio da produção de um oxidante forte e de um redutor forte representados pela clorofila (P_{680}) e pela feofitina (Feo) dos centros de reação dos fotossistemas II ($^1P_{680}Feo \rightarrow ^1P_{680}^+Feo^-$) (HEBER, 2008). Na falta de água, a conversão da energia quântica em potencial redox é diminuída, uma vez que ela é a doadora dos elétrons necessários para os eventos de redução, impedindo assim a separação de cargas ou seguindo-se de sua recombinação que reverte a equação anterior (HEBER, 2008). Durante a recombinação de cargas, a reversão do spin eletrônico produz tripleto de clorofila ($^3P_{680}$), um estado de excitação eletrônica que persiste por um período relativamente longo nos fotossistemas II dos centros de reação (HEBER, 2008). Este estado da clorofila pode reagir com oxigênio e produzir singleto de oxigênio ($^3P_{680} + ^3O_2 \rightarrow ^1P_{680} + ^1O_2$), que é um radical livre extremamente destrutivo no meio celular e seu acúmulo sob forte nível de radiação ameaça a sobrevivência de organismos foto-sintetizantes (HEBER, 2008).

Substâncias do metabolismo e do aparato foto-sintético podem ser inativadas, além de que membranas e ácidos nucléicos podem sofrer danos como conseqüências do acúmulo de radicais livres (SMIRNOFF, 1993). A ocorrência destes processos resulta na foto-inibição, que pode ser conceituada como a diminuição da eficiência quântica foto-sintética e da capacidade

fotossintética máxima de duas formas, dinâmica e crônica, devido ao excesso de luz (OSMOND, 1994). A fotoinibição dinâmica é considerada prontamente reversível no sentido de que após certo tempo de acondicionamento foliar ao escuro, a folha pode reassumir sua eficiência quântica fotossintética normal comparável às condições ótimas de disponibilidade de recursos. A fotoinibição do tipo crônica é considerada lentamente reversível e está relacionada com a inativação de proteínas do tipo D1 dos fotossistemas II em uma condição em que a planta apresenta uma diminuição da capacidade de renovação da mesma. Logo, sua recuperação é possível somente mediante a reposição das formas ativas destas proteínas o que pode ocorrer somente após períodos de tempo mais longos do que o necessário para a recuperação do estado fotoinibitório do tipo dinâmico.

1.5 Mecanismos de proteção contra a luz

Sob condições fisiológicas normais, a redução do CO_2 para a produção de carboidratos consome a maior parte dos elétrons derivados da oxidação da água (LAWLOR; CORNIC, 2002). Sob diminuição da assimilação de CO_2 aumenta a transferência de elétrons para o O_2 , o que, conforme mencionado anteriormente, podendo levar à produção de espécies reativas de oxigênio potencialmente danosas. Além disso, pode ocorrer também o acúmulo de substâncias no seu estado reduzido alterando o estado redox celular. O estado redox está associado à diferentes agentes de tamponamento e de sinalização celular que poderiam levar à ativação de mecanismos de proteção. O sistema ferredoxina-tioredoxina, bem como glutatona e ascorbato estão envolvidos com a regulação do balanço redox, e espécies reativas de oxigênio também estão relacionadas à ativação de sistemas antioxidantes de proteção enzimática (SCHEIBE et al., 2005; WILSON et al., 2006). O equilíbrio do estado redox no cloroplasto poderia ser mantido, mesmo sob diminuição do consumo de redutores equivalentes e de ATP, por meio de três diferentes vias: transporte cíclico de elétrons, redução de O_2 associada a fluxo pseudocíclico de elétrons e ciclo água-água, e exportação de redutores equivalentes como malato (SCHEIBE et al., 2005). Além disso, as mitocôndrias contribuem para o balanço redox celular, por meio da enzima oxidase alternativa (AOX) que dissipa elétrons sem produzir ATP, e por meio da fotorrespiração também associada aos peroxissomos (SCHEIBE et al., 2005).

Além da manutenção do transporte de elétrons, a dissipação da energia na forma de calor também pode ocorrer como forma de proteção contra o excesso de luz pelo ciclo das xantofilas

(DEMMIG-ADAMS, 1990; DEMMIG-ADAMS; ADAMS, 1996). No ciclo das xantofilas, um grupo de carotenóides, a interconversão de violaxantina (V), anteraxantina (A), e zeaxantina (Z) nas membranas dos tilacóides resulta na transformação da energia luminosa em calor. Esta interconversão é realizada por um processo de de-epoxidação induzido por luz de V para Z via A catalisado por violaxantina de-epoxidase (VDE), e epoxidação de Z para V sob luz fraca catalisada por zeaxantina epoxidase (ZE). A enzima VDE requer ascorbato e pH baixo para se tornar ativa no lúmen (GILMORE; YAMAMOTO, 1992; PFÜNDEL et al., 1994), o que é obtido por meio do bombeamento de prótons para o interior dos tilacóides em função do transporte de elétrons fotossintéticos (LATOWSKI et al., 2004a). Além disso, a protonação do lúmen também induz mudanças conformacionais na proteína PsbS dos complexos antena dos fotossistemas II (FSII) que levam à dissipação de calor (TAKIZAWA et al., 2007), na qual Z modula e amplifica a taxa de extinção não fotoquímica (NPQ) da energia excedente (DEMMIG-ADAMS; ADAMS, 1996). O uso preferencial de prótons para a produção de ATP favorece a fotossíntese ao invés da dissipação de energia (HEBER et al., 2006). Somente o excesso de prótons é direcionado para a protonação de PsbS, e sua dissociação sob luz baixa ou escuro inativaria a dissipação da energia dependente de zeaxantina (HEBER, 2008).

No entanto, considerando que a luz nem sempre está presente durante a desidratação, uma regulação sensível de um sistema de proteção por uma reação de protonação exclusivamente dependente de luz poderia ser questionável (HEBER, 2008). Além disso, regulação sensível certifica de que dissipação de energia não compete com conservação fotossintética de energia, mas procedem simultaneamente enquanto puder ser evitado que o excesso de luz cause fotoinibição sem impedir a conservação de energia fotossintética em plantas hidratadas (HEBER, 2008).

Em organismos autotróficos pecilohídricos, a fluorescência da clorofila diminui em função da perda de água assim como a fotossíntese e a separação estável de cargas (HEBER et al., 2006), e aumenta em resposta a reidratação re-estabelecendo a separação estável de cargas (HEBER, 2008). Embora a extinção da fluorescência possa ser, à primeira vista, simples consequência da desidratação das membranas fotossintéticas que contêm clorofila, o uso de luz pela fotossíntese, a emissão de fluorescência e a dissipação de energia na forma de calor ocorre de forma competitiva uma com as outras, de acordo com a primeira lei da termodinâmica (HEBER, 2008). Devido a isto, a perda concorrente da separação de carga e de emissão de

fluorescência durante a desidratação indica a ativação de mecanismos de dissipação de energia, enquanto sua inativação é mostrada pelo aumento da fluorescência durante a reidratação (HEBER, 2008).

Novos mecanismos de dissipação de energia que não requerem reação de protonação para sua ativação têm sido evidenciados como forma de proteção contra a fotoinativação em briófitas e líquenes dessecados (VEERMAN et al., 2007). Um mecanismo principal que não requer luz para sua ativação é baseado em mudanças conformacionais de um complexo proteína-clorofila induzidas pela dessecação. Este mecanismo permite uma dissipação de energia térmica, denominada ultra-rápida, dentro do complexo proteína-pigmento, impedindo a chegada de energia nos centros de reação funcionais e, conseqüentemente, protegendo-os contra a fotoinativação. Na presença de luz durante a dessecação, as mudanças conformacionais são modificadas de maneira a promover um aumento da fotoproteção particularmente em clorolíquenes dessecados (HEBER, 2008).

Além de mecanismos bioquímicos, as plantas podem apresentar formas de se proteger do excesso de luz por meio de uma movimentação e auto-sobreamento foliar capazes de limitar a absorção excessiva de luz (SHERWIN; FARRANT, 1998).

1.6 Distribuição de *Anemia flexuosa* e *Pleurostima purpurea*, observações sobre os ambientes de ocorrência natural de peciloclorófilas e homeoclorófilas, e condições de cultivo

1.6.1 Distribuição de *Anemia flexuosa*

O gênero *Anemia* é amplamente distribuído na América Tropical, com cerca de 80 espécies, e sul da Índia, sendo o Brasil um dos centros de diversidade do grupo representado pelas suas regiões central e do sudeste (TRYON; TRYON, 1982).

Tryon e Tryon (1982) descrevem que o gênero *Anemia* é primariamente de habitats abertos e locais bem drenados, estando suas espécies freqüentemente associadas com outras pteridófitas como *Pellaea* e *Doryopteris*, além de espécies das famílias Eriocaulaceae e Velloziaceae, como é o caso de *Pleurostima purpurea*, do sudeste brasileiro. No entanto, *Anemia flexuosa* apresenta uma ocorrência preferencial em ambientes sombreados, principalmente em meio à vegetação herbácea de comunidades de ilhas de solo encontradas em afloramentos rochosos (MEIRELLES, 1990). Apesar dessa constatação, a ampla distribuição desta espécie

inclui formações como cerrado e campos de altitude (TRYON; TRYON, 1982; ISHARA et al., 2008; SALINO; ALMEIDA, 2008) onde também podem ser encontradas em condições de alta exposição.

1.6.2 Distribuição de *Pleurostima purpurea*

O gênero *Pleurostima* foi proposto para um grupo diferenciado de espécies de Velloziaceae brasileiras (MENEZES, 1980). *Pleurostima purpurea* é endêmica do estado do Rio de Janeiro, Brasil, onde ocorre em ilhas de solo sobre afloramentos rochosos graníticos sob condição exposta à radiação solar direta (MEIRELLES; MATTOS; SILVA, 1997).

1.6.3 Observações sobre os ambientes de ocorrência natural de peciloclorófilas e homeoclorófilas

Todas as espécies peciloclorófilas conhecidas são angiospermas monocotiledôneas. No grupo das homeoclorófilas encontra-se uma maior diversidade de grupos taxonômicos, com representantes de briófitas, pteridófitas e angiospermas mono e dicotiledôneas.

De acordo com observações de campo, a ocorrência das espécies peciloclorófilas limita-se a ambientes cuja exposição permite a incidência de radiação solar direta em, pelo menos, algumas horas do dia. Isto pode variar dependendo do grau de inclinação e orientação da vertente do afloramento rochoso em que se encontram tais plantas. As vasculares homeoclorófilas, por sua vez, apresentam uma maior ocorrência em ambientes sombreados por outros estratos de vegetação ou em faces rochosas cuja disposição permite somente a ocorrência de luz difusa nos sítios de ocorrência das plantas. As vasculares homeoclorófilas normalmente são encontradas em meio à vegetação estabelecida nas ilhas de solo que constituem as comunidades vegetais das superfícies de afloramentos rochosos, além de poderem ser encontradas com um hábito epifítico, ou seja, sobre a superfície de troncos de árvores onde a luz incidente é difusa ou direta por curtos períodos de tempo.

No entanto, a espécie homeoclorófila *Anemia flexuosa*, apesar de ocorrer com maior frequência em ambientes mais sombreados, pode também ser encontrada sob uma condição de exposição à radiação luminosa aparentemente semelhante à verificada para espécies peciloclorófilas, como *Pleurostima purpurea*.

1.6.4 Condições de cultivo

Observações em condição de cultivo em casa de vegetação mostram que esta espécie pode ser cultivada sob radiação solar direta e alta disponibilidade de água, embora aparentemente passe a desenvolver folhas menores e em menor número, comparativamente. Além disso, *Anemia flexuosa* é capaz de sobreviver após um ciclo completo de desidratação e reidratação sob radiação solar direta, mas parece não manter a mesma longevidade foliar após repetidos ciclos comparando-se com uma condição sombreada. Outro aspecto observado é de que *Anemia flexuosa* parece não perdurar de forma viável no estado dessecado por longos períodos de tempo, diferentemente das espécies peciloclorófilas. Isto pode sugerir a ocorrência de uma menor capacidade de manutenção da viabilidade em plantas homeoclorófilas do que em peciloclorófilas quanto maior o tempo de permanência na condição dessecada.

1.7 Argumentação e hipótese de estudo

Conforme apresentado, as células de tecidos vegetativos de plantas pecilohídricas sofrem, em geral, profundas alterações ultra-estruturais durante o processo de dessecação, que culmina com sua vitrificação. Nas peciloclorófilas, este estado protoplasmático de desidratação extrema é destituído de clorofilas devido ao mecanismo de desmantelamento do aparato fotossintético. Este mecanismo é visto como uma forma de impedimento contra danos foto-oxidativos que poderiam ocorrer durante o estado dessecado normalmente associado à condição de exposição à radiação solar direta. Neste sentido, a peciloclorofilia deve impedir a absorção excessiva de luz e conseqüente ocorrência de eventos de foto-oxidação em folhas dessecadas (SHERWIN; FARRANT, 1998). Desta forma, com a perda de clorofila, removem a principal fonte de espécies reativas de oxigênio do sistema. Provavelmente, a ausência de clorofilas durante a reidratação também deve ser importante no seu processo de recuperação, uma vez que nesta fase a atividade metabólica deve estar em grande parte comprometida com processos de reparo. Esta idéia se reforça pelo fato de o início da ressíntese de clorofilas em *Pleurostima purpurea*, assim como em outras espécies pecilohídricas peciloclorófilas, ocorrer somente após a total reidratação dos tecidos foliares (TUBA et al., 1993a,b; TUBA et al., 1994; AIDAR et al., 2010). Isto pode sugerir que a condição de máxima hidratação seja a mais segura para a reativação fotossintética, dada a

maior capacidade fisiológica de proteção e reparo que células túrgidas devem apresentar. Por outro lado, o período supostamente mais suscetível para a ocorrência de processos de foto-oxidação nestas plantas deve se limitar àquele em que o tecido foliar se encontra em um estado de desidratação parcial que ocorre no início do processo de dessecação, em que ainda há algum grau de conservação do estado ultra-estrutural de seus tilacóides juntamente com as clorofilas, mas sem assimilação fotossintética de CO_2 . Desta maneira, processos de dissipação de energia devem ser fundamentais nesta fase de desidratação para assegurar a viabilidade do tecido que se prepara para entrar em anabiose.

Em homeoclorófilas, por sua vez, a manutenção do aparato fotossintético estruturalmente íntegro, salvo algumas alterações, mantendo estável seu conteúdo de clorofilas durante o estado dessecado, é interpretada como vantajosa uma vez que os indivíduos deste grupo podem assumir um balanço positivo de carbono mais rapidamente com a reidratação (EICKMEIER, 1980), comparando-se com peciloclorófilas que dependem de uma reconstituição do sistema fotossintético. No entanto, não está claro em que condições a conservação do aparato fotossintético poderia favorecer a ocorrência de processos de foto-oxidação nas espécies tolerantes à dessecação homeoclorófilas, e sob qual faixa de estados de hidratação. Além disso, também não se conhece os limites de intensidade luminosa em que a estratégia de homeoclorofilia pode ocorrer, o que provavelmente depende das características foliares da espécie e que modifica seu padrão de interação com a luz de acordo com o grau de dessecação do tecido. Isto é pertinente, pois se o sistema de membranas fotossintéticas sofre poucas alterações durante toda a fase de dessecação e reidratação, sua interação com uma determinada intensidade luminosa sob certa faixa de estados parciais de hidratação poderia resultar na oxidação da clorofila e destruição de seu aparato fotossintético se mecanismos dissipativos de energia não forem suficientes para garantir sua proteção. Desta forma, tais plantas somente devem ser capazes de se recuperar após serem submetidas ao estado dessecado por meio da ativação de mecanismos de proteção contra danos oxidativos durante o processo de dessecação. Portanto, a ativação destes mecanismos deve ser suficiente para resultar em uma capacidade de recuperação adequada após a reidratação, dependendo da intensidade de luz. No entanto, a intensidade de luz incidente no nível celular também poderia ser alterada pelo próprio padrão de enrolamento foliar e/ou síntese de pigmentos específicos da espécie (Ex.: antocianinas), mesmo que em um ambiente ensolarado.

Em função destas considerações, não está claro se a maior frequência de indivíduos da espécie homeoclorófila *Anemia flexuosa* em ambientes mais sombreados é consequência de sua maior suscetibilidade a danos fotooxidativos que possam ocorrer durante as fases de desidratação e reidratação, quando se encontram em estados de hidratação parcial, ou seria decorrente do acúmulo de danos fotooxidativos nos tecidos foliares somente durante o estado dessecado, ou em cada uma destas fases. Diante disto, pode-se supor que a ocorrência de cada uma destas possibilidades incorreria em uma diminuição da taxa de recuperação fotossintética da espécie durante o processo de reidratação.

Para explicar a distribuição diferencial de espécies homeo e peciloclorófilas em diferentes habitats presumimos que tecidos foliares de *Anemia flexuosa* devem estar sujeitos a processos foto-oxidativos capazes de produzir efeitos de fotoinibição da fotossíntese em uma faixa de conteúdo relativo de água mais ampla do que em espécies peciloclorófilas durante as fases de desidratação e reidratação sob uma determinada intensidade luminosa. Em decorrência disto, levantamos a seguinte hipótese: se a ocorrência preferencial de *Anemia flexuosa* em ambientes sombreados é consequência de sua maior suscetibilidade a processos fotoinibitórios em uma maior faixa de conteúdo relativo de água do que em *Pleurostima purpurea* então a indução da dessecação numa condição de máxima radiação fotossinteticamente ativa não saturante em relação às condições iniciais de hidratação deve diminuir sua taxa de recuperação fotossintética durante a reidratação. Logo, a recuperação fotossintética de *Anemia flexuosa* durante a reidratação deve ser menor do que em *Pleurostima purpurea* com o aumento da condição de luz de condicionamento durante a fase de desidratação.

Para testar esta hipótese, foram avaliados parâmetros fotossintéticos e de relações hídricas durante os processos de dessecação e reidratação em diferentes intensidades luminosas em uma espécie homeoclorófila e outra peciloclorófila, ambas de uma mesma comunidade vegetal, e em uma espécie homeohídrica cultivada para servir como referência comparativa às pecilohídricas.

O objetivo deste projeto foi caracterizar a capacidade de uso e proteção contra a luz durante as fases de desidratação e reidratação de plantas intactas nas espécies tolerantes à dessecação *Anemia flexuosa* e *Pleurostima purpurea*, e na homeohídrica *Oryza sativa* (IAC 202).

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Tolerância à dessecação em homeoclorófilas

Stuart (1968) evidenciou a tolerância à dessecação de tecidos vegetativos de *Polypodium polypodioides* coletada de galhos de árvores de *Quercus virginiana* em Tallahassee, Florida. Neste estudo, segmentos foliares impedidos de enrolar apresentaram completa recuperação fotossintética após a perda de 97% do conteúdo normal de água. A atividade fotossintética foi medida pela produção de oxigênio, e foi proporcional ao conteúdo de água entre 20 e 100%. O autor também verificou que a submersão em água do pecíolo ou rizomas da planta desidratada não resultou na reidratação das folhas, que somente se tornaram túrgidas quando em contato com uma umidade relativa alta ou com água líquida. Foi verificado que sob condições de turgescência, o pecíolo transportou água do rizoma para a folha em transpiração, uma vez que folhas destacadas dos seus pecíolos se desidrataram, enquanto folhas intactas permaneceram hidratadas. Além disso, quando rizomas de plantas túrgidas inteiras eram colocados em água, as folhas permaneciam hidratadas e não enrolavam, mas quando se permitia que o rizoma secasse, as folhas desidratavam rapidamente e se enrolavam. De acordo com o autor, as escamas presentes na superfície desta espécie teriam a função de distribuir a água sobre a superfície foliar. Isto preveniria a ocorrência de danos mecânicos que poderiam ocorrer se somente uma parte da folha se tornasse expandida após a reidratação.

Eickmeier (1979) avaliou a recuperação fotossintética de frondes de *Selaginella lepidophylla* coletadas do campo em estado dessecado. Após a reidratação, foi observada uma rápida capacidade de recuperação fotossintética, o que estaria relacionada a uma maximização da assimilação de CO₂ durante os curtos períodos de disponibilidade de água nos ambientes de ocorrência da espécie. O autor concluiu que a rápida recuperação fotossintética foi consequência de um rápido aumento da atividade carboxilase da rubisco, o que teria sido possível tanto por uma síntese *de novo* quanto pela conservação da enzima no estado dessecado.

Eickmeier (1980) realizou um estudo comparativo sobre a capacidade de recuperação fotossintética das espécies *Selaginella lepidophylla* e *Selaginella pilifera*. A espécie de ambientes mais xéricos, *S. lepidophylla*, apresentou uma maior velocidade de recuperação fotossintética e taxas mais altas de assimilação de CO₂. Isto ocorreu devido a uma maior conservação do sistema

fotossintético no estado dessecado e a um menor requerimento por sistema de reparo fotossintético durante a reidratação em *S. lepidophylla* do que a espécie *S. pilifera* de ambientes mais mésicos.

Eickmeier (1983) estudou o efeito de diferentes taxas de dessecação na recuperação fotossintética de *Selaginella lepidophylla*. A taxa de recuperação fotossintética foi maior para as velocidades de desidratação intermediárias. Concluiu-se que a injúria provocada pela dessecação seria multicausal e que componentes específicos do processo de recuperação fotossintética respondem diferentemente a taxa de dessecação.

Harten e Eickmeier (1987) estudaram a influência da dessecação na recuperação fotossintética e na integridade de membranas de três espécies de pteridófitas com distribuições diferentes ao longo de um gradiente de aridez no Big Bend National Park, oeste do Texas: *Selaginella lepidophylla*, *Cheilanthes tomentosa*, *Notholaena sinuata* var. *cochisensis*. A espécie de menor altitude correspondente ao ambiente mais xérico, *S. lepidophylla*, apresentou menor perda líquida de CO₂ durante a respiração de reidratação, maior ganho líquido fotossintético com uma recuperação fotossintética mais rápida, menor nível de danificação de membranas e foram tolerantes a um período de tempo mais longo de desidratação do que as de ambientes mais mésicos. A espécie de maior altitude, *C. tomentosa*, foi a mais sensível à dessecação com a recuperação fotossintética mais lenta e o maior nível de danificação de membranas. A espécie com distribuição sob altitude média, *N. sinuata* var. *cochisensis*, apresentou respostas intermediárias de recuperação e de danos comparando-se com as anteriores. Os autores sugeriram que as diferenças quanto à capacidade de recuperação poderiam influenciar a distribuição destas espécies.

Muslin e Homann (1992) avaliaram o efeito da luz sobre a capacidade de tolerância à dessecação de *Polypodium polypodioides*, uma pteridófita epífita endêmica de Tallahassee, Florida, USA, onde ocorre comumente sobre o tronco da espécie arbórea *Quercus virginiana*. Para tanto, foram utilizadas peças foliares de *P. polypodioides* como unidade amostral retiradas de plantas cultivadas em casa de vegetação. Também foi utilizada a espécie *Asplenium resiliens* cultivada no laboratório para medidas comparativas. O dano provocado pela luz durante a dessecação de *Polypodium polypodioides* foi depende do estado de hidratação das folhas. A recuperação normal da eficiência fotoquímica ocorreu somente quando o tratamento fotoinibitório de luz foi fornecido enquanto as folhas estavam totalmente hidratadas, ou quando a

desidratação tinha alcançado um estágio no qual somente a separação primária de cargas e o armazenamento estavam operativos. O mesmo tratamento em folhas parcialmente desidratadas, com retenção de algum transporte de elétrons entre os fotossistemas, ou folhas dessecadas incapazes de desempenhar função fotossintética, resultou em uma recuperação ineficiente ou não houve recuperação fisiológica após a reidratação. Além disso, foi evidenciado que a ocorrência de fotoinibição esteve associada ao tempo de exposição à luz. O livre enrolamento foliar durante a desidratação diminuiu a intensidade da fotoinibição. Segundo os autores, os danos induzidos pela luz são evitados pela ocupação de ambientes sombreados pela espécie, bem como pelo enrolamento foliar durante a desidratação de maneira que somente a superfície foliar abaxial refletora é exposta à luz ambiente. Os autores concluíram que a fotoinibição representa de fato uma ameaça em potencial para folhas de *P. polypodioides* desidratadas em seu ambiente natural e que o enrolamento foliar é um mecanismo efetivo de proteção. Também foi demonstrado que o estado desidratado é o mais suscetível a danos fotoinibitórios.

Gildner e Larson (1992) estudaram a capacidade de tolerância à dessecação da espécie de pteridófito *Polypodium virginianum* encontrada em bordas de rochedos em condição de sub-bosque de floresta das Escarpas de Niágara, sul de Ontário, Canadá. De acordo com os autores, esta espécie persiste em seus ambientes de ocorrência natural sendo hábil na exploração de períodos de alta intensidade de luz na primavera e mantendo uma taxa baixa mas relativamente constante de assimilação de CO₂ apesar de exposições prévias a flutuação do suprimento de luz e água. Foram estudadas *in situ* mudanças sazonais da fotossíntese para se determinar mudanças no grau de utilização da luz em plantas controle, plantas previamente dessecadas seguidas da reidratação, e plantas continuamente hidratadas. Os autores verificaram que as frondes são limitadas pela luz a maior parte do tempo, e que aproximadamente 30-50% do ganho diário de carbono ocorreu em função da luz incidente na forma de “sunflecks”, ou seja, momentos curtos de tempo de feixes de radiação solar direta. Também observaram altas taxas fotossintéticas mesmo com uma densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF) de moderada a baixa de início da manhã, ilustrando outros fatores reguladores da produtividade no verão, como a temperatura amena associada a umidades relativas altas que favorecem a diminuição da resistência estomática. O maior ganho de carbono ocorreu na primavera (maio) e o menor no verão (agosto). Houve diminuição da taxa líquida fotossintética de maio a agosto, o que foi correlacionado à diminuição da umidade relativa do ar. Foi observada também uma co-variação

significante entre a diminuição da resposta fotossintética e o aumento da temperatura ao longo do ano. Além disso, não se observou aclimatação fotossintética em função da intensidade diferenciada de luz entre as estações do ano, uma vez que as formas das curvas de fotossíntese em função da luz foram similares. A saturação fotossintética ocorreu entre as DFFF de 100 e 200 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$. A dessecação anterior diminuiu a taxa fotossintética m\u00e1xima, mas n\u00e3o afetou os par\u00e2metros das curvas de luz ap\u00f3s a recupera\u00e7\u00e3o, indicando que qualquer dano sofrido em fun\u00e7\u00e3o da luz durante a desidrata\u00e7\u00e3o foi reparado rapidamente. Os autores observaram tamb\u00e9m que *P. virginianum* mostrou uma correla\u00e7\u00e3o entre potencial de \u00e1gua do xilema e umidade relativa do ar, preferencialmente ao potencial de \u00e1gua do solo, sugerindo que s\u00e3o capazes de suplementar absor\u00e7\u00e3o de \u00e1gua pelas ra\u00edzes com a absor\u00e7\u00e3o de \u00e1gua pela fronde.

Casper, Eickmeier e Osmond (1993) observaram uma diminui\u00e7\u00e3o intensa da efici\u00eancia fotossint\u00e9tica (estimada pela rela\u00e7\u00e3o de fluoresc\u00eancia F_v/F_m) durante a desidrata\u00e7\u00e3o de *Selaginella lepidophylla* sob duas diferentes densidades de fluxo de f\u00f3tons fotossint\u00e9ticos (DFFF), 50 e 650 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$. A diminui\u00e7\u00e3o de F_v/F_m esteve associada inicialmente a um aumento de F_o . Al\u00e9m da diminui\u00e7\u00e3o da efici\u00eancia fotossint\u00e9tica, foi observado um aumento de zeaxantina durante a desidrata\u00e7\u00e3o em ambos tratamentos luminosos. Os autores sugeriram que a diminui\u00e7\u00e3o da efici\u00eancia associada a um aumento da via n\u00e3o-fotoqu\u00edmica de extin\u00e7\u00e3o da fluoresc\u00eancia (indicada pelo aumento da concentra\u00e7\u00e3o de zeaxantina), bem como o enrolamento da fronde e o auto-sombreamento serviriam para minimizar danos fotoinibit\u00f3rios durante o processo de desidrata\u00e7\u00e3o de *S. lepidophylla*.

Markovska et al. (1994) realizaram um estudo com as esp\u00e9cies vasculares superiores *Haberlea rhodopensis* e *Ramonda serbica* (Gesneriaceae), ambas tolerantes \u00e0 desseca\u00e7\u00e3o homeoclor\u00f3filas, end\u00eamicas da regi\u00e3o dos Balkans (Bulg\u00e1ria). A desidrata\u00e7\u00e3o na luz resultou na fragmenta\u00e7\u00e3o de membranas do tonoplasto, mudan\u00e7as na forma dos cloroplastos e diminui\u00e7\u00e3o consider\u00e1vel do sistema interno de membranas de *Haberlea rhodopensis*, enquanto que em *Ramonda serbica* foram observadas mudan\u00e7as muito menos substanciais em sua ultra-estrutura, tanto na luz quanto no escuro. As quantidades de clorofilas a e b nas folhas de *H. rhodopensis* e *R. serbica*, diminuíram mais marcadamente durante a desidrata\u00e7\u00e3o na luz do que no escuro, tendo havido um aumento da rela\u00e7\u00e3o de clorofilas a/b durante a desidrata\u00e7\u00e3o tanto na luz quanto no escuro. A quantidade de caroten\u00f3ides aumentou na desidrata\u00e7\u00e3o das duas esp\u00e9cies na luz. No escuro, diminuiu quase duas vezes nas folhas de *H. rhodopensis* enquanto que em *R. serbica* o

resultado foi similar ao verificado para a condição de luz. Após oito dias de recuperação as quantidades de clorofilas a e b alcançaram valores próximos dos controles. A recuperação tanto na luz quanto no escuro resultou em uma razão a/b mais alta do que a observada para o controle. A quantidade de carotenóides permaneceu baixa comparada com a do controle. Durante a desidratação na luz ($65 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$), *H. rhodopensis* apresentou um sutil aumento da fotossíntese sob um déficit de saturação hídrica (DSH) (inverso do conteúdo relativo de água, CRA) em torno de 50%, após o qual diminuiu lentamente até se tornar negativa sob DSH em torno de 90%. Este padrão foi similar para a transpiração, enquanto que os valores de resistência estomática aumentaram acentuadamente sob um DSH em torno de 50%. No escuro, a fotossíntese aumentou sutilmente sob DSH em torno de 60-70%, enquanto que a transpiração diminuiu lentamente e de forma inversa em relação à resistência estomática. Em *R. serbica*, a fotossíntese foi mínima sob DSH em torno de 50%, e aumentou sutilmente com a desidratação. A transpiração e a resistência estomática diminuíram gradualmente. Este padrão de mudanças da fotossíntese, transpiração e condutância estomática foi similar no escuro, mas com uma menor amplitude de variação para a fotossíntese. Durante a recuperação na luz, a fotossíntese de *H. rhodopensis* aumentou gradualmente com a diminuição do DSH. Sob DSH de 20-25%, a fotossíntese alcançou os valores do grupo controle. A transpiração aumentou acentuadamente até um DSH em torno de 50%, a partir do qual se manteve estável. A resistência estomática diminuiu gradualmente. Durante a recuperação no escuro, o balanço de carbono permaneceu negativo, enquanto a transpiração aumentou e a resistência estomática diminuiu para valores abaixo dos valores típicos alcançados pelas plantas recuperadas na luz. A recuperação de *R. serbica* na luz resultou no aumento da fotossíntese até um DSH em torno de 50%, a partir do qual tornou a diminuir lentamente. A transpiração aumentou quase duas vezes embora a resistência estomática tenha apresentado uma amplitude de variação muito estreita. Os valores de condutância estomática foram quase zero sob DSH em torno de 50% e, a partir daí, aumentaram sutilmente.

Sherwin e Farrant (1998) estudaram mecanismos de proteção contra a luz na espécie homeoclorófila africana *Craterostigma wilmsii*. O estudo foi realizado com plantas intactas, no interior de casa de vegetação. A indução da dessecação foi promovida com a suspensão da irrigação. Em *Craterostigma wilmsii*, a prevenção contra danos foto-oxidativos foi atribuída a combinações de mudanças físicas e químicas. Nesta espécie, o enrolamento foliar durante a desidratação resultou na exposição da face abaxial, além de que houve uma diminuição de 30%

do conteúdo de clorofila e um aumento de três vezes no conteúdo de antocianinas. A atividade de ascorbato peroxidase (AP) durante desidratação também aumentou, enquanto superóxido dismutase (SOD) e glutathione redutase (GR) aumentaram durante a reidratação.

Hietz e Briones (2001) verificaram, entre oito espécies de pteridófitas epífitas de diferentes posições do interior de copas de floresta pluvial tropical mexicana (Cerro Acatlán, Veracruz central, México), que a maioria apresentou alguma característica para lidar com a falta de água, como folhas ou rizomas que armazenam água, controle efetivo da transpiração, ajuste osmótico, ou tolerância à dessecação. Quando colocadas para dessecar, a eficiência quântica fotossintética de folhas acondicionadas ao escuro (avaliada pela medida de F_v/F_m) permaneceu alta até que o conteúdo relativo de água diminuísse para abaixo de 30 a 20%. Sob um conteúdo relativo de água muito maior, entre 70 e 30%, folhas expostas a $200 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ por um minuto mostraram um aumento inicial da eficiência quântica efetiva (medida pela relação F_v'/F_m') seguido da diminuição dependendo da espécie, em contraste com os 30% necessários para diminuir F_v/F_m . Nas espécies tolerantes à dessecação F_v/F_m diminuiu sob CRA maior do que em uma das espécies sensíveis à dessecação, sugerindo que nas primeiras ocorre uma inativação e proteção de parte do sistema fotossintético, enquanto em espécies sensíveis isto não ocorre e por isso sofreriam danos irreversíveis. Após exposição à radiação solar direta por uma hora ($1000 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$), os autores verificaram que as espécies de ambientes mais expostos apresentaram uma melhor capacidade de recuperação de F_v/F_m , em relação ao medido antes da exposição a luz forte, do que plantas de ambientes mais sombreados, dentro de uma escala de tempo de minutos a horas. Houve recuperação de F_v/F_m em até dois dias, pelo menos parcialmente, para a maioria das espécies estudadas, após perda de 80 a 96% da saturação. Os autores discutem que o enrolamento de folhas sob dessecação é comum em pteridófitas tolerantes a altos graus de dessecação, mas, isoladamente, o enrolamento não permitiria uma proteção perfeita contra a luz, principalmente em espécies encontradas em pleno sol em que a superfície foliar exposta após o enrolamento não é reflexiva. Além destas, espécies tolerantes à dessecação em que a grande espessura não permite um enrolamento eficiente também são encontradas em pleno sol. Desta maneira, ambos tipos de espécies exemplificadas deveriam depender de mecanismos bioquímicos para poderem sobreviver à dessecação sob alta luminosidade, possivelmente o mecanismo mediado por xantofila induzido pela dessecação. Os autores sugerem que a tolerância ou a evitância à dessecação, além da alta luminosidade, podem ser importantes

tanto para o controle da distribuição das espécies estudadas quanto para o desempenho fotossintético sem ocorrência de estresse. Os autores concluíram que, pelo menos para a parte mais superior da copa, a habilidade em sobreviver a falta de água evitando ou tolerando a dessecação e a proteção contra fotoinibição foram mais importantes para a distribuição das epífitas estudadas do que seu desempenho sob condições ótimas.

Proctor (2003) realizou um estudo com *Hymenophyllum tunbrigense* e *Hymenophyllum wilsonii* (Hymenophyllaceae), ambas de ambientes sombreados do sudoeste da Inglaterra, tolerantes à dessecação homeoclorófilas, cujas folhas apresentam uma única camada de células. Neste estudo, suas folhas foram destacadas e mantidas hidratadas para realização das medidas experimentais em algumas horas até dois dias após coletadas. As amostras foram representadas por grupos submetidos a duas densidades de fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF) diferentes, moderada e baixa, de 400 e 200 $\mu\text{mol fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, respectivamente. Foram caracterizadas curvas de luz por fluorometria e trocas gasosas em condição de hidratação plena, apresentando saturação sob baixas irradiâncias e com ampla variação (DFFF entre 63 e 189 para *Hymenophyllum tunbrigense* e entre 129 e 552 para *Hymenophyllum wilsonii*). A dessecação destas espécies foi induzida em frascos dessecadores contendo soluções salinas saturadas em equilíbrio com o meio, capazes de estabelecer umidades relativas do ar (UR) de 20, 43 e 74%. A recuperação de *H. wilsonii* foi completa e rápida após 7 dias no estado desidratado nas diferentes umidades relativas de acondicionamento e, em *H. tunbrigense*, foi menor somente sob 43%. Longos períodos de permanência sob UR de 74% (aprox. -40 MPa) resultaram em pequena sobrevivência de ambas espécies. Concluiu-se que *H. wilsonii* foi mais tolerante à dessecação, recuperando-se mesmo após 2 meses sob desidratação à 43% ou 20% UR (valores correspondentes à potenciais de água de -114 e -218 MPa, respectivamente), enquanto *H. tunbrigense* apresentou um nível similar de recuperação após 30 dias, mas sobreviveu somente sob UR de 43%. Após 15 dias de desidratação neste nível de umidade houve uma menor recuperação de *H. tunbrigense* do que *H. wilsonii*. Poucos dias de desidratação resultou em rápida recuperação, correspondente à 85% e 60% da eficiência quântica potencial do fotossistema II (Fv/Fm) nos primeiros 20 minutos para *H. Wilsonii* e *H. tunbrigense*, respectivamente. O autor concluiu que o padrão de tolerância à dessecação nas espécies de *Hymenophyllum* é similar ao de briófitas, e que a recuperação é substancialmente independente da intensidade de dessecação em uma ampla faixa. Além disso, o autor afirma que os resultados foram mais semelhantes aos

observados para briófitas tolerantes à dessecação de habitats mais expostos do que de ambientes sombreados por vegetação. Por outro lado, também verificou que ambas as espécies sofreram quando mantidas por longos períodos sob UR de 74%, comparando-se com umidades mais baixas, e que o comprimento do período de tempo de permanência da planta no estado desidratado foi claramente um limite para sua tolerância. Neste mesmo estudo, o coeficiente de extinção não fotoquímica da fluorescência (NPQ, utilizado como indicador da ocorrência do ciclo das xantofilas) foi máximo sob radiação de $400 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Não houve evid\u00eancia clara de diferen\u00e7a de NPQ entre as duas esp\u00e9cies. A f\u00f3rmula 1 – coeficiente de extin\u00e7\u00e3o fotoqu\u00edmica da fluoresc\u00eancia (qP), usada como medida do estado de redu\u00e7\u00e3o da quinona (QA) acceptora prim\u00e1ria de el\u00e9trons do fotossistema II, aumentou com a irradi\u00e2ncia, e sua curva em fun\u00e7\u00e3o do DFFF foi negativamente correlacionada com NPQ. O autor tamb\u00e9m verificou que a taxa de transporte de el\u00e9trons (ETR) saturou sob irradi\u00e2ncia mais alta do que a fotoss\u00edntese nas an\u00e1lises de curvas de luz, concluindo que isto deve-se, provavelmente, \u00e0 inclus\u00e3o de fotoss\u00edntese e fotorespira\u00e7\u00e3o em seu c\u00e1lculo.

Farrant et al. (2003) avaliaram a influencia da luz durante a desidrata\u00e7\u00e3o e a capacidade de recupera\u00e7\u00e3o nas esp\u00e9cies vasculares homeoclor\u00f3filas tolerantes \u00e0 desseca\u00e7\u00e3o africanas *Craterostigma wilmsii* e *Myrothamnus flabellifolius*. As plantas foram desidratadas sob densidade de fluxo de f\u00f3tons fotossint\u00e9ticos (DFFF) de $400 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ou sob escuro cont\u00ednuo e, mantidas por uma semana no estado dessecado antes da reidrata\u00e7\u00e3o. Em todos os tratamentos, a reidrata\u00e7\u00e3o foi feita na luz, e 48 horas ap\u00f3s a reidrata\u00e7\u00e3o foram avaliadas. Metade das plantas em cada tratamento teve as folhas impedidas de enrolar. *Craterostigma wilmsii* apresentou um aumento do conte\u00fado de antocianina e sacarose, bem como um aumento da atividade de enzimas antioxidantes durante a desidrata\u00e7\u00e3o. Em *Myrothamnus flabellifolius* houve uma maior intensidade de aumento do conte\u00fado de antocianinas e da atividade de enzimas antioxidantes, comparando-se com *Craterostigma wilmsii*. *Craterostigma wilmsii* sobreviveu somente quando desidratada na luz sem impedimento para enrolar. *Myrothamnus flabellifolius* sobreviveu ap\u00f3s desidrata\u00e7\u00e3o na luz com ou sem impedimento do enrolamento das folhas. Ambas as esp\u00e9cies morreram quando desidratadas no escuro, independente do impedimento de enrolamento da folha. A morte esteve sempre acompanhada do aumento de perda de eletr\u00f3litos. Os autores conclu\u00edram que a falta de luz, preferencialmente ao tratamento de restri\u00e7\u00e3o ao enrolamento, foi a causa prim\u00e1ria de danos \u00e0 membrana nas duas primeiras esp\u00e9cies. Segundo os

autores, isto poderia ser explicado pela existência de genes regulados pela luz, e que pelo menos parte dos genes responsáveis pela proteção contra a dessecação nestas homeoclorófilas requerem luz, em combinação com a falta de água, para sua transcrição/regulação.

Watkins e colaboradores (2007) evidenciaram a ocorrência da tolerância a dessecação na fase gametofítica de diferentes pteridófitas tropicais, o que contribuiria para a diferenciação da capacidade de colonização de ambientes mais secos pelas diferentes espécies. Foi verificado que a recuperação foi mais intimamente relacionada a taxa de desidratação do que ao conteúdo final de água alcançado ou ao tamanho do gametófito. Dentre as espécies estudadas, a maioria com a forma de vida terrestre além de duas epífitas, as de ambientes mais xéricos, no caso representado pelas epífitas neste estudo, exibiram maior grau de tolerância a dessecação, do que as de ambientes mais méxicos. Os autores sugeriram também que gametófitos com morfologias mais complexas poderiam reter mais água permitindo a extensão do tempo de permanência no estado úmido e fotossintetizante com a proliferação dos talos.

Heber (2008) apresentou estudos com os líquenes *Cladonia rangiformis* (associado a alga verde como fotobionte; de solo calcáreo exposto ao sol), *Parmelia sulcata* (cloro-liquen, de casca de árvores), e *Peltigera neckeri* (ciano-liquen, associado a cianobacteria, de locais sombreados sob árvores, que não possui o mecanismo de dissipação de energia dependente de zeaxantina), todos de Würzburg (Alemanha) e proximidades. Os talos coletados foram inicialmente aclimatados ao escuro no estado hidratado por tempos prolongados, desde várias horas até poucos dias, objetivando a minimização ou eliminação de zeaxantina por meio de sua conversão para violaxantina. Em seguida foram desidratados e reidratados duas vezes, sequencialmente, a primeira no escuro ou próximo do escuro e a segunda na luz, acompanhadas ou não da presença de outras condições como inibidores químicos, variação de temperatura e da velocidade de desidratação. A dessecação induziu a extinção da fluorescência, podendo ser mais acentuada na luz do que no escuro, dependendo da espécie, ou indiferente. O uso de inibidores como nigericina e ditiotreitol não impediu a extinção da fluorescência induzida pela dessecação, não podendo ser explicada por mecanismos de dissipação de energia dependentes de zeaxantina. Glutaraldeído, por sua vez, inibiu a ativação de mecanismos de dissipação de energia. Além disso, o aumento da fluorescência foi induzido pelo aumento de temperatura em talos dessecados, podendo ser maior na luz do que no escuro, dependendo da espécie, ou indiferente. De acordo com o autor, líquenes respondem a luz forte mesmo quando dessecados. Talos dessecados no escuro mostraram

evidências de acúmulo de extintores de energia com diminuição progressiva da fluorescência durante curtos períodos de iluminação de alta intensidade (20 segundos sob $11.000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$), sendo revers\u00edvel apenas parcialmente no escuro. Em talos dessecados na luz, dependendo da esp\u00e9cie, n\u00e3o ocorre ac\u00famulo de extintores, ou ocorre muito pouco, mas um aumento do n\u00edvel de fluoresc\u00eancia dependente da luz, o que revela separa\u00e7\u00e3o de cargas seguida por redu\u00e7\u00e3o da quinona aceptora (QA) no centro de rea\u00e7\u00e3o do fotossistema II (FSII). Esta redu\u00e7\u00e3o de QA se mostra como um aumento revers\u00edvel da fluoresc\u00eancia. Uma desidrata\u00e7\u00e3o r\u00e1pida resultou em menor extin\u00e7\u00e3o de fluoresc\u00eancia do que uma desidrata\u00e7\u00e3o lenta. Quando exposto a luz (por 25 minutos sob $11.000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) no estado dessecado, os talos que foram desidratados rapidamente apresentaram uma maior perda irrevers\u00edvel de fluoresc\u00eancia do que os desidratados lentamente. A perda irrevers\u00edvel de fluoresc\u00eancia indicaria a indu\u00e7\u00e3o de danos por radicais livres ao aparato fotossint\u00e9tico. O escuro reverteu apenas uma pequena parte da perda de fluoresc\u00eancia indicando alguma reversibilidade da forma\u00e7\u00e3o de extintores. A hidrata\u00e7\u00e3o aumentou a fluoresc\u00eancia sob inativa\u00e7\u00e3o da dissipa\u00e7\u00e3o de energia induzida pela desseca\u00e7\u00e3o. A recupera\u00e7\u00e3o do aumento da fluoresc\u00eancia foi menor nas amostras desidratadas rapidamente. A perda de separa\u00e7\u00e3o de cargas (indicada pela diminui\u00e7\u00e3o de F_v/F_m) induzida pela luz, indica danos aos centros de rea\u00e7\u00e3o do FSII. Quando o experimento acima foi realizado sob nitrog\u00eanio, n\u00e3o em ar, a perda de fluoresc\u00eancia \u00e9 bastante diminuída, indicando que a ativa\u00e7\u00e3o de oxig\u00eanio \u00e9 um importante aspecto do dano induzido pela luz, mas n\u00e3o o \u00fanico. O autor concluiu que a falta de \u00e1gua seria suficiente para a altera\u00e7\u00e3o da conforma\u00e7\u00e3o dos complexos prote\u00edna-pigmentos das membranas dos tilac\u00f3ides, que tamb\u00e9m respondem \u00e0 luz permitindo maior flexibilidade na regula\u00e7\u00e3o da extin\u00e7\u00e3o da fluoresc\u00eancia. Desta maneira, mudan\u00e7as conformacionais do complexo prote\u00edna-clorofila induzido pela desseca\u00e7\u00e3o permitiria a transfer\u00eancia de energia da clorofila para caroten\u00f3ides ligados facilitando a dissipa\u00e7\u00e3o de energia em uma forma denominada ultra-r\u00e1pida. Com estes resultados, o autor postulou a exist\u00eancia de mais de um mecanismo de fotoprote\u00e7\u00e3o no estado dessecado em l\u00edquenes, al\u00e9m da dissipa\u00e7\u00e3o de energia dependente de zeaxantina (HEBER, 2008).

De acordo com Fern\u00e1ndez-Mar\u00edn et al. (2009), a desidrata\u00e7\u00e3o no escuro de folhas destacadas de *Ceterach officinarum*, uma pterid\u00f3fita tolerante \u00e0 desseca\u00e7\u00e3o, resulta na intensa diminui\u00e7\u00e3o da efici\u00eancia fotoqu\u00edmica m\u00e1xima do FSII, bem como na forma\u00e7\u00e3o de zeaxantina (Z) a partir de violaxantina de-epoxidase, sendo estes processos revertidos durante a reidrata\u00e7\u00e3o.

Neste estudo, foram obtidas evidências, por meio de uso de inibidores químicos, de que a formação de zeaxantina no escuro poderia ser um processo independente do gradiente de pH transmembrana do interior dos tilacóides. Além disso, os autores verificaram que a formação de zeaxantina durante a desidratação de folhas destacadas no escuro também ocorre em plantas não tolerantes à dessecação, o que poderia representar um mecanismo de proteção de clorofilas e facilitador de aclimação sob condições de reidratação. Como a formação de zeaxantina é descrita em literatura como um processo tipicamente dependente de luz (DEMMIG-ADAMS, 1990; DEMMIG-ADAMS; ADAMS, 1996), a indução deste processo somente pela desidratação durante a noite poderia ser interpretada, segundo os autores, como um mecanismo antecipatório de prevenção de danos contra a luz nos primeiros horários do período da manhã. Neste sentido, os autores propõem que a indução do ciclo das xantofilas poderia ocorrer por promotores alternativos diferentes da luz, sugerindo a existência de uma sinalização cruzada entre mecanismos de sensoramento de luz com os de sensoramento de outros fatores potenciais de estresse. Desta forma, o sinal ambiental que iniciaria a reposta de proteção não seria o fator estressante promovido pela intensa radiação em si, mas o modulador de sua significância fisiológica representado pela disponibilidade de água no tecido. Este estudo é o primeiro a demonstrar a completa operação do ciclo das xantofilas sob condição de escuro em uma planta vascular intacta.

Farrant e colaboradores (2009) evidenciaram a influência da sazonalidade na aquisição de mecanismos de proteção durante a desidratação de *Mohria caffrorum*, uma Schizaeaceae da África do sul que ocorre em ambientes parcial ou totalmente expostos de margens de florestas. Plantas coletadas na estação seca apresentaram capacidade de recuperação de seu conteúdo interno de água após a reidratação com pouca perda de eletrólitos, indicando preservação de membranas durante a dessecação, diferentemente das plantas coletadas na estação chuvosa que não reidrataram mais do que 20%. Além disso, as superfícies abaxiais das frondes de indivíduos colhidos na seca estavam cobertas de escamas de coloração laranjada, ausentes desta superfície nas plantas colhidas na estação chuvosa. Durante o enrolamento das frondes tolerantes à dessecação colhidas na estação seca, a superfície adaxial foi ocultada, enquanto as escamas da superfície abaxial mascararam a clorofila contida nestas superfícies. Por outro lado, as frondes colhidas na estação chuvosa não enrolaram durante a desidratação, não permitindo assim a prevenção da interação luz-clorofila durante esta fase. Em nível ultra-estrutural de frondes

tolerante à dessecação, foi observado um alinhamento de inclusões fenólicas na periferia do vacúolo, tendo sido relacionada à estabilidade estrutural desta estrutura. Também se observou a vacuolização e o agrupamento de organelas como formas de estabilização mecânica. Os cloroplastos retiveram sua ultra-estrutura, com presença de plastoglóbulos, e perda de amido. A eficiência quântica potencial do fotossistema II (Fv/Fm) das frondes tolerantes à dessecação diminuiu após o conteúdo de água ter diminuído para níveis menores que 70%. Nas frondes sensíveis à dessecação, que mantiveram valores de Fv/Fm maiores do que o anterior, a diminuição de Fv/Fm ocorreu somente após o CRA foliar ter diminuído para valores abaixo de 46%, além do qual não recuperaram após a reidratação. Segundo os autores, esta perda de viabilidade estaria relacionada, provavelmente, a atividade de espécies reativas de oxigênio. Além disso, observou-se uma alta atividade de enzimas antioxidantes nas frondes tolerantes à dessecação durante a reidratação comparada com das frondes sensíveis à dessecação. Além disso, a desidratação das frondes tolerantes à dessecação de *M. caffrorum* resultou em um aumento na concentração de várias proteínas e no aparecimento de outras novas proteínas, muitas das quais estáveis sob alta temperatura, possivelmente tipo LEA e HSP, e que desaparecem na reidratação. Além disso, também houve aumento dos protetores sacarose, rafinose e ciclitól, bem como da diminuição dos açúcares redutores frutose e glicose potencialmente danosos. De acordo com os autores, os mecanismos de proteção apresentados por esta espécie tiveram maior similaridade com aqueles descritos para angiospermas, do que com plantas pecilohídricas de ordens taxonômicas mais ancestrais, incluindo outras pteridófitas.

2.1.2 Peciloclorófilas

Hambler (1961) apresentou o primeiro estudo com uma espécie peciloclorófila tolerante à dessecação, *Afrotrilepis pilosa* (Cyperaceae) comum de afloramentos rochosos do oeste de África. Foi relatado que as folhas desta espécie suportaram a perda de mais de 86% de seu conteúdo de água sem perder a viabilidade. Dentro de 24 horas do início da reidratação, as folhas de *Afrotrilepis pilosa* foram capazes de recuperar a coloração verde e a flexibilidade assumindo a aparência normal de tecidos presumivelmente em atividade metabólica a partir de um estado em que apresentavam textura rígida e coloração marrom.

Owoseye e Sanford (1972) estudaram aspectos da tolerância à dessecação na espécie *Vellozia schnitzleinia* (atualmente *Xerophyta schnitzleinia*, Velloziaceae) encontrada na região

oeste da África. Foi verificada a perda dos cloroplastos com a desidratação, e a rápida recuperação desta organela nos mesmos tecidos foliares subsequentemente após a reidratação. Os autores reconheceram que a persistência das folhas após um ciclo completo de desidratação – reidratação significaria uma vantagem em poder continuar o crescimento após a reidratação sem a perda de material estrutural e de tempo de aproveitamento dos curtos períodos de disponibilidade de água.

Gaff e Churchill (1976) caracterizaram a peciloclorofilia em *Borya nitida* (Liliaceae), uma espécie australiana de terrenos arenosos e afloramentos rochosos. Em seu estudo, foi evidenciada a presença de mecanismos de evitância à desidratação que seriam necessários para a ativação dos mecanismos de preparação para a tolerância à dessecação. Durante o processo de desidratação, a fase de perda da clorofila foi caracterizada dentro de um período curto de tempo, de até 24 horas.

Meguro et al. (1977) observaram o andamento diário da transpiração, balanço de carbono e conteúdo de clorofila durante os processos de desidratação e reidratação de tecidos foliares da espécie brasileira *Xerophyta plicata* (Velloziaceae atualmente denominada *Nanuza plicata*). Durante a desidratação, houve a perda de aproximadamente 90% de água do tecido. A desidratação foi acompanhada da perda completa de clorofilas, que tornou a se recuperar após a reidratação. A maior capacidade de recuperação do balanço positivo de carbono ocorreu quando as folhas foram desidratadas sob umidade relativa de 56%. Sob condição de déficit hídrico moderado, foi evidenciada uma capacidade relativamente alta de evitar a desidratação pela regulação estomática, comportando-se como uma homeohídrica típica economizadora de água. Com o progresso da desidratação, foi evidenciada a tolerância à dessecação da espécie com a capacidade de recuperação após o dessecamento protoplasmático.

Hetherington e Smillie (1982) verificaram na peciloclorófila *Borya nitida*, uma espécie australiana, a perda completa de clorofila durante o processo de desidratação e posterior recuperação de seu conteúdo com a reidratação. Os autores verificaram que a perda de clorofila de cloroplastos isolados foi acompanhada por uma estimulação da atividade dos fotossistemas II e uma diminuição gradual da transferência de elétrons mediada pelos fotossistemas I, até a perda completa dos fotossistemas com o avanço de perda de clorofila. Após a reidratação e subsequente recuperação das clorofilas, foram obtidas evidências de que a atividade do fotossistema I, aparentemente, recuperou mais rapidamente do que o fotossistema II.

Tuba e colaboradores (1993a) estudaram folhas destacadas de *Xerophyta scabrida* colhidas no estado dessecado em populações naturais da Tanzânia. De acordo com o estudo, as folhas iniciaram prontamente a absorção de água depois de colocadas verticalmente em frasco com o líquido. A água de acondicionamento foi mantida oxigenada com auxílio de bomba de aquário, bem como mantida com temperatura em torno de 23°C com um sistema de resfriamento. Para a realização dos experimentos, as folhas foram mantidas sob uma DFFF de 1200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ com lâmpada halógena. O máximo conteúdo de água foi atingido aproximadamente 12 horas do início da reidratação, tendo o mesmo período correspondido ao aumento máximo da área foliar específica. As folhas dessecadas apresentaram 72% menos carotenóides do que após a recuperação. Após 8 horas de reidratação, antes que a hidratação fosse completa, houve o início do acúmulo de clorofilas a partir de valores nulos, bem como de carotenóides que voltaram a se acumular a partir dos conteúdos mínimos observados no estado dessecado. Após 72 horas de reidratação não houve mais mudanças no conteúdo de clorofilas. A emissão de fluorescência somente foi detectada após o início do acúmulo de clorofila. O aumento do conteúdo de clorofila resultou na diminuição da razão F690/F735 de fluorescência máxima (Fm) e fluorescência em equilíbrio dinâmico (Fs). A completa perda de clorofila e dos sinais de fluorescência no estado dessecado e nas primeiras 8 horas após reidratação, bem como o re-acúmulo de clorofila e dos sinais apropriados de fluorescência, foram evidências da natureza peciloclorófila e da tolerância a dessecação em *X. scabrida*. Os autores sugerem que a preservação de carotenóides no estado dessecado de *X. scabrida* pode ser importante para a fase de reorganização dos cloroplastos e de seu aparato fotossintético durante a reidratação.

Tuba et al. (1994) caracterizaram a recuperação do conteúdo de clorofilas associada à assimilação fotossintética de CO₂ após a reidratação da espécie africana peciloclorófila *Xerophyta scabrida* (Velloziaceae) a partir do estado dessecado. Foi verificado que o estabelecimento do turgor foliar e do conteúdo máximo de água ocorreram, respectivamente, dentro de 2 e 10 horas após a reidratação. De acordo com o estudo, estes processos foram pré-requisitos para o início da resíntese dos pigmentos fotossintéticos e da recuperação da funcionalidade dos tilacóides. Logo após a reidratação, foi descrita uma fase de aumento da respiração denominada de “respiração de reidratação”, a qual permaneceu por até 30 horas. A recuperação da atividade fotoquímica iniciou 10 horas após a reidratação, juntamente com a resíntese de clorofilas. A assimilação líquida de CO₂ iniciou 24 horas após a reidratação. Valores

normais de atividade fotoquímica e assimilação líquida de CO₂ foram obtidos após 72 horas do início da reidratação. Este momento coincidiu com a recuperação máxima do conteúdo de clorofilas e carotenóides.

Dace et al. (1998) examinaram os processos associados com a recuperação de *Xerophyta humilis* (Velloziaceae). Para isto, utilizaram inibidores químicos actinomicina D ou ciclohexamida durante a reidratação para se determinar o quanto a recuperação inicial seria dependente da transcrição e tradução *de novo*, respectivamente. Os resultados sugeriram que considerável proteção da organização subcelular e de componentes do metabolismo ocorreria durante a desidratação, visto que a recuperação após a reidratação foi, em geral, independente da transcrição *de novo* de genes nucleares. No entanto, foi verificado também uma necessidade pela síntese de novas proteínas. Os autores presumiram que mensageiros de RNA para a síntese de clorofila bem como de componentes da cadeia de transporte de elétrons, aparentemente, deveriam ser estocados em uma forma estável durante a desidratação e seriam traduzidos durante a reidratação. No entanto, concluiu-se que, para uma recuperação completa da eficiência fotossintética, haveria necessidade de nova transcrição genômica.

Sherwin e Farrant (1998) avaliaram mecanismos de proteção contra a luz na peciloclorófila *Xerophyta viscosa*, juntamente com outras espécies africanas não peciloclorófilas. Em *Xerophyta viscosa* não ocorreu enrolamento foliar, mas as interações luz-clorofila foram minimizadas pela perda de clorofilas e o desmantelamento das membranas dos tilacóides durante a desidratação. O conteúdo de antocianina aumentou quatro vezes, bem como a atividade de ascorbato peroxidase (AP), glutathione redutase (GR) e superóxido dismutase (SOD) durante esta fase. Durante a reidratação, estas enzimas diminuíram sua atividade, enquanto a concentração de antocianina foi mantida estável até o início da re-síntese de clorofilas que se deu posteriormente à completa reidratação.

Farrant et al. (2003) avaliaram a influencia da luz durante a desidratação e a capacidade de recuperação de diferentes espécies vasculares tolerantes à dessecação africanas, entre as quais *Xerophyta humilis* (monocotiledônea peciloclorófila). As plantas foram desidratadas sob densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF) de 400 $\mu\text{mol fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ou sob escuro contínuo. Metade das plantas em cada tratamento teve as folhas impedidas de enrolar. *Xerophyta humilis* sobreviveu em todos os tratamentos e não apresentou aumento da perda de eletrólitos em nenhum deles.

2.2 Materiais e métodos

2.2.1 Experimento 1: Indução da desidratação, manutenção no estado dessecado e reidratação de plantas intactas de *Pleurostima purpurea* e *Anemia flexuosa* sob condições controladas

No experimento 1 foram realizadas medidas para a avaliação da capacidade de recuperação de plantas intactas de *Pleurostima purpurea* e *Anemia flexuosa* submetidas a diferentes tratamentos luminosos, durante a indução de um ciclo completo de desidratação – reidratação. Nos tecidos foliares destas espécies foram monitorados o conteúdo relativo de água, o conteúdo de pigmentos fotossintéticos, as trocas gasosas de CO₂ e H₂O, a eficiência quântica fotossintética e a dissipação de calor.

2.2.1.1 Material vegetal

Plantas de *Pleurostima purpurea* (Hook.) Raf. (Velloziaceae - Barbacenioidae) foram produzidas a partir de sementes coletadas em população natural da Pedra da Urca, Rio de Janeiro - RJ, utilizando-se substrato agrícola composto de turfa e vermiculita (Plantmax, Eucatex). As plantas jovens obtidas foram cultivadas até a fase adulta em potes (5 litros), com adubação NPK 10-10-10 duas vezes ao ano, com regas semanais intermediadas por secas episódicas, sob condições naturais de céu aberto.

Plantas de *Anemia flexuosa* (Sav.) Sw. (Schizaeaceae) de 3 a 6 folhas foram transplantadas de uma população natural da Pedra do Itanhangá, Rio de Janeiro – RJ, para potes (200 ml) contendo substrato agrícola de fibra de coco (Mix 98, Amafibra) e cultivadas também sob condições de céu aberto por 6 meses, aproximadamente.

2.2.1.2 Condições e fases experimentais

Neste experimento, plantas intactas adultas de *Pleurostima purpurea* e *Anemia flexuosa* foram transferidas para uma câmara com condições controladas (Fitotron, Conviron), com fotoperíodo diário de 12 horas de luz e 12 horas de escuro e densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF) no período luminoso de 400 μmol fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ na altura das folhas, temperatura de 25°C e umidade relativa (UR) do ar de 55%. As plantas foram mantidas nestas condições recebendo irrigação a cada dois dias por aproximadamente dois meses, suficientes para o desenvolvimento completo de folhas novas até a fase adulta. Nestas folhas foi investigado o

efeito da luz durante os processos de tolerância à dessecação por meio de combinações de tratamentos luminosos (tabela 1) fornecidos durante o período luminoso fotoperiódico em 4 diferentes fases:

- F1 - Pré-aclimatação = fase de 15 dias de duração sob plena hidratação precedente ao início da desidratação;
- F2 - Desidratação = fase iniciada com a suspensão da irrigação dos vasos e finalizada no 18º dia experimental no caso de *Pleurostima purpurea*, ou 6º dia experimental no caso de *Anemia flexuosa*, momentos estes suficientes para a perda de mais de 80% do conteúdo relativo de água foliar em ambas as espécies;
- F3 - Dessecação = fase posterior à desidratação em que as plantas permaneceram em condições de equilíbrio com o ar da câmara experimental por 42 dias, no caso de *Pleurostima purpurea*, ou 48 horas, no caso de *Anemia flexuosa*;
- F4 - Reidratação = fase iniciada com a reidratação do substrato e, especificamente para *Anemia flexuosa*, da hidratação da superfície das folhas e da saturação hídrica do ar circundante.

A separação das fases foi indicada nos gráficos por meio de uma linha vertical tracejada.

Tabela 1 – DFFF fornecida durante o período luminoso fotoperiódico para as espécies *Pleurostima purpurea* e *Anemia flexuosa* nas diferentes fases experimentais

DFFF ($\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) em função da fase experimental						
	Espécies	Pré-aclimação	Desidratação	Dessecação	Reidratação	Denominação do tratamento**
Tratamentos	<i>Pleurostima purpurea</i>	400	400	400	400	400-400
		100	100	100	100	100-100
	<i>Anemia flexuosa</i>	400	400	400	0-400*	400-400
		100	100	100	0-400*	100-100
		400	0	0	0-400*	0-0
		400	400	0	0-400*	400-0
		100	100	0	0-400*	100-0
		400	0	400	0-400*	0-400

(*) *Anemia flexuosa* foi inicialmente reidratada sob escuro contínuo e posteriormente acondicionada à DFFF de 400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para uma medida pontual de trocas gasosas e fluorescência sob condição de equilíbrio dinâmico, conforme metodologia a seguir.

(**) As denominações dos tratamentos foram estabelecidas em função das DFFF utilizadas nas fases de desidratação e de dessecação, respectivamente.

2.2.1.3 Uso de presilhas para a manutenção da exposição foliar às condições luminosas especificadas

Para impedir o enrolamento e garantir a incidência de intensidades de radiação conhecidas sobre as superfícies superiores dos diferentes tipos foliares, foram instaladas gentilmente presilhas plásticas em folhas de plantas intactas. Estas presilhas foram produzidas com placas de PVC de 0,3 mm de espessura, transparentes, recortadas em formas retangulares com dimensões suficientes para o recobrimento completo de folhas de *Anemia flexuosa* e parcial de *Pleurostima purpurea*. As placas foram perfuradas em toda sua área com broca 6 mm a cada 1 cm^2 , aproximadamente. Em seguida pares de placas perfuradas foram unidas pelas bordas com fita adesiva transparente, deixando duas aberturas nas laterais opostas para permitir o posicionamento foliar em seu interior. A superfície superior de algumas presilhas foi recoberta ou não com uma camada de tela sombreadora a 75%, afixada com cola quente, para permitir uma radiação incidente no espaço de posicionamento do tecido foliar com DFFF de 100 (na presença da tela) ou 400 (na ausência da tela) $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Estas presilhas foram instaladas nas folhas aproximadamente 15 dias antes do início do experimento (fase de pré-aclimação).

2.2.1.4 Indução da desidratação, manutenção no estado dessecado e reidratação

Para o início do experimento foi realizada a drenagem da água dos potes de cultivo e a suspensão da irrigação, permitindo o início da desidratação espontânea do substrato e das plantas (fase de desidratação) do grupo experimental. Neste momento, parte das folhas de *Anemia flexuosa* com presilhas instaladas sem telas sombreadoras foi recoberta com folha de alumínio objetivando o escurecimento contínuo durante esta fase. Em *Pleurostima purpurea*, este procedimento não foi realizado.

Após a completa desidratação, as folhas de *Anemia flexuosa* foram mantidas no estado dessecado por mais 48 horas (fase de dessecação). Durante o estado dessecado, um grupo de folhas foi mantido na mesma condição luminosa em que foram mantidas durante a fase de desidratação (400, 100 ou 0 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Além disso, outro grupo de folhas desidratadas sob DFFF de 400 ou 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ foi acondicionado ao escuro com o envolvimento de uma folha de alumínio, enquanto que aquelas desidratadas sob escuro contínuo foram expostas à radiação disponível na câmara de crescimento com DFFF de 400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ na altura das folhas.

No caso de *Pleurostima purpurea*, após uma desidratação de 18 dias, as plantas foram mantidas por mais 42 dias no estado dessecado (fase de dessecação) nas mesmas condições luminosas fornecidas durante a desidratação (400 ou 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

A reidratação de *Anemia flexuosa* e *Pleurostima purpurea* foi realizada irrigando-se diretamente o substrato de cultivo e colocando-se os potes dentro de bandejas contendo um volume permanente de água (fase de reidratação). No caso de *Pleurostima purpurea* a reidratação foi realizada sob luz contínua durante as primeiras 24 horas sob a mesma DFFF aplicada durante o período luminoso do regime fotoperiódico utilizado durante a desidratação. A partir do 2º dia de reidratação, o regime fotoperiódico foi normalizado para 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuro, de acordo com as condições iniciais de cultivo. No caso de *Anemia flexuosa*, a reidratação foi realizada em condição de escuro contínuo em uma câmara tipo B.O.D e, em adição à saturação do substrato, foram realizadas pulverizações de água sobre a superfície das folhas ao longo de todo o período de recuperação.

2.2.1.5 Metodologia de avaliação do efeito da luz durante a desidratação, dessecação e reidratação das plantas

O efeito da luz no durante os processos de desidratação, dessecação e reidratação de *Pleurostima purpurea* e *Anemia flexuosa* foi avaliado por meio da capacidade foliar de assimilação de CO₂ e de utilização ou dissipação da radiação incidente pelas vias fotoquímica e não-fotoquímica. Para tanto foram realizadas medidas foliares de trocas gasosas e fluorescência da clorofila durante as fases de desidratação, dessecação e reidratação. Durante o mesmo período foram monitorados o estado de hidratação do solo e foliar por meio do conteúdo relativo de água (CRA, em %), e o conteúdo dos pigmentos fotossintéticos clorofila a (C_a, em µgg⁻¹), clorofila b (C_b, em µgg⁻¹) e carotenóides totais representados por xantofilas e β-carotenos (C_{x+c}, em µgg⁻¹). Durante todo o experimento, foi mantido um grupo controle em condição de saturação hídrica em que foram realizadas as mesmas medidas.

2.2.1.5.1 Trocas gasosas e fluorescência da clorofila

A partir de medidas de trocas gasosas realizadas com um analisador de gás por infravermelho (Infra-Red Gas Analyser - IRGA, Licor 6400) foi calculada a assimilação de carbono (A, µmol CO₂ m⁻²s⁻¹), a transpiração (E, mol H₂O m⁻²s⁻¹) e a condutância estomática (g_s, mol H₂O m⁻²s⁻¹) de acordo com Caemmerer e Farquhar (1981). A área foliar amostrada na câmara do IRGA foi corrigida diretamente no equipamento anteriormente à realização de cada medida utilizando-se moldes com áreas conhecidas e dimensões comuns dentre as porções foliares em estudo.

As medidas de fluorescência da clorofila foram realizadas com um fluorômetro (Leaf Chamber Fluorometer – Licor) acoplado ao IRGA, e analisadas na forma de parâmetros, razões e coeficientes de extinção conforme nomenclatura utilizada por Kooten e Snel (1990). A avaliação dos parâmetros de fluorescência de amostras acondicionadas ao escuro, fluorescência basal (F_o, unidade relativa) e fluorescência máxima (F_m, unidade relativa), foram sempre realizadas anteriormente ao final do período de escuro fotoperiódico, simulando o horário de “pré-amanhecer”. F_o foi medida sob luz modulada incapaz de produzir resposta fotoquímica. Em seguida, F_m foi induzida por um pulso de saturação luminosa com intensidade em torno de 6000 µmol fótons m⁻²s⁻¹, com fonte de luz actínica, aplicado por 0,7 segundos.

As medidas de trocas gasosas e de fluorescência da clorofila de amostras acondicionadas à luz foram realizadas sempre após duas horas do início do período luminoso fotoperiódico. Para tanto, as amostras foliares foram posicionadas na câmara do IRGA previamente ajustado com a mesma DFFF utilizada em seu tratamento luminoso (400 ou $100 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$), até a estabilização da leitura do equipamento correspondente ao estado de equilíbrio dinâmico fotossintético, quando foi determinada a assimilação de CO_2 . Logo em seguida, com a manutenção do mesmo nível de luz contínua, foi determinada a fluorescência da clorofila das amostras acondicionadas à luz (F_s , unidade relativa). Após avaliação de F_s , foi aplicado um segundo pulso de saturação por $0,8$ segundos para a obtenção da fluorescência máxima da amostra acondicionada à luz (F_m' , unidade relativa). Em seguida, a luz actínica foi desligada e o nível mínimo de fluorescência da amostra acondicionada à luz (F_o' , unidade relativa) foi determinado com uso de uma fonte de radiação com comprimento de onda central do espectro na faixa do vermelho longo (740 nm) por 3 segundos. A radiação neste comprimento de onda aciona o funcionamento dos fotossistemas I e promove a oxidação das quinonas aceptoras iniciais de elétrons (Q_A), fazendo drenar os elétrons dos fotossistemas II. A determinação de F_o' é necessária para o cálculo dos coeficientes de extinção fotoquímico e não-fotoquímico da fluorescência nas formas apresentadas abaixo. Todas as medidas de F_o e F_o' foram realizadas com a amplitude de medida configurada para uma frequência de 600 Hz , enquanto que as medidas de F_m e F_m' foram realizadas com ajuste automático para 20 kHz durante o pulso de saturação luminosa.

A partir dos parâmetros de fluorescência do fotossistema II, foram calculadas: a eficiência quântica máxima ou potencial em amostras acondicionadas ao escuro ($F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$), que representa a fração de fótons absorvidos utilizados na via fotoquímica de uma folha pré-acondicionada ao escuro; a eficiência quântica efetiva ou de operação do fotossistema II de amostras pré-acondicionadas à luz (Φ_{PSII} ou $\Delta F/F_m' = (F_m' - F_s)/F_m'$) (GENTY et al., 1989), que também representa a fração de fótons absorvidos utilizados na via fotoquímica mas de uma amostra acondicionada à luz; a eficiência quântica efetiva ou de operação do fotossistema II de amostras acondicionadas à luz com oxidação completa de seus centros de reação por meio do uso de radiação vermelho longo ($F_v'/F_m' = (F_m' - F_o')/F_m'$); a taxa aparente de transporte de elétrons através dos fotossistemas II (“eletron transport rate”, “ETR” = $((F_m' - F_s)/F_m') f_{\text{PSII}} I \alpha_{\text{foliar}}$) em $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e representa o fluxo de fótons que dirige o fotossistema II, sendo f_{PSII} sua fração de

quanta absorvida tipicamente assumida como 0,5 para plantas C3, I a densidade de fluxo de fótons incidentes ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), e α_{foliar} a absorptância foliar, assumida como 0,85 durante todo o experimento; os coeficientes de extinção fotoquímica (qP) e não-fotoquímica (qN) da fluorescência foram calculados de acordo com Schreiber e Bilger (1987). O coeficiente de extinção fotoquímica (“photochemical quenching”, $qP = (F_m' - F)/(F_m' - F_o')$) indica o grau de abertura dos centros de reação dos fotossistemas II, e representa a ocorrência conjunta dos processos de fotossíntese e fotorespiração (ZHANG; SHARKEY, 2009); o coeficiente de extinção não-fotoquímico da fluorescência (“non-photochemical fluorescence quenching”, $qN = (F_m - F_m')/(F_m - F_o')$); e o coeficiente de extinção não-fotoquímico alternativo de Stern-Volmer (“non-photochemical quenching”, $NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$), normalmente utilizado como uma medida similar à qN, estão associados às vias de dissipação de calor.

2.2.1.5.2 Conteúdo relativo de água foliar e do substrato

O estado de hidratação foliar foi monitorado por meio do conteúdo relativo de água (CRA), a partir do peso fresco (PF), peso fresco saturado (PFS) e peso seco (PS) de amostras de tecidos foliares diferentes daquelas utilizadas na avaliação das trocas gasosas e fluorescência da clorofila. Estas amostras consistiram em porções foliares com aproximadamente 2 cm de comprimento para o caso de *Pleurostima purpurea*, e de folíolos inteiros para *Anemia flexuosa*. As porções foliares e folíolos foram cortados ao longo da nervura principal, produzindo duas porções simétricas. Uma das partes foi separada para a avaliação do conteúdo relativo de água e a outra para a extração de pigmentos fotossintéticos.

As porções foliares simétricas obtidas tiveram seus pesos frescos (PF) mensurados e iguais para que o peso seco da amostra encaminhada para determinação do CRA foliar fosse equivalente ao da amostra encaminhada para a determinação do conteúdo de pigmentos fotossintéticos. Após a determinação do peso fresco (PF) em balança de precisão (H 31 AR, Mettler, Suíça), as porções separadas para o cálculo do CRA foliar foram acondicionadas no interior de placas de Petri (6 cm diâmetro) contendo água destilada, mantidas em bancada de laboratório com luz e temperatura ambiente estáveis, por 24 horas, suficiente para promover a saturação hídrica do tecido a peso constante para a avaliação do peso fresco saturado (PFS). Posteriormente, foram acondicionadas em estufa à 80° C por mais 24 horas (tempo igualmente suficiente para resultar em seu peso constante) para a avaliação do peso seco (PS). Com os

valores obtidos, o CRA foi calculado pela fórmula (1):

$$CRA = \frac{(PF - PS)}{(PFS - PS)} \times 100 \quad (1)$$

onde PF = peso fresco, PS = peso seco e PFS = peso fresco saturado (TURNER, 1981). Para estimativa do CRA do substrato foi utilizada a mesma fórmula apresentada para o cálculo do CRA foliar (1), tendo sido determinado o peso fresco (PF) como o peso momentâneo, o peso seco (PS) como o valor mínimo obtido durante todo o período de desidratação, e o peso fresco saturado (PFS) como o valor máximo obtido durante o experimento para os potes contendo substrato e planta.

2.2.1.5.3 Conteúdo de pigmentos fotossintéticos

As porções foliares separada para a determinação do conteúdo de clorofilas a (C_a), clorofila b (C_b) e carotenóides totais (C_{x+c} , xantofilas + β -carotenos) foram maceradas em 4 ml de etanol 96% (v/v) com pistilo em almofariz em condição de baixa luminosidade no interior do laboratório. Os extratos obtidos foram centrifugados por 5 minutos à 3000 rpm e o sobrenadante acondicionado em frascos protegidos da luz, os quais foram armazenados em *freezer* sob baixa temperatura (-20°C). Em seguida foi determinada a absorbância dos extratos com um espectrofotômetro (UV-100-01, Shimadzu, Japão) nos comprimentos de onda de 470, 649 e 665 nm. As absorbâncias obtidas foram utilizadas para a quantificação dos pigmentos utilizando-se os coeficientes de extinção segundo Lichtenthaler e Wellburn (1983) de acordo com as fórmulas (2), (3) e (4):

$$C_a = 13,95.A_{665} - 6,88.A_{649} \quad (2)$$

$$C_b = 24,96.A_{649} - 7,32.A_{665} \quad (3)$$

$$C_{x+c} = \frac{1000.A_{470} - 2,05.C_a - 114,8.C_b}{245} \quad (4)$$

onde C_a = concentração de clorofila a, C_b = concentração de clorofila b e C_{x+c} = concentração de carotenóides totais (em $\mu\text{g}(\text{ml do extrato foliar})^{-1}$), A_{665} , A_{649} e A_{470} = valores de absorbância medidos nos comprimentos de onda de 665, 649 e 470 nm. O conteúdo destes pigmentos fotossintéticos foi determinado com base no peso seco (PS) das amostras e expresso em $\mu\text{g g}^{-1}$ considerando o volume de etanol utilizado na extração de acordo com as fórmulas (5), (6) e (7):

$$C_a \text{ em } \mu\text{g g}^{-1} = (C_a \text{ em } \mu\text{g ml}^{-1}).\text{PS}^{-1} \quad (5)$$

$$C_b \text{ em } \mu\text{g g}^{-1} = (C_b \text{ em } \mu\text{g ml}^{-1}).\text{PS}^{-1} \quad (6)$$

$$C_{x+c} \text{ em } \mu\text{g g}^{-1} = (C_{x+c} \text{ em } \mu\text{g ml}^{-1}).\text{PS}^{-1} \quad (7)$$

2.2.1.5.4 Microscopia eletrônica de varredura

As amostras foliares foram seccionadas em porções entre 2 e 4 milímetros e pré-fixadas em solução de glutaraldeído e paraformaldeído. A seguir, o processamento das amostras consistiu na pós-fixação das amostras em solução de OsO_4 a 1%, tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2, de acordo com Kitajima e Leite (1999). Após a fixação, as amostras foram desidratadas em uma série de soluções de etanol com concentrações crescentes de 30, 50, 70, 90 e 100%, e posteriormente secas em um aparelho de secagem ao ponto crítico. A seguir, as amostras foram coladas em contato com fita adesiva sobre “stubs” e cobertas com uma fita na camada de ouro em aparelho de cobertura de ouro. Posteriormente as amostras foram encaminhadas para análise em microscópio eletrônico de varredura (LEO), o qual foi ajustado para uma voltagem de aceleração de 10 KV. As imagens foram capturadas e digitalizadas.

2.2.1.6 Amostragem experimental

Para cada medida experimental, foram realizadas três repetições, correspondentes à folíolos (no caso de *Anemia flexuosa*) ou regiões do limbo (no caso de *Pleurostima purpurea*)

posicionados na porção média ao longo do maior comprimento de folhas adultas de indivíduos diferentes. Exclusivamente no caso de *Pleurostima purpurea*, foram realizadas seis repetições por tratamento para as medidas de trocas gasosas e fluorescência da clorofila. Presilhas com sombreamento, sem sombreamento, e escurecidas pelo envolvimento com folha de alumínio (somente no caso de *Anemia flexuosa*) foram instaladas em três diferentes folhas de um mesmo indivíduo em ambas as espécies. Foram utilizados sempre os mesmos folíolos ou regiões foliares com as presilhas instaladas para as medidas de fluorescência da clorofila e trocas gasosas durante todo o processo de desidratação e reidratação, além de terem sido realizadas algumas medidas pontuais em folhas não impedidas de enrolar. A determinação do CRA foliar e da concentração de pigmentos fotossintéticos foi realizada em folhas diferentes das utilizadas para as medidas de trocas gasosas e fluorescência, não impedidas de enrolar (sem presilhas), expostas à radiação disponível da câmara de crescimento ($400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). No caso de *Anemia flexuosa*, isto foi necessário devido ao número insuficiente de folhas para o uso dos mesmos folíolos em que se realizaram medidas fotossintéticas para as análises destrutivas. No caso de *Pleurostima purpurea*, a limitação no número de presilhas instaladas em folhas em cada vaso foi estabelecida pela área disponível para a ocupação dos potes no interior da câmara de crescimento, uma vez que para esta espécie, o posicionamento horizontal de suas folhas com a instalação das presilhas visando a exposição desejada da superfície foliar à fonte de luz, adicionou 20 cm no raio do diâmetro ocupado pela planta na área do interior da câmara, aproximadamente.

2.2.1.7 Forma de análise dos resultados

Os dados obtidos foram descritos por meio dos valores médios e do desvio padrão (d.p) das variáveis associadas com a capacidade de suspensão e recuperação da atividade fisiológica foliar. A análise dos resultados foi realizada a partir das tendências de comportamento das variáveis durante as fases experimentais.

2.2.2 Experimento 2: Indução da desidratação e dessecação de plantas intactas de *Oryza sativa* sob condições ambientais variáveis de casa de vegetação

No experimento 2 foram realizadas medidas para a avaliação do efeito da deficiência hídrica sobre variáveis indicadoras da capacidade fotossintética de plantas intactas de *Oryza sativa*. Para isto, foram monitorados o conteúdo relativo de água e de pigmentos fotossintéticos, as trocas gasosas de CO₂ e H₂O, a eficiência quântica fotossintética e a dissipação de calor nos tecidos foliares durante as fases de desidratação e dessecação.

2.2.2.1 Material vegetal

Para o estudo da espécie homehídrica *Oryza sativa* (IAC 202), cultivar de arrozeiro de terras altas, foram produzidos indivíduos a partir da germinação de sementes dispostas a 2 cm de profundidade, aproximadamente, em potes de 5 l contendo uma mistura de solo local com areia e composto orgânico. Estes componentes foram previamente peneirados antes de misturados na seguinte proporção: 2 partes de solo do tipo latossolo vermelho, ½ de esterco bovino curtido, 1 parte de areia grossa. As plântulas produzidas foram cultivadas até a idade de 60 dias com saturação diária do solo de cultivo após o entardecer.

2.2.2.2 Condições e fases experimentais

Este experimento foi realizado no interior de casa de vegetação, sob condições variáveis de temperatura do ar, umidade atmosférica relativa e DFFF de 25-33°C, 40-65% e 800-1600 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, respectivamente.

O experimento foi dividido temporalmente nas fases de desidratação e dessecação, de acordo com a definição apresentada no experimento 1. As fases foram oportunamente indicadas nos gráficos apresentados nos resultados seguindo a mesma terminologia utilizada no experimento 1. Neste experimento não houve as fases de pré-aclimatação e reidratação, somente de desidratação (F2) e dessecação (F3). A separação das fases foi indicada nos gráficos por meio de uma linha vertical tracejada.

2.2.2.3 Indução da desidratação das plantas

O experimento foi iniciado com a suspensão da irrigação para o grupo experimental e mantida a irrigação diária para o grupo controle quando as plantas apresentavam 60 dias de idade.

2.2.2.4 Metodologia de avaliação da desidratação e dessecação das plantas

2.2.2.4.1 Trocas gasosas, fluorescência da clorofila, conteúdo relativo de água foliar e do substrato, conteúdo de pigmentos fotossintéticos, e microscopia eletrônica de varredura

Durante as fases de desidratação e dessecação impostas pela suspensão da irrigação, foram realizadas as mesmas avaliações descritas no experimento 1 com relação às trocas gasosas foliares de CO₂ e H₂O, fluorescência da clorofila, conteúdo relativo de água foliar e do substrato, e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Estas avaliações foram realizadas sempre em horário de pré-amanhecer para a obtenção de medidas em amostras acondicionadas ao escuro entre 05:30 e 06:00 horas da manhã, e no horário entre as 09:00 e 11:00 horas da manhã para as medidas fotossintéticas em condição de equilíbrio dinâmico. Esta condição foi obtida plenamente após duas horas de exposição à radiação solar incidente, tendo sido mantida para a avaliação das trocas gasosas e demais medidas de fluorescência associadas às amostras pré-acondicionadas à luz com o ajuste de uma DFFF de 800 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ no interior da câmara do IRGA previamente ao posicionamento foliar.

As medidas de avaliação descritas foram realizadas em alguns dias intercalados até a desidratação completa do substrato de cultivo e dos tecidos foliares ao longo de 18 dias. Com o progresso da deficiência hídrica, as folhas apresentaram um padrão de enrolamento ao longo de sua nervura principal de forma que sua superfície superior tornou-se protegida da luz. Em consequência disto, as folhas foram desenroladas manualmente na região de sua porção mediana para que pudessem ser amostradas na câmara de análise fotossintética do IRGA com sua superfície superior voltada para a fonte luminosa, tendo isto sido realizado somente no momento imediatamente anterior à realização das medidas fotossintéticas. Por se tratar de uma espécie homeohídrica, não foram realizadas medidas de recuperação após a dessecação das plantas de *Oryza sativa*, somente durante a fase de desidratação pelo propósito de comparação com as demais.

2.2.2.5 Amostragem experimental

As avaliações foram sempre realizadas em 3 repetições, cada uma delas representada por uma folha madura de 3 plantas diferentes. As avaliações do CRA foliar e do conteúdo de pigmentos fotossintéticos foram realizadas a partir das mesmas porções foliares utilizadas para as medidas de trocas gasosas e fluorescência da clorofila. As folhas escolhidas na parte aérea de cada planta para as avaliações mencionadas foram sempre as primeiras folhas adultas e com face superior orientada para a direção norte, com uma inclinação média capaz de ficar exposta perpendicularmente à radiação solar direta nas primeiras horas do amanhecer. Para tanto, os vasos foram mantidos na mesma posição durante todo o desenvolvimento das plantas e condução do experimento. Em cada dia de realização de medidas experimentais, os vasos numerados foram previamente sorteados para compor as repetições amostrais dentro de um grupo de 6 vasos para o grupo controle e 9 para o grupo submetido à deficiência hídrica. Após o sorteio, os números sorteados foram repostos em uma urna para os sorteios seguintes. Todas as medidas foram realizadas na superfície superior da primeira folha adulta da planta, em sua porção média em relação ao comprimento.

2.2.2.6 Forma de análise dos resultados

A análise dos resultados foi realizada conforme descrito no experimento 1.

2.2.3 Experimento 3: Indução da desidratação e dessecação de folhas destacadas de plantas túrgidas de *Pleurostima purpurea*, *Vellozia candida*, *Anemia flexuosa* e *Oryza sativa*.

No experimento 3 foi realizado o monitoramento contínuo das trocas gasosas foliares das espécies *Anemia flexuosa*, *Pleurostima purpurea*, *Vellozia candida* e *Oryza sativa*, desde sua condição intacta e saturada de água até a completa desidratação induzida pelo destacamento.

2.2.3.1 Material vegetal

As plantas utilizadas neste experimento foram as mesmas do experimento 1 e 2. A espécie *Vellozia candida* foi cultivada a partir de sementes, seguindo-se o mesmo procedimento descrito para *Pleurostima purpurea* no experimento 1.

2.2.3.2 Condições e fases experimentais

Este experimento foi realizado no interior do laboratório, sob condições de temperatura do ar e umidade atmosférica relativa de 25-28°C e 55-65%, respectivamente. A condição luminosa foi imposta por meio da fonte de luz artificial do IRGA sobre a área foliar amostrada no interior da câmara do equipamento.

O experimento foi dividido em duas fases, uma inicial em que a planta permanecia intacta e uma seguinte iniciada após o destacamento da folha. A separação das fases foi indicada nos gráficos por meio de uma linha vertical tracejada.

2.2.3.3 Indução da desidratação

A desidratação foliar iniciou naturalmente após o destacamento com a perda de água para o ar. O destacamento foi realizado com um corte transversal da folha na região próxima de sua base com uma lâmina de aço inox nova (Gillette). Em *Pleurostima purpurea*, *Vellozia candida* e *Oryza sativa*, o corte foi realizado no mesófilo e, em *Anemia flexuosa*, na base do pecíolo.

2.2.3.4 Metodologia de avaliação da desidratação e dessecação foliar

2.2.3.4.1 Trocas gasosas

Durante a fase de desidratação imposta a partir do destacamento da folha, foi realizado o monitoramento contínuo da condutância estomática (gs), da transpiração (E) e da assimilação de

CO₂ (A), com registro automatizado dos dados a cada minuto até a máxima desidratação do tecido em que não se detectou mais trocas gasosas. Durante este monitoramento, foi realizada, inicialmente, uma curva de luz na folha ainda intacta (exceto em *Oryza sativa*). Em seguida, foi estabelecida uma densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF) contínua de 800 μmol de fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ por uma hora e meia para estabelecimento da condição de equilíbrio dinâmico fotossintético (no caso de *Vellozia candida* a luz contínua foi com uma DFFF de 1600 μmol de fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$). No meio deste período de tempo sob luz contínua, foi realizado o destacamento foliar. Posteriormente, foi realizada nova curva de luz, repetindo-se sucessivamente este ciclo de luz contínua e curva de luz durante todo o período de monitoramento sem promover a abertura da câmara de amostragem do equipamento ou o deslocamento foliar.

2.2.3.5 Amostragem experimental

O monitoramento contínuo das trocas gasosas foliares foi sempre iniciado no período da manhã, no horário entre as 09:00 e 11:00 horas, a partir de plantas mantidas sob cultivo no interior da casa de vegetação que eram levadas para o interior do laboratório. O monitoramento das trocas gasosas durante a desidratação foi realizado em duas ou três folhas de indivíduos diferentes por espécie. As medidas foram realizadas sempre na porção mediana ao longo do maior comprimento de folhas adultas.

2.2.3.6 Forma de análise dos resultados

Os dados absolutos de trocas gasosas foliares obtidos durante o monitoramento contínuo foram expressos graficamente em função do tempo. A análise dos resultados foi realizada a partir do formato das curvas das séries temporais obtidas. Os gráficos apresentados são referentes ao processo de desidratação contínua de uma folha, tendo sido apresentadas as curvas que melhor representaram o padrão observado dentre as repetições realizadas.

2.3 Resultados

2.3.1 *Pleurostima purpurea*

2.3.1.1 Superfícies foliares

Durante a desidratação, as folhas paralelinérvias de *Pleurostima purpurea* apresentaram um dobramento lateral simétrico das duas partes do limbo ao longo do eixo da nervura principal, de maneira a esconder a superfície inferior. Durante este processo as folhas perderam a coloração esverdeada tornando-se homogeneamente amareladas. A coloração amarelada das folhas se manteve durante toda a fase dessecação (figura 2).

Após a reidratação, as folhas re-expandiram a área foliar expondo as superfícies amareladas (figura 2), somente em seguida iniciaram a recuperação de uma coloração esverdeada. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de folhas de *Pleurostima purpurea* evidenciaram uma epiderme multiestratificada e uma distribuição estomática somente na superfície inferior (figura 3 b).

Após a recuperação da cor verde, foi observada também, visualmente, uma mudança de refletância das superfícies foliares de *Pleurostima purpurea*. Pela imagem de MEV foi observado que esta mudança de refletância foi causada pelo desprendimento natural de uma camada de cera da superfície superior de *Pleurostima purpurea* após o ciclo completo de desidratação – reidratação (figura 3 a).

Figura 2 – Aspecto de *Pleurostima purpurea* durante as fases de desidratação e reidratação

Figura 3 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura de *Pleurostima purpurea*

2.3.1.2 Conteúdo relativo de água

O conteúdo relativo de água (CRA) do substrato de cultivo de *Pleurostima purpurea* diminuiu prontamente após a suspensão da irrigação. Os tecidos foliares da planta intacta resistiram à perda de água mantendo seu CRA acima de 70% por 15 dias, quando o CRA do substrato era menor que 25% (figura 4 a). Em três dias adicionais, correspondente ao 18º dia de desidratação, o CRA foliar diminuiu para 16% (figura 4 a). A manutenção da condição de seca por mais 42 dias ocasionou na diminuição do CRA foliar de 16% para 6% (60º dia) (figura 4 b).

Posteriormente, houve a recuperação do turgor foliar com a máxima recuperação do conteúdo relativo de água dentro de 12 horas de reidratação do substrato de cultivo (figura 4 b).

Figura 4 - Conteúdo relativo de água (CRA, %) do sistema substrato-planta (○) e foliar (●) durante os processos foliares de desidratação (F2), dessecação (F3) e reidratação (F4) de *Pleurostima purpurea*. Barras verticais representam o desvio padrão da média (n=3)

2.3.1.3 Conteúdo de pigmentos fotossintéticos

As folhas de *Pleurostima purpurea* permaneceram verdes mantendo o conteúdo de clorofilas a (C_a) (figura 5 a) e b (C_b) (figura 5 c) estável até o 15º dia de desidratação, quando as folhas já indicavam características de murcha iniciando o enrolamento do limbo ainda verdes. Em seguida, tornaram-se rapidamente amarelas com a perda total do conteúdo de clorofilas até o 18º dia, quando as plantas apresentavam-se aparentemente em anabiose. Durante este processo de desidratação, o conteúdo de carotenóides totais (C_{x+c}) (figura 5 e) aumentou mais de sete vezes.

Após 40 horas de reidratação, houve uma recuperação de 68 e 60% do conteúdo de C_a (figura 5 b) e C_b (figura 5 d), respectivamente, em relação ao primeiro dia experimental. Após 9 dias de reidratação, C_a foi completamente recuperado, enquanto a recuperação de C_b foi de aproximadamente 89%. O C_{x+c} , por sua vez, diminuiu lentamente após a reidratação, conservando-se quase três vezes maior em relação ao primeiro dia experimental mesmo após 9 dias de reidratação (figura 5 f). Durante este processo de recuperação do turgor, as folhas expandiram sua superfície mantendo a coloração amarelada estabelecida no estado dessecado, somente posteriormente apresentaram a recuperação da cor verde com o aumento do conteúdo de clorofila.

Figura 5- (a,b) Conteúdo de clorofila a (C_a , $\mu\text{g g}^{-1}$), (c,d) clorofila b (C_b , $\mu\text{g g}^{-1}$), e (e,f) carotenóides totais (C_{x+c} , $\mu\text{g g}^{-1}$) em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação (F2), dessecação (F3) e reidratação (F4) de *Pleurostima purpurea*. As folhas foram desidratadas sob DFFF de $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e mantidas no estado dessecado na mesma condição de luz. Barras verticais representam o desvio padrão da média (n=3)

2.3.1.4 Trocas gasosas durante a desidratação de folhas destacadas de *Pleurostima purpurea* e *Vellozia candida*

Em um experimento independente, foram monitoradas continuamente as trocas gasosas de folhas intactas de *Pleurostima purpurea* e *Vellozia candida* sob variação de intensidade da luz (figura 6). Após a realização de uma curva de resposta fotossintética à luz, foi re-estabelecida a condição de luz constante (figura 6 g,h) e a folha foi destacada mantendo-se o monitoramento contínuo foliar das trocas gasosas. Imediatamente após o destacamento da folha foi observado um aumento da condutância estomática (gs) segundos antes de iniciar uma fase de diminuição intensa (figura 6 a,b). Após uma diminuição máxima, as folhas destacadas mantiveram os valores de gs próximos de zero por um período de aproximadamente 20 a 35 horas. Após esta fase de estabilização, foi observado um aumento transitório da condutância estomática nas folhas destacadas de *Pleurostima purpurea* e de *Vellozia candida*. Em ambas as espécies, o aumento transitório da condutância perdurou por menos de 10 horas, mas ocorreu anteriormente e com maior intensidade em *Vellozia candida*. O aumento transitório da condutância estomática esteve associado a um aumento da transpiração (E) (figura 6 c,d) e a um balanço negativo de CO₂ (figura 6 e,f) durante o processo de desidratação das folhas destacadas de *Pleurostima purpurea* e *Vellozia candida*.

Figura 6 - Monitoramento cont\u00ednuo da (a,b) condut\u00e2ncia estom\u00e1tica (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), (c,d) transpira\u00e7\u00e3o (E , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e (e,f) assimila\u00e7\u00e3o de CO_2 (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$) em fun\u00e7\u00e3o da (g,h) radia\u00e7\u00e3o fotossinteticamente ativa (RFA, $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) de uma folha de *Pleurostima purpurea* (a,c,e,g) e de *Vellozia candida* (b,d,f,h) desde o estado intacto at\u00e9 a completa desidrata\u00e7\u00e3o ap\u00f3s seu destacamento da planta. A linha tracejada vertical indica o momento do destacamento foliar

2.3.1.5 Trocas gasosas em plantas intactas de *Pleurostima purpurea*

Folhas de plantas intactas de *Pleurostima purpurea* foram pré-aclimatadas a duas diferentes densidades de fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF), 100 e 400 $\mu\text{mol fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, e submetidas a um ciclo completo de desidratação – reidratação na mesma condição luminosa (para reconhecimento dos tratamentos realizados e das terminologias empregadas veja a tabela 1, seção 2.2.1.2).

Sob condição de disponibilidade de água no substrato, plantas envasadas de *Pleurostima purpurea* apresentaram uma assimilação líquida média de CO_2 (A) de 8,7 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ sob densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF) constante de 400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Este valor de A foi, aproximadamente, seis vezes maior que o obtido sob DFFF de 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (figura 7 a). A menor assimilação sob menor DFFF esteve associada a uma baixa condutância estomática e transpiração (figura 7 c,e).

Aos 9 dias de suspensão da irrigação, houve uma diminuição da assimilação média de CO_2 em torno de 32% nas folhas submetidas à DFFF de 400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, e de 53% nas folhas sob DFFF de 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (figura 7 a). Esta diminuição da assimilação de CO_2 ocorreu em folhas com valor médio de CRA alto (98%) comparado ao do substrato (42%) (figura 4 a).

No 11º dia experimental o balanço de CO_2 se tornou negativo quando o CRA foliar era de 94% e do substrato de 29%. A partir daí, as trocas gasosas foliares tendeu a zero, e no 18º dia de desidratação não foi detectada mais trocas gasosas (figura 7 a), sob conteúdo relativo de água foliar de 16% (figura 4 a).

Após 42 dias no estado dessecado, foi reiniciada a irrigação diária do substrato. Após 12 horas de reidratação sob luz contínua, correspondente ao 61º dia experimental, foi detectado o estabelecimento de um balanço negativo de CO_2 nas folhas dos diferentes tratamentos (figura 7 b) sob valores de condutância estomática (figura 7 d) e transpiração (figura 7 f) próximos de zero. Dentro de 24 horas de reidratação (entre o 61º e o 62º dia experimental) o balanço de CO_2 se tornou positivo e esteve associado a um aumento parcial da condutância estomática e da transpiração (figura 7 b, d, f). A recuperação completa da capacidade de assimilação de CO_2 , comparativamente às condições iniciais, foi observada 9 dias após a reidratação sob um valor médio maior de condutância estomática (figura 7 a, b).

Figura 7- (a,b) Assimilação de CO₂ (A, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), (c,d) condutância estomática (gs, $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), e (e,f) transpiração (E, $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação (F2), dessecação (F3) e reidratação (F4) de *Pleurostima purpurea* sob DFFF de 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($\circ$) e 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Δ) durante o período luminoso fotoperiódico. Barras verticais representam o desvio padrão da média (n=6)

2.3.1.6 Fluorescência da clorofila de amostras acondicionadas à luz e eficiência quântica efetiva dos fotossistemas II

A fluorescência em estado de equilíbrio dinâmico na luz (F_s) foi maior durante os primeiros dias experimentais no tratamento sob maior DFFF (figura 8 a). Após o 7º dia de desidratação, a fluorescência em equilíbrio dinâmico (F_s), a máxima (F_m') e a mínima (F_o') diminuíram no tratamento sob maior DFFF ($400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (figura 8 a, c, e). Em seguida, F_s , F_m' e F_o' apresentaram uma fase de maior estabilidade de valores entre o 11º e o 13º dia. A partir do 15º dia de desidratação diminuíram para valores próximos de zero acompanhando a perda total de clorofila. No tratamento sob menor DFFF ($100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), F_s , F_m' e F_o' apresentaram o mesmo padrão de diminuição em fases embora de forma atrasada em relação ao observado para o tratamento sob maior DFFF durante a desidratação.

A eficiência quântica efetiva dos fotossistemas II, estimada pelo cálculo de F_v'/F_m' (figura 9 a) e ΦPSII (figura 9 c) de amostras pré-acondicionadas à luz, diminuiu durante a desidratação seguindo o mesmo padrão de fases observado para os parâmetros de fluorescência (F_s , F_m' , F_o'). Este padrão de diminuição dos valores de ΦPSII , F_v'/F_m' e ETR foi caracterizado por uma fase de diminuição transitória entre o 7º e o 9º dia, assim como observado para F_s , F_m' e F_o' . Esta diminuição transitória da eficiência quântica efetiva esteve associada ao início da diminuição da assimilação de CO_2 . Em seguida, a eficiência quântica apresentou-se estável entre o 13º e o 15º dia, após o qual diminuiu para valores próximos de zero. A diminuição da eficiência quântica fotossintética foi acompanhada da diminuição da taxa de transporte de elétrons (ETR) (figura 9 e). A eficiência quântica calculada pelas duas formas mencionadas (ΦPSII e F_v'/F_m') mostrou-se sempre menor para os tratamentos sob maior DFFF ($400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Durante a desidratação, a diferença entre os tratamentos luminosos apresentou-se de forma mais pronunciada pela análise de ΦPSII do que F_v'/F_m' .

Após a reidratação, houve um rápido aumento nos valores de F_s , F_m' e F_o' dentro das primeiras 24 horas (figura 8 b,d,f). Em seguida, houve uma continuidade do aumento de F_s , F_m' e F_o' a uma taxa menor de maneira que, ao final de 9 dias de reidratação, assumiram valores médios maiores do que os observados nas condições iniciais do experimento. Assim como observado para os parâmetros de fluorescência na luz (F_s , F_m' e F_o'), a maior taxa de aumento de ΦPSII , F_v'/F_m' e ETR em função do tempo após a reidratação ocorreu dentro das primeiras 24 horas (figura 9 b,d,f). Os valores médios de fluorescência, eficiência quântica e taxa transporte

de elétrons foram, em geral, maiores após 9 dias de reidratação do que os observados nas condições iniciais do experimento nos dois tratamentos de luz.

Figura 8- (a,b) Fluorescência em estado de equilíbrio dinâmico (F_s), (c,d) fluorescência máxima (F_m'), e (e,f) fluorescência basal (F_o') de amostras acondicionadas à luz em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação (F2), dessecação (F3) e reidratação (F4) de *Pleurostima purpurea* sob DFFF de $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($\circ$) e $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Δ) durante o período luminoso fotoperiódico. Barras verticais representam o desvio padrão da média (n=6)

Figura 9 - (a,b) Eficiência quântica efetiva do fotossistema II com envolvimento de F_o' (F_v'/F_m'), (c,d) eficiência quântica efetiva do fotossistema II sem envolvimento de F_o' (Φ_{PSII}), e (e,f) taxa de transporte de elétrons (ETR) de amostras acondicionadas à luz em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação (F2), dessecação (F3) e reidratação (F4) de *Pleurostima purpurea* sob DFFF de $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($\circ$) e $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Δ) durante o período luminoso fotoperiódico. Barras verticais representam o desvio padrão da média ($n=6$)

2.3.1.7 Coeficientes de extinção fotoquímica e não-fotoquímica da fluorescência

O coeficiente de extinção fotoquímica da fluorescência (qP), que indica a proporção de centros de reação abertos de fotossistema II (figura 10 a), diminuiu de forma semelhante à observada para Φ_{PSII} durante a desidratação. Houve uma diminuição inicial de qP para um valor temporariamente estável antes de ser alterado definitivamente pela dessecação do tecido foliar. No estado dessecado, a perda de clorofila impede que o cálculo de qP apresente significado fisiológico, resultando no aumento acentuado dos valores médios e do desvio padrão que não corresponde a um funcionamento fotoquímico.

A dissipação da energia na forma de calor foi monitorada por meio dos coeficientes de extinção não-fotoquímica qN (figura 10 c) e NPQ (figura 10 e). Estes coeficientes aumentaram transitoriamente após o 9º dia de desidratação, tornando-se estáveis entre o 11º e o 15º dia. Esta fase de estabilidade dos valores de qN e NPQ foi coincidente com a fase de estabilidade dos valores de eficiência quântica e extinção fotoquímica observada durante a desidratação. Sob o estado dessecado, em função da perda de clorofila, os valores obtidos para qN também apresentaram uma variação além da escala normal observada durante os estados de maior hidratação, não apresentando significado fisiológico, sendo consequência da perda de clorofila. Isto não ocorreu com NPQ que se aproximou de zero sob os valores mínimos de CRA alcançados após a completa desidratação.

Após 9 dias de reidratação, o coeficiente de extinção fotoquímica da fluorescência (qP) assumiu valores médios semelhantes aos obtidos nas condições iniciais (figura 10 b), enquanto os coeficientes de extinção não-fotoquímica da fluorescência (qN e NPQ) (figura 10 c, d) tornaram-se menores comparados às condições iniciais nos diferentes tratamentos luminosos (DFFF de 400 e 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

Figura 10 - (a,b) Coeficiente de extinção fotoquímica (qP) e coeficientes de extinção não-fotoquímica da fluorescência qN (c,d) e NPQ (e,f) em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação (F2), dessecação (F3) e reidratação (F4) de *Pleurostima purpurea* sob DFFF de $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($\circ$) e $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Δ) durante o período luminoso fotoperiódico. Barras verticais representam o desvio padrão da média (n=6)

2.3.1.8 Fluorescência da clorofila de amostras acondicionadas ao escuro e eficiência quântica potencial dos fotossistemas II

Os valores médios de fluorescência basal (F_o) (figura 11 a) e máxima (F_m) (figura 11 c) da clorofila mantiveram-se estáveis até o 11º dia experimental. No entanto, F_o foi maior e F_m menor no tratamento de maior densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF de $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). A partir do 11º dia, quando a assimilação de CO_2 se tornou negativa (figura 7 a) e o CRA foliar começou a diminuir (figura 4 a), houve um aumento sutil de F_o no tratamento sob maior densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (figura 11 a) associado a uma clara diminuição de F_m nos dois tratamentos (DFFF 400 e $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (figura 11 c). As alterações observadas na fluorescência basal e máxima resultaram em uma diminuição inicialmente lenta da eficiência quântica potencial dos fotossistemas II (avaliada pela relação $F_m/F_o = F_v/F_m$) entre o 11º e o 15º dia (figura 11 e), mas em maior intensidade no tratamenteo sob DFFF de $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Em seguida, houve uma diminuição acentuada de F_v/F_m para zero até o 18º dia, quando a fluorescência basal e máxima foi extinta com a perda da clorofila (figura 5 b, d).

Após a reidratação, a fluorescência basal (F_o) aumentou, inicialmente, de forma rápida e em seguida tendeu a uma menor intensidade de aumento (figura 11 b), acompanhando o padrão de recuperação do conteúdo de clorofila (figura 5 b, d). A recuperação da fluorescência máxima após a reidratação foi gradual (figura 11 d), de forma simétrica à diminuição observada durante a fase de desidratação (figura 11 c). Durante a recuperação de reidratação, F_o não diferiu entre os tratamentos (figura 11 b) enquanto a fluorescência máxima (F_m) continuou sendo menor para o tratamento sob maior DFFF ($400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (figura 11 d). Apesar do menor valor de F_m obtido no tratamento sob maior DFFF, não houve diferença significativa da capacidade de recuperação da eficiência quântica potencial dos fotossistemas II (F_v/F_m) entre os tratamentos após a reidratação (Figura 11 f).

Figura 11 - (a,b) Fluorescência basal (F_o), (c,d) fluorescência máxima (F_m), e (e,f) eficiência quântica potencial do fotossistema II (F_v/F_m) de amostras pré-acondicionadas ao escuro em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação (F2), dessecação (F3) e reidratação (F4) de *Pleurostima purpurea* sob DFFF de 400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($\circ$) e 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Δ) durante o período luminoso fotoperiódico. Barras verticais representam o desvio padrão da média ($n=6$)

2.3.2 *Anemia flexuosa*

2.3.2.1 Superfícies foliares

No estado túrgido, as folhas penadas de *Anemia flexuosa* mantiveram a superfície exposta de forma plana. Durante a desidratação, os folíolos enrolaram-se diminuindo ambas as superfícies expostas à radiação externa. O enrolamento ocorreu a partir das extremidades dos folíolos de forma a esconder a superfície inferior (figura 12). Após a desidratação completa, as folhas mantiveram uma coloração esverdeada (figura 12), evidenciando a manutenção do conteúdo de clorofila. No entanto, apresentaram mudanças de textura e diminuição de sua área de exposição superficial.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de folhas de *Anemia flexuosa* evidenciaram uma distribuição estomática somente na superfície inferior, além de uma epiderme uniestratificada com tricomas glandulares em ambas as superfícies (figura 13). Os estômatos de *Anemia flexuosa* mostraram-se maiores do que em *Pleurostima purpurea* e *Oryza sativa*.

Figura 12 – Aspecto de *Anemia flexuosa* durante as fases de desidratação e reidratação

Figura 13 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura de *Anemia flexuosa*

2.3.2.2 Conteúdo relativo de água

Com a desidratação do substrato, as folhas de *Anemia flexuosa* resistiram à perda de água mantendo o conteúdo relativo de água (CRA) acima de 90% por três dias (figura 14 a). A partir deste período, houve uma maior velocidade de desidratação foliar que levou a uma diminuição do CRA foliar para 11,7% até o 6º dia de desidratação (figura 14 a).

Após 12 horas de reidratação, as folhas de *Anemia flexuosa* recuperaram o turgor estabelecendo um CRA foliar em torno de 80% (figura 14 b). Neste processo de reidratação, os folíolos se desenrolaram re-expandindo sua área e expondo o mesofilo clorofilado (figura 12).

Figura 14 - Conteúdo relativo de água (CRA, %) do sistema substrato-planta (o) e foliar (●) em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação (F2), dessecação (F3) e reidratação (F4) de *Anemia flexuosa*. As amostras foram colhidas de folhas desimpedidas de enrolar sob DFFF de $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, mantidas desseccadas por 48 horas e posteriormente reidratadas nas mesmas condições. Barras verticais representam o desvio padrão da média (n=3)

2.3.2.3 Conteúdo de pigmentos fotossintéticos

O conteúdo de pigmentos fotossintéticos (figura 15) foi avaliado somente em amostras que se enrolaram naturalmente sob DFFF de $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ no período luminoso fotoperiódico durante todas as fases experimentais. O conteúdo de clorofilas a (C_a) e b (C_b) manteve-se estável até o final da fase de desidratação (figura 15 a, b). Após a reidratação, houve uma diminuição de 38% em C_a e de 36,7% em C_b .

O conteúdo de carotenóides totais (C_{x+c}) aumentou 2,3 vezes até o final da desidratação, e diminuiu para valores próximos dos obtidos nas condições iniciais após a reidratação (figura 15 c).

Figura 15 - (a) Conteúdo de clorofila a (C_a , μgg^{-1}), (b) clorofila b (C_b , μgg^{-1}), e (c) carotenóides totais (C_{x+c} , μgg^{-1}) em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação (F2), dessecação (F3) e reidratação (F4) de *Anemia flexuosa*. As amostras foram colhidas de folhas desimpedidas de enrolar sob DFFF de $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, mantidas desseccadas por 48 horas e posteriormente reidratadas nas mesmas condições. Barras verticais representam o desvio padrão da média ($n=3$)

2.3.2.4 Trocas gasosas durante a desidratação de folhas destacadas de *Anemia flexuosa*

Em um experimento independente, foram monitoradas continuamente as trocas gasosas de uma folha inicialmente intacta e posteriormente destacada de *Anemia flexuosa* sob variação de intensidade da luz, assim como realizado com *Pleurostima purpurea* e *Vellozia candida*. Após o destacamento da folha sob luz contínua foi observada uma diminuição intensa da condutância estomática (gs) (figura 16 a). No entanto, em contraste com o observado em *Pleurostima purpurea* e *Vellozia candida*, a diminuição de gs em *Anemia flexuosa* ocorreu em duas fases lineares, cuja transição foi caracterizada por uma mudança clara da taxa de diminuição para um valor constante menor (menor inclinação da curva) (figura 16 a). A primeira fase ocorreu dentro de aproximadamente uma hora após o destacamento foliar, e diminuiu gs de aproximadamente 0,09 para 0,03 mol H₂O m⁻²s⁻¹. A segunda fase diminuiu gs para zero dentro das 12 horas seguintes. Este padrão linear de diminuição sob taxa constante da condutância estomática ocorreu da mesma forma com a transpiração (E) (figura 16 b). A assimilação de CO₂ (A), no entanto, aproximou-se de zero logo após a fase de maior diminuição da condutância, mas o balanço negativo de carbono parece ter ocorrido somente de cinco a dez horas depois, aproximadamente (figura 16 c).

Figura 16 - Monitoramento cont\u00ednuo da (a) condut\u00e2ncia estom\u00e1tica (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$), (b) transpira\u00e7\u00e3o (E , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e (c) assimila\u00e7\u00e3o de CO_2 (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em fun\u00e7\u00e3o da (d) radia\u00e7\u00e3o fotossinteticamente ativa (RFA, $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de uma folha de *Anemia flexuosa* desde o estado intacto at\u00e9 a completa desidrata\u00e7\u00e3o ap\u00f3s seu destacamento da planta. A linha tracejada vertical indica o momento do destacamento foliar

2.3.2.5 Trocas gasosas em plantas intactas de *Anemia flexuosa*

Folhas de *Anemia flexuosa* receberam diferentes tratamentos luminosos durante as fases de desidratação e dessecação. Os tratamentos luminosos consistiram na ausência ou presença de luz de duas diferentes intensidades durante as fases de desidratação e de dessecação (detalhes na tabela 1, seção 2.2.1.2).

No estado hidratado, *Anemia flexuosa* apresentou uma assimilação líquida média de CO₂ (A) de 6,75 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ sob DFFF de 400 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Sob DFFF de 100 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ a assimilação média de CO₂ foi de 3,46 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$, aproximadamente 50% menor (figura 17 a). No entanto, a assimilação de *Anemia flexuosa* sob DFFF de 100 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ foi maior do que a obtida em *Pleurostima purpurea* na mesma condição de luz (figura 7 a).

Durante a desidratação, a assimilação média de CO₂ (A) no 5º dia experimental foi diminuída em 71 e 51% nos tratamentos que receberam maior DFFF durante a fase de desidratação (400-400 e 400-0, figura 17 a e b, respectivamente), e em 87 e 77% nos de menor DFFF (100-100 e 100-0, figura 17 a e b, respectivamente), quando o CRA foliar médio era de 64% (figura 14 a). A diminuição de A ocorreu associada à uma diminuição da condutância estomática e da transpiração (figura 17 c, d, e, f).

As trocas gasosas do tratamento de desidratação e dessecação sob escuro contínuo (0-0) e do tratamento de desidratação sob DFFF de 0 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ associada à dessecação sob DFFF de 400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (0-400) foram avaliadas somente no 1º, 6º e 9º dia experimental, correspondentes ao estado inicial hidratado, após a desidratação, e após 21 horas de reidratação (figura 17 a, b). Os resultados para estes tratamentos mostraram uma incapacidade de recuperação do balanço positivo de carbono após a reidratação (figura 17 b). Para os tratamentos que receberam luz durante a reidratação, houve uma recuperação apenas parcial do balanço positivo de carbono, com baixas taxas de assimilação de CO₂ (A). Em relação aos valores iniciais, A foi de 30% para o tratamento 400-400, 16% para 100-100, 14% para 400-0 e 31% para 100-0 após a reidratação (figura 17 a,b).

Os valores de condutância estomática (gs) e transpiração (E) na fase de reidratação foram maiores do que os obtidos nas condições iniciais, (figura 17 c,d,e,f), mas não refletem propriedades fisiológicas das amostras. Estes valores foram obtidos pelo fato de que algumas

amostras apresentavam água livre sobre a superfície foliar que não foi totalmente eliminada para a realização das medidas. Isto foi necessário pois algumas folhas dentro dos diferentes tratamentos apresentaram dobramento acidental do pecíolo decorrente do manuseio durante o início do experimento. Após passarem pela fase de dessecação, estas folhas não foram capazes de manter a saturação hídrica após a reidratação com pulverização de água superficialmente, indicando rompimento dos vasos condutores. Desta forma, quando colocadas sob condição de ar seco do interior da câmara experimental, tendiam a entrar em equilíbrio com o ar mesmo estando o substrato saturado de água. Portanto, para não permitir a desidratação destas amostras durante a fase de reidratação, as folhas foram mantidas com água livre em sua superfície borrifada com pulverizador durante a exposição à luz. Estes acontecimentos tornaram os resultados de trocas gasosas durante a reidratação informativos somente para o balanço de CO₂ em *Anemia flexuosa*.

Figura 17 - (a,b) Assimilação de CO_2 (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), (c,d) condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), e (e,f) transpiração (E , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação (F2), dessecação (F3) e reidratação (F4) de *Anemia flexuosa*. Folhas desidratadas sob DFFF de 400 (○), 100 (△) ou 0 (◆) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e mantidas dessecadas nas mesmas condições; folhas desidratadas sob DFFF de 400 (□), 100 (◇) ou 0 (▲) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e mantidas dessecadas sob DFFF de 0 (□, ◇) ou 400 (▲) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. As denominações dos tratamentos nas legendas foram estabelecidas em função da DFFF utilizada nas fases de desidratação e de dessecação, respectivamente. Barras verticais representam o desvio padrão da média ($n=3$)

2.3.2.6 Fluorescência da clorofila de amostras acondicionadas à luz e eficiência quântica efetiva dos fotossistemas II

Os parâmetros de fluorescência das amostras acondicionadas à luz em condições de equilíbrio dinâmico (F_s), máxima (F_m') e mínima (F_o') são apresentados na figura 18. F_s foi maior e F_m' menor para os tratamentos de maior DFFF (400-400 e 400-0) sob condição de hidratação plena do início experimental. Com a desidratação, estes parâmetros diminuíram parcialmente nos tratamentos que receberam luz nesta fase (400-400, 400-0, 100-100, 100-0). Esta diminuição ocorreu em maior extensão para F_m' e em menor para F_o' . Nos tratamentos de desidratação no escuro, estes parâmetros foram avaliados somente no início do experimento e 21 horas após a reidratação (9º dia experimental).

Após a reidratação, F_s , F_m' e F_o' apresentaram uma recuperação apenas parcial em todos os tratamentos realizados e, com exceção de F_o' do tratamento 0-400, alcançaram valores menores do que os obtidos no primeiro dia experimental.

A eficiência quântica efetiva avaliada por Φ_{PSII} e F_v'/F_m' foi maior para os tratamentos de menor DFFF (100-100 e 100-0) nas condições iniciais, enquanto a taxa de transporte de elétrons (ETR) foi maior para os tratamentos de maior DFFF (figura 19). Durante a fase de desidratação, os valores de Φ_{PSII} , F_v'/F_m' e ETR diminuíram para zero nos tratamentos de desidratação na luz. Nos tratamentos de desidratação no escuro, Φ_{PSII} , F_v'/F_m' e ETR não foram avaliados durante a desidratação, somente no início do experimento e 21 horas após a reidratação (9º dia experimental), assim descrito para os parâmetros F_s , F_m' e F_o' .

Após a reidratação, a recuperação de Φ_{PSII} , F_v'/F_m' e ETR foi incompleta em todos os tratamentos, mas foi maior naqueles de desidratação na luz. Os tratamentos 0-0 e 0-400 apresentaram a menor capacidade de recuperação da eficiência quântica efetiva comparados aos tratamentos de desidratação na luz, assim como observado pela análise de assimilação de CO_2 .

Figura 18 - (a, b) Fluorescência em condições de equilíbrio dinâmico (F_s), (c, d) fluorescência máxima (F_m'), e (e, f) fluorescência mínima (F_o') de amostras pré-acondicionadas à luz em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação (F2), dessecação (F3) e reidratação (F4) de *Anemia flexuosa*. Folhas desidratadas sob DFFF de 400 ($\circ$), 100 (Δ) ou 0 ($\blacklozenge$) $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e mantidas desseccadas nas mesmas condições. Folhas desidratadas sob DFFF de 400 ($\square$), 100 ($\diamond$) ou 0 ($\blacktriangle$) $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e mantidas desseccadas sob DFFF de 0 ($\square, \diamond$) ou 400 ($\blacktriangle$) $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. As denominações dos tratamentos nas legendas foram estabelecidas em função da DFFF utilizada nas fases de desidratação e de dessecação, respectivamente. Barras verticais representam o desvio padrão da média ($n=3$)

Figura 19 - (a, b) Eficiência quântica efetiva do fotossistema II com envolvimento de F_o' (F_v'/F_m'), (c,d) eficiência quântica efetiva do fotossistema II sem envolvimento de F_o' (Φ_{PSII}), e (e,f) taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) de amostras acondicionadas à luz em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação (F2), dessecação (F3) e reidratação (F4) de *Anemia flexuosa*. Folhas desidratadas sob DFFF de 400 ($\circ$), 100 (Δ) ou 0 ($\blacklozenge$) $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e mantidas desseccadas nas mesmas condições. Folhas desidratadas sob DFFF de 400 ($\square$), 100 ($\diamond$) ou 0 ($\blacktriangle$) $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e mantidas desseccadas sob DFFF de 0 ($\square, \diamond$) ou 400 ($\blacktriangle$) $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. As denominações dos tratamentos nas legendas foram estabelecidas em função da DFFF utilizada nas fases de desidratação e de dessecação, respectivamente. Barras verticais representam o desvio padrão da média ($n=3$)

2.3.2.7 Coeficientes de extinção fotoquímica e não-fotoquímica da fluorescência

Sob disponibilidade de água, o coeficiente de extinção fotoquímica (qP) foi maior para os tratamentos sob menor DFFF (100-100 e 100-0), enquanto os coeficientes de extinção não fotoquímica qN e NPQ foram menores para estes tratamentos (figura 20).

Com a desidratação, qP diminuiu para um valor médio em torno de 0,2 nos diferentes tratamentos de desidratação na luz. Durante esta fase, os coeficientes de extinção não fotoquímica qN e NPQ aumentaram progressivamente, e mantiveram-se, em geral, maiores para os tratamentos sob maior DFFF.

Após a reidratação, os tratamentos desidratados na condição de luz, em geral, apresentaram a maior capacidade de recuperação de qP. Os tratamentos desidratados sob escuro contínuo apresentaram a menor capacidade de recuperação, principalmente quando as plantas foram expostas à luz no estado dessecado.

Os coeficientes de extinção não-fotoquímica da fluorescência qN e NPQ, em geral, não diminuíram após a reidratação para os valores obtidos na condição inicial.

Figura 20 – (a,b) Coeficiente de extinção fotoquímica (q_P) e coeficientes de extinção não-fotoquímica da fluorescência q_N (c,d) e NPQ (e,f) em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação (F2), dessecação (F3) e reidratação (F4) de *Anemia flexuosa*. Folhas desidratadas sob DFFF de 400 (○), 100 (△) ou 0 (◆) $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e mantidas desseccadas nas mesmas condições. Folhas desidratadas sob DFFF de 400 (□), 100 (◇) ou 0 (▲) $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e mantidas desseccadas sob DFFF de 0 (□,◇) ou 400 (▲) $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. As denominações dos tratamentos nas legendas foram estabelecidas em função da DFFF utilizada nas fases de desidratação e de dessecação, respectivamente. Barras verticais representam o desvio padrão da média ($n=3$)

2.3.2.8 Fluorescência da clorofila de amostras acondicionadas ao escuro e eficiência quântica potencial dos fotossistemas II

Os parâmetros de fluorescência da clorofila de amostras acondicionadas ao escuro, fluorescência mínima (F_o) e máxima (F_m), permaneceram estáveis por um período de tempo maior durante a fase de desidratação do que os parâmetros de trocas gasosas e de fluorescência da clorofila de amostras acondicionadas à luz (F_s , F_m' e F_o').

2.3.2.8.1 Tratamentos de desidratação na luz

Os tratamentos em que as plantas foram desidratadas na condição de luz (tratamentos 400-400, 400-0, 100-100, e 100-0, conforme tabela 1 da seção 2.2.1.2) apresentaram uma diminuição de F_o e de F_m ao final da fase de desidratação (figuras 21 e 22). F_o diminuiu em torno de 37 e 41% para os tratamentos 400-400 e 400-0, e 14 e 24% para os tratamentos 100-100 e 100-0, respectivamente. F_m , por sua vez, diminuiu em 87% para os tratamentos 400-400 e 400-0, e 82 e 83% para os tratamentos 100-100 e 100-0, respectivamente. Após 24 horas de reidratação das plantas submetidas a estes tratamentos, o F_o tendeu a aumentar estabilizando em valores semelhantes aos obtidos nas condições iniciais. F_m também apresentou um padrão de resposta semelhante ao de F_o durante a reidratação, mas os valores finais foram menores do que os obtidos nas condições iniciais (correspondentes à 52, 54, 39 e 42% dos valores iniciais para os tratamentos 400-400, 400-0, 100-100 e 100-0, respectivamente).

Em consequência da variação nos parâmetros F_o e F_m , os tratamentos que receberam luz durante a desidratação diminuíram a eficiência quântica potencial (F_v/F_m) para valores próximos de zero somente ao final desta fase (figuras 21 e 22). Após aproximadamente 5 dias de reidratação no escuro (correspondente ao 13º dia experimental) os tratamentos que receberam luz durante a desidratação, apresentaram uma recuperação incompleta de F_v/F_m , em relação às medidas do primeiro dia experimental, com valores médios máximos entre 0,55 e 0,6. Estes valores de F_v/F_m corresponderam a 74, 70, 56 e 69% de recuperação para os tratamentos 400-400, 400-0, 100-100 e 100-0, respectivamente, sem distinção significativa entre os mesmos considerando o desvio padrão das médias.

2.3.2.8.2 Tratamentos de desidratação no escuro

Nos tratamentos em que as plantas de *Anemia flexuosa* foram mantidas na condição de escuro durante a fase de desidratação (tratamentos 0-0 e 0-400) foi observada a manutenção da estabilidade ou o aumento da fluorescência mínima (Fo) durante a desidratação, diferente da resposta observada nos tratamentos de desidratação na luz (400-400, 400-0, 100-100, 100-0). No tratamento 0-0, a fluorescência mínima (Fo) permaneceu, em geral, estável durante a desidratação (figura 21 a), com um aumento sutil (3,5%) ao final desta fase correspondente ao 6º dia de desidratação. No tratamento 0-400 (figura 22 a) Fo aumentou em torno de 33% ao final da desidratação em relação aos valores iniciais.

Fm, por sua vez, diminuiu nos dois tratamentos de desidratação no escuro (0-0 e 0-400) em torno de 53 e 49% (figuras 21 c e 22 c), respectivamente, em relação ao primeiro dia de avaliação experimental. Esta diminuição de Fm sob desidratação no escuro foi menos intensa do que a diminuição de Fm obtida para os tratamentos de desidratação na luz.

Após a reidratação, Fo e Fm diminuíram no tratamento 0-0 (em 36,5% e 39% respectivamente) (figura 21 b, d), e aumentaram no tratamento 0-400 (38% e 96%, respectivamente) (figura 22 b, d) em relação aos valores do início desta fase. Com exceção do Fo do tratamento 0-400 que alcançou um valor médio maior ao final da reidratação, Fo e Fm foram menores em ambos os tratamentos (0-0 e 0-400) em relação aos valores obtidos nas condições iniciais do experimento. Além disso, Fo e Fm dos tratamentos 0-0 e 0-400 foram menores também do que os valores médios obtidos para os tratamentos que receberam luz durante a desidratação, com exceção do Fo no tratamento 0-400.

A variação de Fo e Fm observada no tratamento de desidratação e dessecação no escuro (0-0) resultou na preservação de um valor médio mínimo de eficiência quântica potencial (Fv/Fm) de 0,525 ao final da fase de dessecação (figura 21 e), sob o CRA foliar médio de 11,7% (figura 14 a). Após a reidratação, houve uma diminuição transitória no valor de Fv/Fm do tratamento 0-0, após a qual houve uma fase de recuperação ao final de 5 dias sob escuro contínuo (até o 13º dia experimental, figura 21 f). No 13º dia experimental, não houve distinção significativa dos valores de Fv/Fm entre os tratamentos.

A manutenção da estabilidade de Fv/Fm em plantas desidratadas, desseçadas e reidratadas sob a condição de escuro contínuo, foi reproduzida em uma réplica experimental em que as amostras foram monitoradas à cada duas horas durante a reidratação (figura 23). Na réplica, Fo e

Fm aumentam nos tratamentos desidratados e dessecados sob condição de luz (400-400 e 100-100), e diminuíram no tratamento de desidratação e dessecação no escuro (0-0). Neste experimento, também foram tomadas medidas em folhas não impedidas de enrolar. Nestas folhas, os valores de F_v/F_m foram os maiores obtidos para a fase de reidratação, com valores acima de 0,6.

O tratamento 0-400 mostrou uma resposta semelhante a do tratamento 0-0 até o final da desidratação, com o valor médio mínimo de F_v/F_m estável de 0,455 (figura 22 e). A partir daí, diferiram no fato de que após a exposição das folhas à luz exclusivamente durante o estado dessecado, os valores de F_v/F_m diminuíram para zero (figura 22 f, 8º dia experimental). Quando as amostras foram reidratadas, apresentaram uma menor velocidade e menor capacidade máxima de recuperação comparado-se aos demais tratamentos no final da fase de reidratação. Desta maneira, o valor final de F_v/F_m obtido após a fase de dessecação neste experimento foi determinado pelo nível de luz recebido pelo tecido durante a fase de desidratação ou de dessecação.

Figura 21 - (a, b) Fluorescência basal (F_o), (c, d) fluorescência máxima (F_m), e (e, f) eficiência quântica potencial do fotossistema II (F_v/F_m) de amostras pré-acondicionadas ao escuro em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação (F2), dessecação (F3) e reidratação (F4) de *Anemia flexuosa*. Folhas desidratadas sob DFFF de 400 ($\circ$), 100 (Δ) ou 0 ($\blacklozenge$) $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e mantidas desseccadas nas mesmas condições. As denominações dos tratamentos nas legendas foram estabelecidas em função da DFFF utilizada nas fases de desidratação e de dessecação, respectivamente. Barras verticais representam o desvio padrão da média ($n=3$)

Figura 22 - (a, b) Fluorescência basal (F_o), (c, d) fluorescência máxima (F_m), e (e, f) eficiência quântica potencial do fotossistema II (F_v/F_m) de amostras pré-acondicionadas ao escuro em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação (F2), dessecação (F3) e reidratação (F4) de *Anemia flexuosa*. Folhas desidratadas sob DFFF de 400 (□), 100 (◇) ou 0 (▲) $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e mantidas desseccadas sob DFFF de 0 (□, ◇) ou 400 (▲) $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. As denominações dos tratamentos nas legendas foram estabelecidas em função da DFFF utilizada nas fases de desidratação e de dessecação, respectivamente. Barras verticais representam o desvio padrão da média ($n=3$)

Figura 23- (a) fluorescência basal (F_o), (b) fluorescência máxima (F_m), e (c) eficiência quântica potencial do fotossistema II (F_v/F_m) de amostras pré-acondicionadas ao escuro em função do tempo (horas) durante o processo de reidratação (F4) de *Anemia flexuosa*. Folhas desidratadas sob DFFF de 400 (○), 100 (△) ou 0 (◆) $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e mantidas dessecadas nas mesmas condições. As denominações dos tratamentos nas legendas foram estabelecidas em função da DFFF utilizada nas fases de desidratação e de dessecação, respectivamente. São apresentadas na 12^a e 24^a hora de recuperação medidas de folhas que se enrolaram naturalmente sob DFFF de 400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (×). Barras verticais representam o desvio padrão da média (n=3)

2.3.3 *Oryza sativa*

2.3.3.1 Superfícies foliares

No estado túrgido, as folhas de *Oryza sativa* mantiveram a superfície exposta de forma plana. Durante a desidratação, as folhas apresentaram um enrolamento do limbo ao longo da nervura central de maneira que a superfície superior foi protegida da luz. O enrolamento ocorreu a partir das bordas laterais do limbo foliar de forma a esconder a superfície superior (figura 24). As folhas mantiveram a cor verde mesmo após uma desidratação intensa, evidenciando a manutenção do conteúdo de clorofila. Somente posteriormente, após o término do experimento, as folhas passaram a apresentar uma coloração acinzentada e em seguida paleácea, acompanhando a perda total de clorofila.

Foram evidenciados estômatos em ambas as superfícies foliares de *Oryza sativa* (IAC 202) (figura 25). As folhas apresentaram-se recobertas de papilas epicuticulares de cera de diferentes formas, inclusive nos estômatos. Além do recobrimento de papilas, foram encontradas também fileiras de células de silício sobre ambas as superfícies foliares (figura 25). Associa-se a presença destas estruturas epidérmicas à proteção contra perda de água, excesso de luz e herbivoria (SÁNCHEZ; MONTIEL; ESPINOZA, 2003; SÁNCHEZ; ESPINOZA, 2005).

Figura 24 – Aspecto de *Oryza sativa* na condição inicial hidratada e imagem de microscopia eletrônica de varredura mostrando a forma de enrolamento foliar da folha desidratada

Figura 25 - Estômatos circundados por papilas epicuticulares de cera de diferentes formas nas superfícies superior (a) e inferior (b) de *Oryza sativa* (IAC 202)

2.3.3.2 Conteúdo relativo de água

O conteúdo relativo de água (CRA) foliar começou a diminuir somente quando o CRA do substrato era menor que 25% (figura 26). Em seguida, após o décimo segundo dia, observou-se uma diminuição intensa do estado de hidratação foliar, alcançando 35% do CRA máximo. A estabilidade do conteúdo de água ocorreu em 10% do CRA, quando a folha ainda se apresentava verde. A partir deste estado mínimo de hidratação, como era esperado, não houve capacidade de recuperação do turgor foliar após a reidratação.

2.3.3.3 Conteúdo de pigmentos fotossintéticos

Os conteúdos de clorofilas a e b diminuíram parcialmente durante a fase de desidratação (figura 27). Durante a diminuição foi verificado um período de estabilidade no conteúdo de clorofilas, entre o 10º e o 16º dia de desidratação. Este período esteve associado ao enrolamento natural das folhas.

Mesmo após a completa desidratação, o conteúdo foliar de clorofila foi mantido relativamente alto. A perda da coloração esverdeada ocorreu somente após a completa desidratação das folhas, em contraste com *Pleurostima purpurea* que perdeu seu conteúdo de clorofilas ainda durante a fase final da desidratação.

Figura 26 - Conteúdo relativo de água (CRA, %) do sistema substrato-planta (o) e foliar (●) em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação (F2) e dessecação (F3) de *Oryza sativa* (IAC 202). Barras verticais representam o desvio padrão da média (n=3)

Figura 27 - (a) Conteúdo de clorofila a (C_a , μgg^{-1}), e (b) clorofila b (C_b , μgg^{-1}) em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação (F2) e dessecação (F3) de *Oryza sativa* (IAC 202). Barras verticais representam o desvio padrão da média (n=3)

2.3.3.4 Trocas gasosas durante a desidratação de folhas destacadas de *Oryza sativa*

Em um experimento independente, foram também monitoradas continuamente as trocas gasosas de uma folha inicialmente intacta e posteriormente destacada de *Oryza sativa*, assim como descrito para *Pleurostima purpurea* e *Vellozia candida*. Após o destacamento da folha a condutância estomática (gs) aumentou rapidamente e em seguida diminuiu intensamente sob luz constante (figura 28 a). Após a fase de diminuição linear intensa que ocorreu dentro de trinta minutos após o destacamento foliar, a condutância estomática apresentou um súbito aumento após o qual diminuiu e manteve-se próximo de zero. Este padrão de variação da condutância estomática foi seguido pela transpiração (E) (figura 28 b) e pela assimilação de CO₂ (A) (figura 28 c). Em seguida, a assimilação CO₂ se tornou nula e não evidenciou em nenhum momento o estabelecimento de um balanço negativo de carbono (figura 28 c).

Figura 28 - Monitoramento contínuo da (a) condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), (b) transpiração (E , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e (c) assimilação de CO_2 (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$) em função da (d) radiação fotossinteticamente ativa (RFA, $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) de uma folha de *Oryza sativa* (IAC 202) desde o estado intacto até a completa desidratação após seu destacamento da planta. A linha tracejada vertical indica o momento do destacamento foliar

2.3.3.5 Trocas gasosas em plantas intactas de *Oryza sativa*

Sob disponibilidade de água no substrato, as plantas intactas de *Oryza sativa* (IAC) cultivadas em casa de vegetação apresentaram uma assimilação líquida de CO₂ (A) de, aproximadamente, 25 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ sob densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF) de 800 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (figura 29 a). Após a suspensão da irrigação, a assimilação de CO₂ diminuiu em aproximadamente 50% entre o 6º e o 8º dia experimental, quando o CRA foliar apresentava-se com 95% e o CRA do substrato com 32% (figura 26). No 10º dia de desidratação, ocorreu uma diminuição de A assim como da condutância estomática (gs) e da transpiração (E) (figura 29 b, c) para valores próximos de zero. No entanto, foi observado um aumento de gs e de E no 12º dia, sob valores nulos de assimilação de CO₂. Este aumento de gs e de E evidenciaram a continuidade da perda de água pelo tecido foliar até sua desidratação completa.

Em *Oryza sativa* não foi observado um balanço negativo de carbono após a suspensão da assimilação de CO₂ durante a desidratação, em contraste com o observado para as espécies tolerantes à dessecação. A reidratação do substrato de cultivo após a fase de desidratação, conforme esperado, não resultou na recuperação de turgor, evidenciando a morte das plantas.

Figura 29 - (a) Assimilação de CO₂ (A, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), (b) condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), e (c) transpiração (E, $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação (F2) e dessecação (F3) de *Oryza sativa* (IAC 202). Medidas realizadas sob DFFF constante de $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Barras verticais representam o desvio padrão da média (n=3)

2.3.3.6 Fluorescência da clorofila de amostras acondicionadas à luz e eficiência quântica efetiva dos fotossistemas II

Após a suspensão da irrigação dos vasos de *Oryza sativa*, houve um aumento da fluorescência em estado de equilíbrio dinâmico (F_s), da fluorescência máxima (F_m') e mínima (F_o') de amostras acondicionadas à luz, até o 10º dia de desidratação (figura 30), quando o conteúdo relativo de água (CRA) foliar foi de 80% (figura 26). Em geral, os parâmetros de fluorescência na luz (F_s , F_m' , F_o') em *Oryza sativa* permaneceram altos até o 16º dia de desidratação, quando o CRA foliar já se apresentava com 10%. Em seguida, houve uma diminuição intensa de F_s e F_m' , associada a uma diminuição em menor intensidade de F_o' . Estes resultados foram contrastantes com os observados em *Pleurostima purpurea*, em que os parâmetros F_s , F_m' e F_o' diminuíram em duas fases durante a desidratação.

Quando a assimilação de CO_2 se tornou nula no 10º dia experimental, sob um CRA foliar médio de 80% a eficiência quântica efetiva calculada pela forma Φ_{PSII} foi substancialmente menor, juntamente com a taxa de transporte de elétrons (ETR) que é dependente de Φ_{PSII} (figura 31). A eficiência quântica calculada pela forma F_v'/F_m' (figura 31), em contraste, somente diminuiu consideravelmente somente após os tecidos foliares apresentarem um CRA de 10%, depois do 16º dia.

O aumento de F_o' até o 10º dia foi o principal componente responsável pela diminuição sutil da eficiência quântica efetiva calculada pela relação F_v'/F_m' ($= (F_m' - F_o')/F_m'$). Quando calculada pela forma Φ_{PSII} ($= (F_m' - F_s)/F_m'$), observou-se uma diminuição intensa da eficiência quântica efetiva no 10º dia experimental, influenciada principalmente pelo aumento de F_s .

Figura 30 - (a) Fluorescência em condições de equilíbrio dinâmico (F_s), (b) fluorescência máxima (F_m'), e (c) fluorescência mínima (F_o') de amostras pré-acondicionadas à luz em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação (F2) e dessecação (F3) de *Oryza sativa* (IAC 202). Medidas realizadas sob DFFF constante de $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Barras verticais representam o desvio padrão da média ($n=3$)

Figura 31 - (a) Eficiência quântica efetiva do fotossistema II com envolvimento de Fo' (Fv'/Fm'), (b) eficiência quântica efetiva do fotossistema II sem envolvimento de Fo' (Φ_{PSII}), e (c) taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) de amostras acondicionadas à luz em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação (F2) e dessecação (F3) de *Oryza sativa* (IAC 202). Medidas realizadas sob DFFF constante de $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Barras verticais representam o desvio padrão da média ($n=3$)

2.3.3.7 Coeficientes de extinção fotoquímica e não-fotoquímica da fluorescência

O coeficiente de extinção fotoquímica da fluorescência (qP) (figura 32 a) apresentou uma diminuição intensa no 10º dia, acompanhando a diminuição da eficiência quântica efetiva (ΦPSII) (figura 31 b) e os valores nulos de assimilação de CO₂ (figura 29 a).

qP manteve-se baixo mas positivo até o 12º dia de desidratação. Em seguida, diminuiu para zero ao final da fase de desidratação (16º dia). Posteriormente, qP assumiu uma variação muito ampla dos valores, indicando a perda de significado do cálculo ($qP = (F_m' - F_s) / (F_m' - F_o')$) causada pelo aumento da similaridade entre os valores de F_s, F_o' e F_m' no último dia de medida.

Os coeficientes de extinção não-fotoquímico qN e NPQ apresentaram uma tendência de aumento sutil em função da deficiência hídrica até o 12º dia (Figura 32 a, b). A partir deste momento, observou-se uma estabilização de qN, enquanto NPQ diminuiu para valores próximo de zero até a desidratação completa do tecido foliar.

Figura 32 – (a) Coeficiente de extinção fotoquímica (qP) e coeficientes de extinção não-fotoquímica da fluorescência qN (b) e NPQ (c) em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação (F2) e dessecação (F3) de *Oryza sativa* (IAC 202). Medidas realizadas sob DFFF constante de $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Barras verticais representam o desvio padrão da média (n=3)

2.3.3.8 Fluorescência da clorofila de amostras acondicionadas ao escuro e eficiência quântica potencial dos fotossistemas II

A eficiência quântica fotossintética potencial dos fotossistemas II em *Oryza sativa*, estimada pela razão F_v/F_m (figura 33 c), se manteve, em geral, estável durante toda fase de desidratação, refletindo a estabilidade da fluorescência basal (F_o) e máxima (F_m) até o 16º dia de desidratação (figura 33 a, b).

A diminuição de F_v/F_m para zero em *Oryza sativa* ocorreu somente após o estabelecimento de um conteúdo de água nos tecidos foliares de 10%. A diminuição de F_v/F_m ocorreu devido a uma diminuição da fluorescência máxima (F_m) para o mesmo nível da fluorescência basal (F_o) no 18º dia de desidratação (Figura 33). Neste momento, a folha apresentou a textura de palha seca, e sua coloração mudou de esverdeada para verde acinzentada.

Figura 33 - (a) Fluorescência basal (F_o), (b) fluorescência máxima (F_m), e (c) eficiência quântica potencial do fotossistema II (F_v/F_m) de amostras pré-acondicionadas ao escuro em função do tempo (dias) durante os processos foliares de desidratação (F_2) e dessecação (F_3) de *Oryza sativa* (IAC 202). Medidas realizadas sob DFFF constante de $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Barras verticais representam o desvio padrão da média ($n=3$)

2.4 Discussão

2.4.1 Balanço hídrico

2.4.1.1 Controle do processo de desidratação dos tecidos foliares

A resistência à perda de água foliar de *Pleurostima purpurea*, *Anemia flexuosa* e *Oryza sativa* após a suspensão da irrigação evidencia a presença de mecanismos foliares de evitância (*sensu* LEVITT, 1980) à desidratação. O atraso observado na diminuição do conteúdo de água foliar em relação ao substrato, observado em *Pleurostima purpurea*, parece ocorrer com uma intensidade ainda maior do que a observada para *Anemia flexuosa*, bem como para *Oryza sativa* que é uma espécie tipicamente homeohídrica.

A dinâmica de conservação de água em *Pleurostima purpurea* poderia ser associada a fatores capazes de manter uma maior resistência à perda de água foliar e por um período de tempo mais longo sob a condição de seca, comparando-se com *Anemia flexuosa* e *Oryza sativa*. A economia de água é um processo típico de plantas homeohídricas que evitam a seca (*sensu* LEVITT, 1980). Uma das primeiras linhas de defesa de plantas vasculares contra a seca é dada pelo fechamento estomático que resulta na diminuição da transpiração (TAIZ; ZEIGER, 2002). O fechamento estomático constitui, portanto, uma resposta de economia de água sob condição de déficit hídrico. As vantagens da economia de água estão relacionadas à conservação de um suprimento hídrico limitado no solo por um período mais longo (TAIZ; ZEIGER, 2002).

Além do fechamento estomático, a dinâmica de conservação de água em *Pleurostima purpurea*, *Anemia flexuosa* e *Oryza sativa* poderia ser associada também a outros fatores. Entre estes fatores, a distribuição dos estômatos, a resistência da cutícula à difusão de água e a espessura do mesofilo. A análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) evidenciou que *P.purpurea* e *A.flexuosa* possuem folhas hipoestomáticas, em contraste com as folhas anfiestomáticas de *O.sativa*. Além disso, *P.purpurea* apresentou uma epiderme multiestratificada com uma camada de cera mais espessa comparada com as demais espécies que apresentaram somente uma camada de células na epiderme. No entanto, os poros estomáticos de *A. flexuosa* apresentaram uma dimensão maior, comparativamente. Foi observado também que a espessura do mesofilo é, comparativamente, maior em *Pleurostima purpurea*, seguida de *Anemia flexuosa* e *Oryza sativa*, nesta ordem. Características das células epidérmicas como a

espessura da parede celular externa e da cutícula, posição estomática relativa e densidade de tricomas foram relacionadas à evitância (*sensu* LEVITT, 1980) de perda excessiva de água e alto nível de luz (FAHN; CUTLER, 1992; DICKINSON, 2000). As características foliares evidenciadas na análise de MEV são coerentes com as evidências de que as folhas de *P.purpurea* apresentam uma maior resistência à perda de água do que *A.flexuosa* e *O.sativa*.

Além de características morfo-anatômicas, é provável que a retenção de água nos tecidos foliares de *Pleurostima purpurea*, *Anemia flexuosa* e *Oryza sativa* seja decorrente também de um ajuste osmótico frente à desidratação do solo (NIELSEN; ORCUTT, 1996; HARE et al., 1998; WILLIGEN, et al., 2004). O acúmulo de sacarose contribui para o ajuste osmótico, além de atuar possivelmente na manutenção da estabilidade de membranas e macro-moléculas (GHASEMPOUR et al., 1998). Desta maneira, o impedimento à perda de água pelo acúmulo de solutos, em geral, também estaria associado à necessidade de tempo para a preparação do tecido para entrada em anabiose (OLIVER, 1996; OLIVER; WOOD; O'MAHONY, 1998).

Em *Pleurostima purpurea* e *Anemia flexuosa*, a exemplo de outras pteridófitas e angiospermas, o processo de tolerância à dessecação seria fundamentado, preponderantemente, na ativação de mecanismos de proteção durante a desidratação (BEWLEY; KROCHKO, 1982; OLIVER, 1996; OLIVER; WOOD; O'MAHONY, 1998). Para isto, esperamos que estes mecanismos de proteção em *Pleurostima purpurea* e *Anemia flexuosa* sejam induzidos principalmente durante a fase de desidratação, enquanto haveria um nível mínimo de hidratação na folha.

Como foi dito, a manutenção de um nível mínimo do conteúdo de água foliar necessário para a indução de mecanismos de proteção seria obtido por diferentes formas de controle sobre as taxas de perda de água dos tecidos foliares de *Pleurostima purpurea* e *Anemia flexuosa*. Entretanto, as diferentes formas de controle sobre as taxas de perda de água dos tecidos foliares poderiam mantê-los em um grau relativamente alto de hidratação capaz de impedir sua entrada em anabiose, ao mesmo tempo em que poderia preservar a atividade respiratória. Dependendo do tempo de manutenção desta atividade respiratória, poderia ocorrer um esgotamento de reservas, o que inviabilizaria a recuperação metabólica da planta com a reidratação. Desta maneira, presume-se que a perda de água foliar deve se tornar importante para a finalização do processo de desidratação a partir de um momento crítico após a fase de preparação. O novo arranjo protoplasmático que se forma ao final desta fase de preparação necessitaria, portanto, de um alto

grau de desidratação do tecido para a ocorrência da supressão da respiração basal e para o estabelecimento do estado vitrificado. Isto pode ser inferido a partir das avaliações da cinética de desidratação foliar após o destacamento em *Pleurostima purpurea* e *Vellozia candida*. De acordo com os resultados, foi observado um componente espasmódico associado com um aumento súbito da condutância estomática após um período que evidencia uma redução estável da transpiração em *Pleurostima purpurea* e *Vellozia candida* após o destacamento foliar. Pode-se sugerir que este aumento transitório de gs possua valor adaptativo e evidencie a presença de um mecanismo facilitador da desidratação, o que seria vantajoso para a entrada em anabiose rapidamente após a preparação do tecido para a tolerância à dessecação. Este aumento transitório de gs poderia ser decorrente simplesmente da perda de controle sobre seu fechamento, conforme observado em *Craterostigma plantagineum* por Schwab; Schreiber e Heber (1989). Apesar disto, a ocorrência desta resposta poderia estar associada à existência de um sinal capaz de estabelecer, de alguma maneira, o momento mais adequado para favorecer uma rápida desidratação. Deng et al. (2003) discutem a possibilidade da existência de um mecanismo ativo de rápida remoção de água em folhas em *Boea hygrometrica* diante da rápida taxa de desidratação evidenciada pela análise da cinética de desidratação de folhas destacadas de plantas totalmente hidratadas. A hipótese de que existe um mecanismo facilitador da desidratação merece ser investigada sob o aspecto adaptativo, o que poderia esclarecer como a tolerância à dessecação pode ser ecologicamente vantajosa nos ambientes onde *Pleurostima purpurea* ocorre.

Em *Anemia flexuosa*, a linearidade observada na diminuição da transpiração que se segue a uma redução acentuada da condutância estomática contrasta com a dinâmica complexa observada em *Pleurostima purpurea* e *Vellozia cándida* durante a desidratação de folhas destacadas. Em *Anemia flexuosa* o processo de desidratação poderia estar associado basicamente à perda de água por difusão cuticular devido à natureza aparentemente pouco resistiva de sua epiderme. A menor resistência difusiva à perda de água pela cutícula em *Anemia flexuosa* não ofereceria, portanto, empecilho para um estabelecimento rápido da anabiose. Ao invés disto, a desidratação poderia ser mais rápida do que a necessária para a indução completa dos mecanismos de preparação para a tolerância à dessecação nesta espécie. Desta maneira, *Anemia flexuosa* poderia não contar com o tempo necessário para a indução dos sistemas de proteção sob condição de alto déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar. Esta condição poderia ocorrer numa situação em que a folha mantém algum nível de hidratação enquanto os estômatos

encontram-se fechados, ao mesmo tempo em que a temperatura foliar é alta, comparada com a do ar, e a umidade relativa do ambiente é baixa. Esta situação poderia corresponder a um início de deficiência hídrica sob exposição das folhas à radiação solar direta. Portanto, é possível que parte do controle necessário da taxa de perda de água foliar de *Anemia flexuosa* seja dependente do ambiente em que se encontra. Desta maneira, esta espécie deve depender de um acoplamento adequado ao ambiente para que sua fase de preparação possa tornar seus tecidos vegetativos viáveis no estado dessecado. O ambiente sombreado em que *Anemia flexuosa* ocorre em maior frequência poderia corresponder à condição em que a taxa de desidratação de seus tecidos vegetativos ocorreria de forma compatível com sua necessidade de tempo para preparação para a anabiose.

Comparativamente, a resistência difusiva aparentemente menor das folhas de *Oryza sativa*, uma espécie tipicamente homeohídrica, exerceu menor influência na limitação da perda de água de seus tecidos vegetativos comparada com *Pleurostima purpurea*. Além do fechamento estomático, presume-se que *Oryza sativa* também apresente algum acúmulo de osmólitos em resposta à deficiência hídrica. No entanto, a intensidade com que o mecanismo de ajuste osmótico ocorre deve ser limitada, não permitindo que a planta mantenha uma capacidade de recuperação após ser submetida a uma amplitude de desidratação protoplasmática relativamente curta, comparada com *Pleurostima purpurea* e *Anemia flexuosa*.

O destacamento foliar de *Oryza sativa* resultou em um rápido fechamento estomático. No entanto, o fechamento estomático em *Oryza sativa* não impediu a rápida desidratação do tecido foliar. Imediatamente após a fase de diminuição da condutância estomática provocada pelo destacamento foliar foi observado um aumento transitório da condutância estomática (gs) e da transpiração (E). Este resultado pode ter sido decorrente de uma perda do controle estomático, assim como sugerido para *Pleurostima purpurea* e *Vellozia candida*, mas de forma precoce para *Oryza sativa* comparada a estas duas espécies. No entanto, este aumento transitório de gs durante a cinética de desidratação da folha destacada de *Oryza sativa* não teria nenhum sentido de evitar danos permanentes à estrutura foliar, considerando que a partir deste momento de desidratação, não há recuperação fisiológica com a reidratação.

2.4.1.2 Reidratação de plantas intactas

A disponibilização de água para *Pleurostima purpurea* durante a fase de reidratação foi realizada exclusivamente por meio da resaturação hídrica do substrato. Com isto, foi observada uma rápida recuperação do turgor foliar. Isto deve indicar que as raízes devem ser tolerantes à dessecação e que participam do processo de transporte de água para a parte aérea. Além disso, não foi observada transpiração até que a folha assumisse completamente o turgor, o que evidencia a ausência do mecanismo de coesão-tensão (DIXON; JOLY, 1894) neste processo de transporte ascendente da água pelo xilema.

Com a dessecação, os vasos do xilema de *Pleurostima purpurea* e de *Anemia flexuosa* podem ter se tornado embolizados. Apesar disso, *Pleurostima purpurea* foi capaz de apresentar um repreenchimento hídrico do xilema com a reidratação. Isto foi evidenciado pela recuperação do turgor foliar. A rápida reidratação foliar observada para *Pleurostima purpurea* após a reidratação do substrato de cultivo indica que a espécie deve apresentar mecanismos para evitar e/ou superar a ocorrência de embolismo no xilema. Em *Myrothamnus flabellifolius*, uma espécie lenhosa tolerante à dessecação de até um metro de altura, foi evidenciado que o processo de repreenchimento hídrico do xilema é dependente da absorção de água pelas raízes durante a reidratação de plantas dessecadas. Além disso, inclusões lipídicas nas pontuações bem como alinhamentos de lipídios na parede interna dos elementos condutores de *M. flabellifolius* previniriam a ocorrência de embolismo irreversível e estariam envolvidos na resposta de repreenchimento hídrico do xilema desidratado (SHERWIN et al., 1998; SCHNEIDER et al., 2000; WAGNER et al., 2000; ZIMMERMANN et al., 2001; MOORE et al., 2007). A presença de vasos condutores mais estreitos em plantas de ambientes sujeitos à deficiência hídrica contribui para evitar a ocorrência de embolismo irreversível (TYREE; DAVIES; COCHARD, 1994). Em *M. flabellifolius*, a reversão do embolismo evidenciada pelo repreenchimento hídrico do xilema poderia envolver pressão radicular e capilaridade (SHERWIN et al., 1998; SCHNEIDER et al., 2000; WAGNER et al., 2000; ZIMMERMANN et al., 2001; MOORE et al., 2007).

Anemia flexuosa foi capaz de manter altas taxas transpiratórias provavelmente associadas à absorção de água pelas raízes sob condições de hidratação completa da planta e disponibilidade de água no substrato. No entanto, a reidratação exclusiva do substrato sob condição de ar seco não resultou na recuperação de turgor das folhas dessecadas de *Anemia flexuosa*. A reidratação

foliar ocorreu somente em condições de disponibilidade de água livre na superfície das folhas. Há relatos de que algumas pteridófitas tolerantes à dessecação reidratam por meio da absorção direta de água pela fronde (EICKMEIER, 1979; SCHWAB; SCHREIBER; HEBER, 1989), similar a várias pecilohídricas criptógamas (KERSHAW, 1985), enquanto também são reconhecidas outras pteridófitas de deserto que absorvem água pelas raízes (HARTEN; EICKMEIER, 1987). Diferentes autores consideram que as superfícies foliares de Hymenophyllaceae são capazes de absorver água (SHREVE, 1911 apud PROCTOR, 2003; HÄRTEL, 1940b apud PROCTOR, 2003), sendo que Härtel (1940b, apud PROCTOR, 2003) concluiu que *Hymenophyllum demissum* não é dependente da absorção de água pelo sistema vascular. Proctor (2003) sugere que a condução interna de seiva em Hymenophyllaceae deve ser importante para o transporte de metabólitos como carboidratos, aminoácidos e reguladores de crescimento, mas não para o suprimento das necessidades hídricas da parte aérea a partir da absorção de água pelas raízes. Nossos resultados evidenciaram que a reidratação foliar de *Anemia flexuosa* seria dependente da entrada de água pela folha, indicando assim o comportamento ectohídrico de absorção de água durante o processo de recuperação do turgor a partir do estado dessecado (BUCH, 1945 apud PROCTOR; TUBA, 2002).

Conforme esperado, as plantas dessecadas de *Oryza sativa* não foram capazes de reassumir o turgor foliar após a reidratação. Durante a desidratação, os vasos condutores do xilema de *Oryza sativa* podem ter sofrido embolismo. A suscetibilidade ao embolismo estaria associada ao tamanho dos poros entre pares de pontoações, sendo os poros maiores mais vulneráveis à passagem de ar (TYREE; SPERRY, 1988). Além disso, esperamos que o ciclo completo de dessecação e reidratação tenha provocado uma perda generalizada da estabilidade de membranas em células de raízes e folhas de *O. sativa*. A estabilidade de membranas foi sugerida como uma das características que diferencia células de plantas tolerantes daquelas sensíveis à dessecação (ILJIN, 1953 apud BEWLEY; KROCHKO, 1982). Desta maneira, a incapacidade de recuperação do turgor foliar após a reidratação de plantas dessecadas de *O. sativa* poderia estar envolvida com a ocorrência de embolismo irreversível no xilema e o rompimento de membranas celulares. Estes efeitos não teriam ocorrido em *Pleurostima purpurea* e *Anemia flexuosa* durante a desidratação, com exceção do embolismo para *Anemia flexuosa*, cuja irreversibilidade poderia explicar o comportamento necessariamente ectohídrico durante a reidratação desta espécie.

2.4.2 Balanço de CO₂, uso e dissipação da luz

2.4.2.1 Diminuição da assimilação líquida de CO₂ e manutenção das vias fotoquímica e não-fotoquímica durante a desidratação

Sob condições de disponibilidade de água e baixa luminosidade ($100 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) a assimilação de CO₂ e a eficiência qu\u00e2ntica efetiva dos fotossistemas II (ΦPSII) em *Anemia flexuosa* foram, comparativamente, maiores do que em *Pleurostima purpurea*. Um maior aproveitamento da luz de baixa intensidade seria uma vantagem para a coloniza\u00e7\u00e3o de ambientes sombreados, sendo esata resposta correspondente \u00e0 habilidade de *Anemia flexuosa* em colonizar micros\u00edtios sombreados. A baixa assimila\u00e7\u00e3o de CO₂ sob baixa luminosidade em *Pleurostima purpurea* mostrou-se associada a uma baixa condut\u00e2ncia estom\u00e1tica. Isto seria uma evid\u00eancia de um controle fotoativo de alta sensibilidade que deve aumentar a efici\u00eancia de uso da \u00e1gua sob condi\u00e7\u00f5es de baixa luminosidade em *Pleurostima purpurea*. Desta maneira, altas taxas de assimila\u00e7\u00e3o de CO₂ em *Pleurostima purpurea* seriam esperadas somente em ambientes com alta disponibilidade de luz, correspondentes aos micros\u00edtios expostos em que \u00e9 encontrada.

Durante o per\u00edodo intermedi\u00e1rio da fase de desidrata\u00e7\u00e3o, a diminui\u00e7\u00e3o da assimila\u00e7\u00e3o líquida de CO₂ (A) observada em *Pleurostima purpurea*, *Anemia flexuosa* e *Oryza sativa* poderia estar relacionada a fatores estom\u00e1ticos e n\u00e3o estom\u00e1ticos. O fechamento estom\u00e1tico provocaria a diminui\u00e7\u00e3o da concentra\u00e7\u00e3o de CO₂ nos espa\u00e7os intercelulares limitando a assimila\u00e7\u00e3o de CO₂ pela ribulose bifosfato carboxilase (rubisco) (LAWLOR; CORNIC, 2002). Entre as causas n\u00e3o estom\u00e1ticas de diminui\u00e7\u00e3o da assimila\u00e7\u00e3o líquida de CO₂ poderia tamb\u00e9m ter ocorrido uma diminui\u00e7\u00e3o da regenera\u00e7\u00e3o do substrato ribulose bifosfato (RuBP) (MEDRANO et al., 2002), a inibi\u00e7\u00e3o da atividade da enzima rubisco (PARRY et al., 2002), ou a limita\u00e7\u00e3o da difus\u00e3o de CO₂ no mesofilo (FLEXAS et al., 2004).

O funcionamento fotoqu\u00edmico respondeu diferentemente entre as esp\u00e9cies *Pleurostima purpurea*, *Anemia flexuosa* e *Oryza sativa* ap\u00f3s a fase de maior diminui\u00e7\u00e3o da assimila\u00e7\u00e3o líquida de CO₂ (A) durante a desidrata\u00e7\u00e3o. Em *Anemia flexuosa*, a diminui\u00e7\u00e3o de A ocorreu associada a uma diminui\u00e7\u00e3o simult\u00e2nea e em intensidade semelhante da efici\u00eancia qu\u00e2ntica efetiva dos fotossistemas II (avaliada pelas medidas de F_v'/F_m' e ΦPSII), da taxa de transporte de el\u00e9trons (ETR) e do coeficiente de extin\u00e7\u00e3o fotoqu\u00edmica da fluoresc\u00eancia (qP, indicativo da concentra\u00e7\u00e3o relativa de centros de rea\u00e7\u00e3o abertos). *Oryza sativa* apresentou um comportamento parecido com *Anemia flexuosa* com rela\u00e7\u00e3o \u00e0 ΦPSII , ETR e qP, que diminuíram de forma simult\u00e2nea com a

suspensão de A, mas diferiu em relação ao padrão de F_v'/F_m' que se manteve estável durante a maior parte da fase de desidratação. Em *Pleurostima purpurea*, F_v'/F_m' , $\Phi PSII$, ETR e qP diminuíram apenas levemente após a suspensão da assimilação de CO_2 . Resultados correspondentes também foram obtidos com *Borya nitida* (HETHERINGTON; SMILLIE, 1982). A diminuição de qP pode ser causada, inicialmente, por uma inativação da transferência de elétrons nos lados doadores e aceptores do fotossistema II (YORDANOV et al., 1987). Processos auxiliares de dissipação da energia de excitação, no entanto, poderiam manter uma drenagem de elétrons, sustentando um valor relativamente alto para a concentração relativa de centros de reação abertos do fotossistema II (medida pelo coeficiente de extinção fotoquímica da fluorescência, qP) principalmente em *Pleurostima purpurea* mesmo após a diminuição da assimilação de CO_2 (A). A assimilação fotossintética de CO_2 é a principal via de consumo de elétrons fotossintéticos sob condições fisiológicas adequadas. No entanto, a produção de O_2 pode ser mantida mesmo após suspensão total da assimilação de CO_2 e sob valor muito baixo de conteúdo de água (CRA) (STUART, 1968). Desta forma, a produção de O_2 seria dependente do funcionamento da cadeia de transporte de elétrons (LAWLOR; CORNIC, 2002). Apesar do possível envolvimento da reação de Mehler e da respiração de escuro, a fotorrespiração predomina sobre a absorção de O_2 sob condições de baixa assimilação de CO_2 (LAWLOR; CORNIC, 2002). Desta maneira, a manutenção prolongada da taxa de transporte de elétrons principalmente em *Pleurostima purpurea* após a suspensão da assimilação líquida de CO_2 durante a desidratação poderia estar associada à fotorrespiração. A fotorrespiração, portanto, poderia ser especialmente importante como mecanismo protetivo de regulação do potencial redox em *Pleurostima purpurea*.

A diminuição de F_v'/F_m' , $\Phi PSII$ e qP, em geral, indica um aumento da proporção do estado reduzido das quinonas primárias (QA) aceptoras de elétrons do fotossistema II de amostras acondicionadas à luz (WALKER, 1987). As variáveis F_v'/F_m' , $\Phi PSII$ e qP são alteradas em função de modificações nos parâmetros de fluorescência. A diminuição da eficiência quântica efetiva dos fotossistemas II (F_v'/F_m' e $\Phi PSII$) em *Pleurostima purpurea*, *Anemia flexuosa* e *Oryza sativa* ao longo da desidratação ocorreu principalmente em função da diminuição da fluorescência máxima na condição de luz (F_m'). A diminuição da eficiência quântica em consequência da diminuição da fluorescência máxima pode sugerir um impedimento fotoquímico nos fotossistemas II e a ocorrência de fotoinibição (BJÖRKMAN, 1987).

Simultaneamente às diminuições de eficiência quântica efetiva em *Pleurostima purpurea*, *Anemia flexuosa* e *Oryza sativa* houve ativação de mecanismos de dissipação de calor (estimada pelos coeficientes de extinção não-fotoquímica da fluorescência qN e NPQ). Inicialmente, o aumento de qN e NPQ pode ser causado pelo aumento da desativação de moléculas de clorofila excitadas, aumento do ΔpH transmembrana sob diminuição do consumo de ATP, e ao processo de transição de estados de migração da energia de excitação dos fotossistemas II para os fotossistemas I (YORDANOV et al., 1987). A diminuição da concentração de CO_2 no interior dos cloroplastos provocada pelo fechamento estomático deve limitar a ocorrência da carboxilação de RuBP, não fazendo uso de NADPH e ATP. O acúmulo de NADPH e ATP impediria a oxidação das quinonas primárias (QA) aceptoras de elétrons do fotossistema II não permitindo o descarregamento de prótons do lúmen (WALKER, 1987; LAWLOR; CORNIC, 2002). O aumento da concentração de prótons no lúmen é determinante na ativação de mecanismos de dissipação de calor associados a pigmentos do complexo antena que, em conjunto com alterações químicas do ciclo das xantofilas e do mecanismo de transição de estado, responderiam pela dissipação não fotoquímica da energia (WALKER, 1987; LAWLOR; CORNIC, 2002; WILSON et al., 2006). Além da dissipação de calor no nível do complexo antena, a dissipação não fotoquímica também poderia estar associada a um mecanismo de recombinação de cargas nos centros de reação (WILSON et. al, 2006). Estas diferentes vias de dissipação do excesso de energia atuariam de forma complementar protegendo os fotossistemas II da ocorrência de danos durante as fases iniciais de deficiência hídrica (WILSON et. al, 2006).

Em *Pleurostima purpurea* especialmente, a manutenção relativamente duradoura de valores altos de eficiência quântica efetiva, coeficiente de extinção fotoquímica e não-fotoquímica ao longo da desidratação indicaria a presença de mecanismos de proteção contra o excesso de luz por dissipação de calor e por transferência de elétrons para drenos diferentes do CO_2 sob deficiência hídrica. De acordo com Lawlor e Cornic (2002), o funcionamento do fotossistema II e do transporte de elétrons pode ser mantido por um período maior de tempo além daquele em que a assimilação de CO_2 é limitada pela desidratação do tecido. Neste processo, o transporte de elétrons seria insensível a diminuição de até 50% do conteúdo relativo de água foliar (CRA) máximo, sendo esta faixa considerada fisiologicamente relevante (LAWLOR; CORNIC, 2002). Por outro lado, a diminuição da capacidade de drenagem de elétrons pela cadeia transportadora incorreria no aumento da dissipação não-fotoquímica da energia na forma de calor

(LAWLOR; CORNIC, 2002). De acordo com os resultados de *Anemia flexuosa* e *Oryza sativa*, a ativação de vias de dissipação de calor seria, aparentemente, a principal forma de proteção conferida no nível dos cloroplastos contra a luz. Além disso, outras formas de proteção estariam envolvidas durante a desidratação em *Anemia flexuosa* e *Oryza sativa*, como a diminuição à exposição à luz pelo enrolamento foliar.

2.4.2.2 Respiração de dessecação

Após a suspensão da assimilação de CO₂, foi detectado o estabelecimento de um balanço negativo de CO₂ em *Pleurostima purpurea* e *Anemia flexuosa* anteriormente à entrada em anabiose. Este balanço negativo de CO₂ deve corresponder a uma condição em que os processos fotossintéticos foram extintos enquanto a respiração foliar foi mantida. Isto é normalmente interpretado como indicativo do custo energético envolvido com a preparação do tecido para o estado dessecado em plantas tolerantes, sendo esta resposta denominada em literatura como respiração de dessecação (SCHWAB; SCHREIBER; HEBER, 1989; TUBA et al., 1997; TUBA; PROCTOR; CSINTALAN, 1998). De acordo com a literatura, a respiração de dessecação se estabelece imediatamente após suspensão da assimilação líquida de CO₂ (TUBA; PROCTOR; CSINTALAN, 1998), conforme apontado na figura 34 (a, b). Para que a detecção do balanço negativo de carbono fosse possível, podemos supor que fosse necessária a abertura estomática para permitir a saída de CO₂ do interior do mesofilo (pelo menos para *Pleurostima purpurea* que apresenta uma alta resistência às trocas gasosas entre a folha e o ar quando seus estômatos estão fechados). Isto favoreceria a discussão anterior de que a finalização da desidratação depende de um aumento transitório da condutância estomática, na medida em que a detecção da respiração de dessecação fosse dependente do mesmo processo. De fato, nos experimentos com folhas destacadas de *Pleurostima purpurea* e *Vellozia candida*, o aumento da condutância estomática e da transpiração estiveram associados ao que se supõe corresponder à respiração de dessecação correspondente ao estabelecimento de um balanço negativo de carbono. No entanto, no experimento com as plantas intactas, a suposta fase de respiração de dessecação foi detectada antes da fase de maior taxa de diminuição do CRA foliar. Isto pode ter ocorrido devido à resolução temporal do experimento que pode não ter detectado o principal período de ocorrência da respiração de dessecação.

Por outro lado, uma explicação alternativa assumindo que a difusão do CO_2 poderia ocorrer mesmo com os estômatos fechados, é de que o balanço de carbono ocorreria no nível de compensação durante o período precedente à respiração de dessecação, conforme sugerem os dados apresentados em um estudo prévio de *Pleurostima purpurea* (AIDAR et al., 2010). Esta fase de manutenção de um balanço neutro de carbono anteriormente ao estabelecimento da respiração de dessecação foi denominada na figura 34 (c) de “compensação de CO_2 de dessecação”. Logo, a manutenção do balanço de carbono no nível de compensação ocorreria até que a fotossíntese fosse de fato totalmente suspensa. Deste ponto em diante somente a respiração passaria a vigir caracterizando a fase de “respiração de dessecação” propriamente dita. Uma evidência a favor dessa proposição é de que as medições de trocas gasosas são capazes de detectar respiração no escuro, quando os estômatos deveriam estar fechados por efeito fotoativo. Além disso, foi possível detectar um balanço negativo de carbono em *Pleurostima purpurea* após a reidratação foliar mesmo com valores nulos de condutância estomática e transpiração. Esta fase, por sua vez, é reconhecida como respiração de resaturação (SMITH; MOLESWORTH, 1973; SCHWAB; SCHREIBER; HEBER, 1989; TUBA et al., 1998), e corresponde à retomada da atividade metabólica que viabilizaria energia para os processos necessários de recuperação do estado de anabiose.

Em *Oryza sativa* não foi detectada uma fase corresponde à respiração de dessecação após a suspensão da assimilação de CO_2 , possivelmente devido ao comprometimento do estado funcional de suas mitocôndrias por se tratar de uma espécie sensível à dessecação. Isto pode ter ocorrido provavelmente porque a folha já se apresentava morta, sem atividade respiratória, pouco tempo depois da suspensão da assimilação de CO_2 .

Figura 34— Representação do balanço de CO_2 durante um ciclo completo de desidratação e reidratação em *Anemia flexuosa* (a) e *Pleurostima purpurea* (b, c). de acordo com os resultados obtidos e dados de literatura. A compensação de CO_2 de dessecação (em c) seria um modelo contrastante ao previsto para tolerantes à dessecação modificadas (em b)

2.4.3 Potencial aparente de uso da luz e conteúdo de clorofila durante as fases de desidratação, dessecação e recuperação

A diminuição da assimilação líquida de CO_2 e da eficiência quântica efetiva em *Pleurostima purpurea*, *Anemia flexuosa* e *Oryza sativa* não foi acompanhada da diminuição da eficiência quântica potencial dos fotossistemas II (avaliada pela relação F_v/F_m) em uma faixa relativamente ampla de conteúdo relativo de água durante o progresso da desidratação.

F_v/F_m resulta da relação $F_m - F_o/F_m$. A fluorescência basal (F_o), descrita como a perda da energia de excitação durante sua transferência dos pigmentos do complexo antena para o centro de reação do fotossistema II, pode aumentar sob condições iniciais de deficiência hídrica (YORDANOV et al., 1987). O aumento de F_o pode ser atribuído a dano fotoinibitório do funcionamento do centro de reação (OSMOND et al., 1993). Além disso, a fluorescência máxima tende a diminuir nestas condições provavelmente devido às alterações na recombinação de cargas em consequência da inativação do transporte de elétrons da água para o centro de reação do fotossistema II (BAKER; HORTON, 1987). Estas respostas resultam na diminuição da eficiência quântica potencial dos fotossistemas II (F_v/F_m). F_v/F_m é correlacionado linearmente com a eficiência quântica fotossintética durante a fotoinibição de plantas hidratadas (DEMMIG; BJÖRKMAN, 1987) se a mudança na eficiência é ou não devido à dano fotoinibitório ou a processo fotoprotetivo envolvendo extinção não-fotoquímica da fluorescência (CASPER; EICKMEIER; OSMOND, 1993). A diminuição da eficiência quântica fotossintética relacionada com a extinção não fotoquímica da fluorescência está associada com a conversão de violaxantina para zeaxantina (CASPER; EICKMEIER; OSMOND, 1993).

Em *Pleurostima purpurea*, a eficiência fotoquímica potencial (F_v/F_m) se manteve alta pelo menos até o conteúdo relativo de água foliar (CRA) de 72%, embora com valores levemente menores que indicariam, em princípio, a ocorrência de fotoinibição dos fotossistemas II. A diminuição de F_v/F_m para zero em *Pleurostima purpurea* ocorreu rapidamente durante a fase de diminuição do CRA foliar de 72% para 14%, associada com a perda total do conteúdo de clorofila que caracteriza o processo de peciloclorofilia (HAMBLER, 1961). Em *Pleurostima purpurea*, o conteúdo de carotenóides aumentou consideravelmente durante a desidratação, independentemente do conteúdo de clorofila. A associação estrutural entre clorofila e carotenóide nos cloroplastos intactos é uma forma de proteção contra a luz (OWOSEYE; SANFORD, 1972). A perda de clorofila está associada ao dismantelamento dos cloroplastos, o que deve liberar o

conteúdo de carotenóides contribuindo para o amarelecimento foliar com a desidratação ou, por outro lado, o amarelecimento poderia refletir simplesmente a perda do mascaramento pela clorofila (OWOSEYE; SANFORD, 1972). De acordo com Owoseye e Sanford (1972), a persistência de clorofila após a fragmentação dos cloroplastos durante a desidratação de *Vellozia schinitzleinia* no escuro seria uma prova de que a desidratação em si não afetaria a perda de clorofila, mas o dismantelamento dos cloroplastos tornaria a clorofila vulnerável à destruição pela luz. No entanto, este assunto merece ser melhor investigado considerando que *Pleurostima purpurea*, aparentemente, apresenta perda de clorofila mesmo no escuro.

Durante a reidratação, o conteúdo normal de clorofila foi recuperado em *Pleurostima purpurea*, conforme observado em outras espécies tolerantes à dessecação peciloclorófilas (OWOSEYE; SANFORD, 1972; GAFF; HALLAM, 1974; GAFF; CHURCHILL, 1976; TUBA et al., 1993a,b; TUBA et al., 1997; SHERWIN; FARRANT, 1998). A recuperação do conteúdo de clorofila em *Pleurostima purpurea* correu juntamente com a diminuição do conteúdo de carotenóides, bem como do aumento da eficiência quântica de uso da luz e da assimilação de CO₂. Nos ambientes de ocorrência de *Pleurostima purpurea*, caracterizados por ilhas de solo com baixa profundidade e estabelecidas sobre depressões e fendas de drenagem de superfícies de afloramentos rochosos, a luz deve se tornar frequentemente excessiva considerando as características de exposição à radiação solar direta e de disponibilidade imprevisível da água (AIDAR et al., 2010). Desta maneira, o problema da interação da luz com a clorofila em tecidos foliares com baixo conteúdo de água deixa de existir com a perda deste pigmento, que se supõe ocorrer de forma controlada (SHERWIN; FARRANT, 1996; SHERWIN; FARRANT, 1998; FARRANT et al., 2003). Todas as espécies peciloclorófilas tolerantes à dessecação conhecidas são de ambientes expostos à radiação solar direta, indicando que a perda de clorofila constitui um mecanismo de proteção contra a luz durante o estado de anabiose (SHERWIN; FARRANT, 1996; SHERWIN; FARRANT, 1998; FARRANT et al., 2003). Desta forma, a peciloclorofilia pode ser interpretada como vantajosa para a colonização de ambientes caracterizados por períodos imprevisíveis de seca e exposição à radiação solar direta (SHERWIN; FARRANT, 1998; COLLET et al., 2003; INGLE et al., 2007; TUBA, 2008). Em *Pleurostima purpurea* uma perda programada de clorofilas poderia proteger os tecidos foliares da ocorrência inadvertida de danos irreversíveis que poderiam ocorrer se o aparato fotossintético fosse mantido durante a desidratação intensa sob alta irradiância.

Em *Oryza sativa*, a eficiência quântica potencial dos fotossistemas II (Fv/Fm) foi mantida alta até o conteúdo relativo de água (CRA) foliar de 10%, e diminuiu para zero somente após o estabelecimento deste estado hídrico. Estes resultados estiveram associados à manutenção do conteúdo de clorofila no tecido. Aparentemente, teve-se a impressão de que, apesar da desidratação, o estado de exposição do aparato fotossintético em *Oryza sativa* teria sido mantido relativamente estável com relação às suas características estruturais e de composição. Em seu estudo, as folhas de *Oryza sativa* não foram impedidas de enrolar durante a desidratação sob condição de luz natural no interior de casa de vegetação. O enrolamento foliar deve ter contribuído para a manutenção estável do conteúdo de clorofila e conseqüentemente dos valores de Fv/Fm na ampla faixa de variação do conteúdo relativo de água a qual as folhas foram submetidas. O enrolamento foliar, provavelmente, deve ter acondicionado o interior do mesófilo ao escuro, o que teria contribuído para a preservação da clorofila. No entanto, a diminuição severa do CRA acaba por alterar a estrutura do fotossistema II e diminuir sua atividade (GIARDI et al., 1996). A diminuição da atividade dos fotossistemas II seria resultante da fotoinibição (OSMOND, 1994). Em *Oryza sativa*, portanto, a diminuição intensa de Fv/Fm observada no final do processo de desidratação indicaria profundas alterações de estrutura dos fotossistemas II incluindo perda de clorofila, considerando a perda notável de coloração e estrutura do tecido vegetativo associada a esta fase.

Em *Anemia flexuosa*, a eficiência quântica potencial dos fotossistemas II (Fv/Fm) também manteve-se estável durante a desidratação até o conteúdo relativo de água médio de 64%. A partir daí, os valores de Fv/Fm de *Anemia flexuosa* continuaram estáveis ou diminuíram apenas parcialmente, dependendo da condição luminosa a que foram expostas durante a fase de desidratação, de luz ou escuro, respectivamente. A manutenção de altos valores de Fv/Fm até que o estabelecimento de um alto grau de desidratação dos tecidos seria uma evidência da preservação essencialmente intacta do sistema de tilacóides e pigmentos ao longo da dessecação (TUBA; PROCTOR; CSINTALAN, 1998). As respostas de *Anemia flexuosa* dadas pelas interações dos tecidos foliares com a presença e ausência de luz durante as fases experimentais de desidratação e dessecação são apresentadas em seguida em tópico específico.

Em geral, os resultados de eficiência quântica potencial do fotossistema II de *Anemia flexuosa* e *Oryza sativa* são coerentes com as evidências de que, sob condições não fotoinibidoras, não há diminuição substancial da capacidade fotoquímica dos centros de reação,

medida pelo rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m), em uma faixa de variação de até 50% do conteúdo de água em relação ao valor máximo (LAWLOR; CORNIC, 2002). No entanto, esperamos que mecanismos de proteção do aparato fotossintético devam ser ativados durante o início da fase de desidratação em *Anemia flexuosa* para que a anabiose ocorra de forma viável. Além disso, o enrolamento dos folíolos durante o progresso da desidratação minimizaria a área foliar total exposta à luz contribuindo para a proteção do aparato fotossintético de *Anemia flexuosa*. O enrolamento da fronde durante a desidratação diminui o impacto da luz no tecido fotossintético (LEBKUECHER; EICKMEIER, 1991), minimizando a formação de radicais livres no interior foliar (SHERWIN; FARRANT, 1998; FARRANT, 2000). Portanto, a diminuição da área foliar exposta diminuiria a possibilidade de ocorrência de efeitos prejudiciais da luz em tecidos de *Anemia flexuosa* com baixo conteúdo de água.

2.4.3.1 Diminuição do potencial aparente de uso da luz em *Anemia flexuosa* durante as fases de desidratação e dessecação

Durante o ciclo completo de desidratação - reidratação foi evidenciada uma perda sutil no conteúdo de clorofila em *Anemia flexuosa*. Portanto, de forma geral, pode-se considerar que o conteúdo de clorofila foi mantido relativamente estável durante todo o experimento, caracterizando a homeoclorofilia (SHERWIN; FARRANT, 1998; FARRANT, 2000). Outras espécies homeoclorófilas tolerantes à dessecação também apresentaram diminuição moderada do conteúdo de clorofila durante o ciclo desidratação - reidratação (MARKOVSKA et al., 1994). Este nível de diminuição do conteúdo de clorofila poderia ocorrer devido a alterações irreversíveis em sua estrutura molecular produzidas pela luz. Os resultados mostraram que dentro do período de tempo de observação após a reidratação, não houve recuperação completa do nível inicial de clorofila.

O conteúdo de carotenóides totais, por sua vez, aumentou progressivamente durante a desidratação, indicando a função protetiva deste pigmento contra a luz durante o processo. O aumento observado provavelmente esteve associado à presença de luz, pois a extração de pigmentos fotossintéticos foi realizada somente em tecidos foliares que não foram impedidos de enrolar mas que foram mantidos na condição de luz durante a desidratação.

2.4.3.1.1 Efeitos da exposição à luz durante as fases de desidratação e dessecação sobre a fluorescência da clorofila

A diminuição de F_v/F_m para valores próximos de zero nos tratamentos de exposição à luz durante a fase de desidratação de *Anemia flexuosa*, ocorreu principalmente em função da extinção da fluorescência máxima (F_m), associada a uma diminuição de F_o em menor intensidade. Esta resposta indica a ativação de mecanismos dissipadores da energia de excitação associado a um impedimento fotoquímico nos FSII (BJÖRKMAN, 1987; HEBER et al., 2006).

2.4.3.1.2 Efeitos da exposição ao escuro contínuo durante as fases de desidratação e dessecação sobre a fluorescência da clorofila

A manutenção de valores estáveis de F_v/F_m ou apenas parcialmente menores após a desidratação e dessecação de plantas de *Anemia flexuosa* no escuro foi consequência da estabilidade de F_o associada a uma diminuição discreta de F_m . Isto deve corresponder à manutenção de um certo estado de exposição das clorofilas de maneira que continuaram a apresentar resposta de fluorescência máxima expressivamente maior do que a mínima mesmo após a desidratação completa. Esta resposta pode ser equiparada à verificada para *Oryza sativa* embora em uma faixa menos extrema de diminuição de seu conteúdo de água. Pode-se presumir que a similaridade de resposta obtida para *Oryza sativa* também ocorreu devido à manutenção de suas folhas em uma condição de escuro, uma vez que se enrolaram naturalmente proporcionando, provavelmente, uma condição similar de escurecimento do mesofilo comparável com a proporcionada para *Anemia flexuosa* durante toda a fase de desidratação. Este padrão de resposta para o sinal de fluorescência resultou na manutenção estável dos valores de F_v/F_m durante quase todo o período experimental, mas não deve indicar, a manutenção do reservatório de quinonas aceptoras primárias de elétrons no estado oxidado durante a condição de escuro, considerando o profundo grau de desidratação em que se encontravam os tecidos. Portanto, esta menor extinção da fluorescência máxima acima descrita indica uma menor concentração de centros extintores de fluorescência (DEMMIG-ADAMS; ADAMS, 1996), os quais, para os tratamentos de desidratação na luz, apresentaram-se funcionais, consistentemente com maiores valores de NPQ e, em menor extensão, de q_N . Desta forma, tanto *Anemia flexuosa* quanto *Oryza sativa* baseiam sua proteção contra a luz no enrolamento foliar, o que permitiria evitar, até certo limite dependendo da espécie, a interceptação de luz pela clorofila e, conseqüentemente, a ocorrência de

processos inibidores da capacidade de recuperação. Isto permitiria um prolongamento da conservação do tecido no estado viável sob deficiência hídrica. No entanto, exclusivamente em *Oryza sativa*, a desidratação extrema acabou por extinguir completamente estas respostas de fluorescência mínima e máxima, provavelmente devido ao rompimento generalizado de membranas esperado para uma espécie homeohídrica nos baixos níveis de conteúdo de água aqui considerados. Além disso, este efeito de perda de sinal de fluorescência em *Oryza sativa* coincidiu com o afrouxamento do padrão de enrolamento de suas folhas. Assim, a rápida taxa de perda do sinal de fluorescência desta espécie nos últimos dias experimentais esteve associada com a perda da capacidade de manutenção do enrolamento do tecido foliar. Isto poderia ter ocorrido devido à disfunções mecânicas dos componentes responsáveis pelo enrolamento foliar, possivelmente por perda da flexibilidade normalmente proporcionada por células buliformes. Estas disfunções poderiam ter sido responsáveis pelo afrouxamento do padrão de enrolamento observado nas folhas de *Oryza sativa* após certo grau de desidratação, o que teria resultado em uma maior exposição de suas superfícies à luz de maneira que processos de oxidação excessiva das clorofilas poderiam ter provocado a perda do sinal de fluorescência.

A manutenção de valores estáveis de Fv/Fm ou apenas parcialmente menores após a desidratação e dessecação de tecidos foliares já foi documentada em outras homeoclorófilas (MUSLIN; HOMANN, 1992; COOPER; FARRANT, 2002; PROCTOR; TUBA, 2002; FARRANT et al, 2009; FERNÁNDEZ-MARÍN et al., 2009; PROCTOR, 2010). Este estudo mostrou pela primeira vez evidências de que este padrão de resposta está associado ao regime de luz durante as fases de desidratação ou dessecação. A única tentativa de explicação para isto encontrada baseia-se na proposição não conclusiva de que poderia ser um padrão espécie-específico (PROCTOR, 2010).

2.4.3.1.3 Efeitos da exposição à luz exclusivamente durante a fase de dessecação sobre a fluorescência da clorofila

Plantas de *Anemia flexuosa* desidratadas no escuro e expostas à luz somente no estado dessecado também tiveram a eficiência quântica fotoquímica potencial completamente extinta, mas somente após a aplicação da luz a contar a partir do início da fase de dessecação. Essa evidência é coerente com a existência de mecanismos dissipadores de energia na planta dessecada. A aceitação desta idéia assume que a natureza de acionamento dos mecanismos de

dissipação seria passiva e modulada pela luz, uma vez que, neste caso, teria necessariamente ocorrido sob o estado de vitrificação do protoplasma onde processos dinâmicos seriam improváveis. Um mecanismo possível seria a ocorrência de mudanças conformacionais das moléculas do complexo antena.

O mecanismo exposto anteriormente pode estar relacionado ao verificado em líquenes, nos quais a extinção da fluorescência da clorofila e da separação de cargas dependente da luz durante a dessecação são interpretadas como indicadoras da ativação de mecanismos altamente efetivos de fotoproteção causados por mudanças conformacionais do complexo protéico-pigmentar fotossintético (HEBER, 2008). Sugere-se que remoção da água altere a estrutura da proteína bem como dos pigmentos ligados, formando centros de extinção de fluorescência. A presença da luz durante uma desidratação lenta afeta as mudanças estruturais permitindo considerável flexibilidade para a extensão da extinção da fluorescência. Durante a dessecação, a transferência normal de energia para centros de reação funcionais é substituída por dissipação de energia muito rápida dentro do sistema de pigmentos do complexo protéico, privando os centros de reação de energia. Estas mudanças favorecem a conversão da energia luminosa para a forma de calor em uma ordem de tempo de pico ou femtosegundo (HEBER, 2008).

Desta maneira, o aumento da suscetibilidade das amostras quando iluminadas exclusivamente durante o estado dessecado poderia estar relacionado ao acionamento de vias de dissipação de calor de menor efetividade, comparando-se com as amostras desidratadas sob condições de luz. Alternativamente, o resultado observado poderia ser decorrente, não do acionamento de centros de dissipação com papel protetivo, mas a partir da destruição das próprias clorofilas dos centros de reação devido ao uso da fluorescência como único meio de dissipação da energia de excitação. Podemos supor que os resultados obtidos poderiam ocorrer em condições de campo, uma vez que, ao se enrolar naturalmente durante a fase de desidratação, *Anemia flexuosa* deve impedir a interceptação da luz por grande parte de suas superfícies foliares. A partir daí, a manutenção do estado dessecado em condições de radiação direta, mesmo com a folha enrolada, poderia permitir certo grau de acionamento de vias de dissipação, mas também o acúmulo progressivo de substâncias oxidadas produzidas pela luz nas superfícies foliares em interação com a radiação, mesmo que restritas, quanto maior a duração da fase de dessecação. Com a reidratação, estas substâncias poderiam estender seus efeitos nocivos ao tecido com menor

capacidade de dissipação de calor e responder pelos efeitos de diminuição da capacidade total de recuperação conforme avaliada experimentalmente.

2.4.3.2 Recuperação do potencial de uso da luz após a reidratação de *Anemia flexuosa*

Os dados de eficiência quântica potencial dos fotossistemas II (Fv/Fm), em geral, mostraram uma baixa capacidade de recuperação de *Anemia flexuosa* após a reidratação de plantas intactas que foram expostas durante as fases de desidratação e dessecação à DFFF constante de 0, 100 ou 400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Esta baixa capacidade de recuperação de Fv/Fm, que indica um impedimento fotoquímico, não pôde ser claramente atribuída à influência da luz uma vez que o tratamento de escuro contínuo durante as fases de desidratação e dessecação resultou em valores semelhantes de Fv/Fm após a reidratação. Embora várias pteridófitas homeoclorófilas tolerantes à dessecação de ambientes sombreados apresentem efeitos fotoinibitórios causados pela aplicação de luz durante a fase de desidratação (MUSLIN; HOMANN, 1992; HIETZ; BRIONES, 2001; PROCTOR, 2003), a baixa capacidade de recuperação de *Anemia flexuosa* desidratada e dessecada no escuro não seria esperada, considerando a presunção de que seria uma espécie umbrófila.

A similaridade de recuperação final de Fv/Fm entre os tratamentos de desidratação na luz e no escuro de folhas impedidas de enrolar pode indicar que o método empregado para o impedimento do enrolamento foliar deve ter causado danos nas amostras, podendo ter mascarado os efeitos dos diferentes tratamentos luminosos. Desta forma, é possível que o impedimento do enrolamento foliar tenha sido responsável pela menor capacidade de recuperação observada, em geral, nos diferentes tratamentos luminosos. Esta interpretação é coerente com os resultados de Fv/Fm obtidos para folhas que se enrolaram naturalmente durante o processo de desidratação sob DFFF de 400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Nestas folhas, Fv/Fm foi significativamente maior em medidas pontuais após a reidratação do que nas folhas impedidas de se enrolar. No entanto, mesmo nas folhas enroladas naturalmente, Fv/Fm apresentou-se menor após a recuperação do que os valores obtidos nas condições iniciais. O menor valor de Fv/Fm em relação às condições iniciais obtido para as folhas que se enrolaram naturalmente também indicaria a ocorrência de fotoinibição. Desta maneira, a densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF) de 400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ poderia ter sido excessiva durante o período luminoso fotoperiódico ao longo das fases de desidratação e dessecação.

A capacidade de recuperação das amostras desidratadas na condição de escuro e expostas à condição de luz exclusivamente durante o estado dessecado foi menor comparada com as dos tratamentos que receberam luz durante estas duas fases, implicando na possibilidade de ocorrência de maior nível de danos no tecido nas plantas que foram iluminadas exclusivamente na fase dessecada. Essa evidência implicaria em uma aclimação de curto período em *A.flexuosa*. Nas plantas desidratadas na luz, um arranjo mais apropriado à exposição seria organizado antes do período de anabiose caracterizando a aclimação (SCHEIBE et al., 2005). Diante disto poderíamos presumir que a homeoclorófila *A.flexuosa* apresente um alto investimento em mecanismos preventivos da foto-oxidação ou teria uma alta capacidade de reparar alterações induzidas pela desidratação durante a reidratação.

Em contraste, as plantas de *A.flexuosa* mantidas no escuro durante a fase de desidratação e expostas à luz somente no estado dessecado poderiam apresentar um arranjo incompleto dos sistemas de dissipação que poderiam ser adequados à uma condição de sombra. As conseqüências desses danos foram evidenciadas durante a fase de reidratação, o que mostraria a ausência de aclimação durante o processo de preparo para a dessecação no tratamento em que a desidratação ocorreu no escuro e a dessecação na luz. Por outro lado, não foi evidenciada uma diminuição da capacidade de recuperação da eficiência fotoquímica nas plantas que foram mantidas durante as fases de desidratação e dessecação sob escuro contínuo comparando-se com aquelas que foram mantidas durante estas duas fases sob luz contínua, o que mostra a necessidade deste processo ser melhor investigado. De qualquer forma, a menor capacidade de recuperação de Fv/Fm de folhas de *A.flexuosa* desidratadas no escuro e mantidas dessecadas na luz não rejeita a pressuposição de que esta espécie, que ocorre em locais mais sombreados, de fato apresenta uma maior suscetibilidade à luz, pelo menos quando este fator ocorre exclusivamente durante o estado dessecado.

Os resultados obtidos para *Anemia flexuosa*, principalmente, mostram a essência desafiadora necessária para o desenvolvimento de métodos apropriados para a investigação da suscetibilidade intrínseca à inibição pela luz em tecidos vegetativos de diferentes tipos foliares. Isto também implica que a interpretação dos resultados deve sempre ser realizada com cautela neste tipo de investigação, com o objetivo de alcançarmos uma compreensão real sobre o assunto contribuindo para o desenvolvimento científico.

2.4.3.3 Trocas gasosas e funcionamento fotoquímico durante a fase de reidratação de *Pleurostima purpurea* e *Anemia flexuosa*

No caso de *Pleurostima purpurea*, conforme esperado, foi observada a completa recuperação do balanço positivo de carbono após a reidratação de plantas mantidas no estado dessecado por 42 dias. A dinâmica de recuperação do balanço positivo de carbono após a reidratação de órgãos vegetativos dessecados apresenta implicações importantes quanto à distribuição das espécies tolerantes à dessecação (EICKMEIER, 1979, 1980; HARTEN, EICKMEIER, 1987; ALPERT; OECHEL, 1987), permitindo uma vantagem competitiva associada à rápida exploração dos recursos quando a água está presente (OWOSEYE; SANFORD, 1972; MEGURO et al., 1977). A recuperação da assimilação de CO₂ esteve associada a valores levemente maiores de eficiência quântica efetiva comparando-se às condições iniciais do experimento em ambos tratamentos luminosos. Isto indicaria um aumento da eficiência de uso da luz em *Pleurostima purpurea*, que poderia ser uma consequência de um rearranjo ideal do aparato fotossintético sob as condições luminosas da reidratação. Além disso, durante esta fase, também foi observada uma maior condutância estomática média comparada às condições iniciais, assim como observado em um estudo prévio com *Pleurostima purpurea* (AIDAR et al, 2010). O aumento da condutância poderia estar relacionado a um aumento da condutividade hidráulica dos tecidos condutores, possivelmente com a participação de aquaporinas, cujo aumento de expressão já foi evidenciado em outras espécies tolerantes à dessecação (WILLIGEN et al., 2004). Uma maior condutância estomática durante a fase de reidratação seria vantajosa para a máxima interceptação de nutrientes (SARMIENTO; GOLDSTEIN; MEINZER, 1985).

Conforme explicado anteriormente, os dados de *Anemia flexuosa* referentes à gs e E na fase de recuperação não apresentam significado fisiológico. Os valores foram obtidos a partir de folhas contendo alguma quantidade de água livre em suas superfícies, o que resultou nos altos valores de gs e E observados. No início do experimento, algumas plantas sofreram acidentalmente o dobramento do pecíolo mas, mesmo assim, mantiveram a turgescência enquanto o substrato ainda apresentava água disponível. O experimento foi então conduzido normalmente, até a desidratação completa das plantas. A fase de reidratação foi realizada pulverizando água diretamente sobre as superfícies foliares bem como por meio da resaturação hídrica do substrato. Isto foi necessário devido à constatação de que mesmo as plantas intactas de *Anemia flexuosa* não

recuperavam o turgor foliar quando somente o substrato era reidratado. Isto evidenciou o comportamento ectohídrico da espécie (BUCH, 1945 apud PROCTOR; TUBA, 2002). No entanto, as folhas que apresentaram dobramento de pecíolo não foram capazes de manter a turgescência após a reidratação das plantas. Quando estas plantas eram colocadas no interior da câmara experimental, sob condição de ar seco, as folhas que sofreram dobramento de pecíolo tendiam a entrar em equilíbrio com o ar mesmo estando o substrato saturado de água. Por este motivo, todas as plantas passaram a ser mantidas com água livre em suas superfícies foliares por meio da aplicação de uma pulverização freqüente de água. Isto foi realizado para não permitir que ocorresse a desidratação de algumas folhas durante a fase de reidratação.

Os dados de assimilação de CO_2 de *Anemia flexuosa*, por sua vez, mostraram que somente as plantas submetidas à desidratação e dessecação sob luz contínua apresentaram uma recuperação, embora baixa, do balanço positivo de carbono. Aquelas que desidrataram e foram mantidas dessecadas no escuro contínuo apresentaram, aparentemente, a recuperação apenas de um estado de compensação do balanço de carbono. Já as plantas que desidrataram no escuro e foram mantidas na luz durante o estado dessecado estabeleceram um balanço negativo de carbono. Estes resultados evidenciariam o maior efeito prejudicial da luz quando esta foi aplicada exclusivamente durante o estado dessecado, em conformidade com os resultados de eficiência quântica obtidos. No entanto, a intensidade com que se deu a inibição da assimilação de CO_2 durante a fase de reidratação destes tratamentos, mostra o nível de limitação ao balanço de carbono no qual estas plantas poderiam estar submetidas durante o ciclo de desidratação – reidratação.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi levantada inicialmente a hipótese de que *Anemia flexuosa* poderia estar preferencialmente ausente de microsítios expostos, caracterizados por alta irradiância, devido a uma maior suscetibilidade à fotoinibição nesta condição que diminuiria sua capacidade de recuperação após a reidratação.

Os resultados obtidos indicaram uma maior capacidade de recuperação quando as plantas foram desidratadas na luz do que no escuro, indicando uma possível aclimação. Isto foi coerente com a maior suscetibilidade de *Anemia flexuosa* à fotoinibição quando foi exposta à luz exclusivamente durante o estado dessecado. Desta maneira, com relação à hipótese levantada, os resultados foram o inverso do esperado para homeoclorófilas típicas de ambientes sombreados. No entanto, podemos assumir que os dados obtidos não são conclusivos considerando que as diferenças de recuperação observadas, em geral, não foram tão óbvias.

A ocorrência de aclimação durante a desidratação de *Anemia flexuosa* na luz indicaria uma possível habilidade de colonização de ambientes intermediariamente expostos à luz. Além disso, a ocorrência de aclimação indicaria também sua necessidade de controle da taxa de perda de água dos tecidos vegetativos para indução à tempo de mecanismos de proteção. Como foi discutido, um maior déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar sob condição exposta à radiação solar direta poderia acelerar a taxa de desidratação de *Anemia flexuosa* além da necessária para permitir a indução dos mecanismos de proteção. Isto poderia ocorrer considerando a relativamente baixa resistência foliar de *Anemia flexuosa* à perda de água devido às suas características anatômicas. Neste sentido, os ambientes menos expostos em que *Anemia flexuosa* ocorre com maior frequência poderia corresponder à condição em que a taxa de desidratação de seus tecidos vegetativos ocorreria de forma compatível com sua necessidade de tempo para preparação para a anabiose. Além disso, de acordo com Alpert e Oechel (1987), a taxa e a frequência de dessecação de plantas tolerantes à dessecação seriam aspectos importantes na capacidade de manutenção de um balanço de carbono positivo por períodos de tempo mais prolongados em ambientes mais xéricos. Nestes ambientes, as plantas permaneceriam dessecadas e inativas metabolicamente a maior parte do tempo, exceto durante períodos de precipitação, conforme observado para briófitas tolerantes à dessecação (ALPERT; OECHEL, 1987). Desta maneira, mesmo que uma espécie tolerante à dessecação apresentasse a capacidade de ativar

mecanismos de proteção contra o excesso de luz durante a desidratação, os períodos de fotossíntese líquida seriam curtos e pouco frequentes, e sempre terminariam com a dessecação, aumentando a proporção de tempo no estado ativo sob baixo conteúdo de água que diminuiria o ganho líquido de CO₂ (ALPERT; OECHSEL, 1987). Desta maneira, podemos presumir que a conservação do aparato fotossintético e o comportamento ectohídrico foliar de *Anemia flexuosa* contribuam para o rápido estabelecimento de um balanço positivo de carbono com a reidratação.

A eficiência de uso da luz sob condições de disponibilidade de água poderiam também estar associadas à ocorrência preferencial de *Anemia flexuosa* em ambientes mais sombreados. Comparando-se com *Pleurostima purpurea*, a maior fotossíntese líquida em *Anemia flexuosa* sob condições de disponibilidade de água e baixa irradiância (100 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) é uma evidência de sua habilidade em colonizar ambientes sombreados. Sob irradiância mais alta (400 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$), *Anemia flexuosa* apresentou menor fotossíntese líquida comparada com *Pleurostima purpurea*. Estes resultados indicam a presença de características constitutivas em cada uma destas espécies que favorecem a colonização dos ambientes em que ocorrem com maior frequência: *Anemia flexuosa* em ambientes sombreados e *Pleurostima purpurea* em ambientes expostos.

Alternativamente, a habilidade de colonização de ambientes mais xéricos poderia também depender significativamente de outros aspectos fisiológicos ou de outros estágios do ciclo de vida além dos padrões de fotossíntese líquida (ALPERT; OECHSEL, 1987).

Nesta tese, a ampliação do número de parâmetros de análise fotossintética não intrusiva durante a desidratação, em relação à literatura, permitiu evidenciar a presença de mecanismos fotoprotetivos de dissipação de calor e, possivelmente, de drenagem de elétrons ainda não descritos para a espécie homeoclorófila *Anemia flexuosa* e para a peciloclorófila *Pleurostima purpurea*.

3.1 Conclusão

A homeoclorófila *Anemia flexuosa* ativa de mecanismos foto-protetivos de dissipação de calor durante a fase de desidratação.

O enrolamento foliar de *Anemia flexuosa* é uma forma de proteção contra a luz no estado dessecado.

Independentemente da condição de luz, a capacidade de recuperação de *Anemia flexuosa* após a reidratação é dependente do enrolamento foliar durante a desidratação.

Mesmo no estado dessecado ocorrem processos de interação dos fotossistemas II com a luz em *Anemia flexuosa*.

A absorção de água durante a reidratação de *Anemia flexuosa* ocorre diretamente pelas folhas.

A peciloclorófila *Pleurostima purpurea* baseia sua proteção contra a luz na ativação de processos de dissipação de calor, vias de consumo de elétrons diferentes do ciclo redutivo do CO₂ e, em última instância, na perda de clorofilas.

Plantas dessecadas de *Pleurostima purpurea* permanecem viáveis no estado desidratado por pelo menos 42 dias.

A recuperação do turgor da parte aérea de *Pleurostima purpurea* ocorre necessariamente pela absorção de água pelas raízes durante a reidratação.

REFERÊNCIAS

- AIDAR, S.T.; MEIRELLES, S.T.; POCIUS, O.; DELITTI, W.B.C.; SOUZA, G.M.; GONÇALVES, A.N. Desiccation tolerance in *Pleurostima purpurea* (Velloziaceae). Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/100329/?Content+Status=Accepted>>. Acesso em: 14 jul. 2010.
- ALPERT, P.; OECHSEL, W.C. Carbon balance limits the microdistribution of *Grimmia laevigata*, a desiccation-tolerant plant. **Ecology**, Washington, v. 66, n. 3, p. 660-669, 1985.
- ALPERT, P.; OECHSEL, W.C. Comparative patterns of net photosynthesis in an assemblage of mosses with contrasting microdistributions. **American Journal of Botany**, New York, v. 74, n. 12, p. 1787-1796, 1987.
- BAKER, N.R.; HORTON, P. Physiological factors associated with fluorescence quenching during photoinhibition. In: ARNTZEN, C.J.; KYLE, D.J.; OSMOND, C.B. (Ed.), **Topics in Photosynthesis**, v. 9, Amsterdam: p.145-168., 1987.
- BARTELS, D. Desiccation tolerance studied in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. **Integrative & Comparative Biology**, Berlin, v. 45, p. 696-701, 2005.
- BARTELS, D.; SCHNEIDER K.; TERSTAPPEN G.; PIATKOWSKI D.; SALAMINI F. Molecular cloning of ABA-modulated genes from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* which are induced during desiccation. **Planta**, Berlin, v.181, p.27-34, 1990.
- BARTHLOT, W.; POREMBSKY, S. Ecology and morphology of *Blosddfeldia liliputana* (Cactaceae): a poikilohydric and almost astomate succulent. **Botanica Acta**, Bohn, v. 109, p. 161-166, 1996.
- BEWLEY, J.D. Physiological aspects of desiccation-tolerance. **Annual Review of Plant Physiology**, California, v. 30, p. 195-238, 1979.
- BEWLEY, J. D.; OLIVER, M. J. Desiccation-tolerance in vegetative plant tissues and seeds: Protein synthesis in relation to desiccation and a potential role for protection and repair mechanisms. In: OSMOND, C.B.; SOMERO, G. (Ed.). **Water and Life: A comparative analysis of water relationships at the organismic, cellular and molecular levels**. Berlin: Springer-Verlag, 1992, p.141-160.
- BEWLEY, J.D.; KROCHKO, J.E. Desiccation-tolerance. In: LANGE O.L.; NOBEL P.S.; OSMOND C.B.; ZIEGLER, H. (Ed.). **Encyclopaedia of Plant Physiology: physiological ecology**. Berlin: Springer-Verlag, 1982. v. 12 b, chap. 10, p. 325-378.
- BJÖRKMAN, O. Low-temperature chlorophyll fluorescence in leaves and its relationship to photon yield of photosynthesis in photoinhibition. In: KYLE, D.J.; OSMOND, C.B.; ARNTZEN, C.J. (Ed.). **Topics in Photosynthesis, Photoinhibition**. Amsterdam: Elsevier, 1987, p. 123-145.

BROWNE, J., TUNNACLIFFE, A., BURNELL, A. Plant desiccation gene found in a nematode. **Nature**, London, v. 416, p. 38, 2002.

CAEMMERER, S.; FARQUHAR, G.D. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. **Planta**, Berlin, v. 153, p.376-387, 1981.

CASPER, C., EICKMEIER, W.G., OSMOND, C.B. Changes of fluorescence and xanthophyll pigments during dehydration in the resurrection plant *Selaginella lepidophylla* in low and medium light intensities. **Oecologia**, Berlin, v. 94, p. 528-533, 1993.

COLLETT, H.; BUTOWT, R.; SMITH, J; FARRANT, J; ILLING, N. Photosynthetic genes are differentially transcribed during the dehydration-rehydration cycle in the resurrection plant, *Xerophyta humilis*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.54, p.2593-2595, 2003

CONCEIÇÃO, A.A.; PIRANI, J.R. Delimitação de habitats em campos rupestres na Chapada Diamantina, Bahia: substratos, composição florística e aspectos estruturais. **Boletim da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 23, n.1, p. 85-111, 2005.

COOPER, K.; FARRANT, J.M. Recovery of the resurrection plant *Craterostigma wilmsii* from desiccation: protection vs repair. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, n.53, p.1805-1813, 2002.

DACE, H.; SHERWIN, H.W.; ILLING, N.; FARRANT, J.M. Use of metabolic inhibitors to elucidate mechanisms of recovery from desiccation stress in the resurrection plant *Xerophyta humilis*. **Plant Growth Regulation**, Netherlands, v. 24, p. 171-177, Aug. 1998.

DEMMIG-ADAMS, B. Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xanthophylls zeaxanthin. **Reviews on Bioenergetics, Biochimica & Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 124, p. 10-20, 1990.

DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS, W.W. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. **Trends in Plant Science**, London, v.1, p.21-26, 1996.

DEMMIG, B.; BJÖRKMAN, O. Comparison of the effect of excessive light on chlorophyll fluorescence (77 K) and photon yield of O₂ evolution in leaves of higher plants. **Planta**, Berlin, v.171, p.171-184, 1987.

DENG, X; HU, Z.A.; WANG, H.X.; WEN, X.G.; KUANG, T.Y. 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**, Amsterdam, v.165, n. 4, p. 851-861, Oct. 2003.

DICKINSON, W.C. **Integrative plant anatomy**. San Diego: Harcourt Academic Press, 2000, p. 337.

DIXON, H.H.; JOLY, J. On the ascent of SAP. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, London, v. 186, p. 563-576, Apr. 1894.

EICKMEIER, W.G. Photosynthetic recovery in the resurrection plant *Selaginella lepidophylla* after wetting. **Oecologia**, Berlin, v.39, p.93-106, 1979.

EICKMEIER, W.G. Photosynthetic recovery of resurrection spikemosses from different hydration regimes. **Oecologia**, Berlin, v.46, p. 380-385, 1980.

EICKMEIER, W.G. Photosynthetic recovery in the resurrection plant *Selaginella lepidophylla* (Hook. And Grev). Spring: effects of prior desiccation rate and mechanisms of desiccation damage. **Oecologia**, Berlin, v.58, p.115-120, 1983.

ELLENBERG, H.; MUELLER-DOMBOIS, D. A key to Raunkiaer life forms with revised subdivisions. In: MUELLER-DOMBOIS, D.; ELLENBERG, H. ed. **Aims and Methods of Vegetation Ecology**. New York: Wiley, 1967, p. 449-465.

FAHN, A.; CUTLER, D. **Xerophytes**, Berlin: Gebruder Borntraeger, 1992, p. 180.

FARRANT, J.M. Comparison of mechanisms of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plants. **Plant Ecology**, Netherlands, v. 151, p.29-39, 2000.

FARRANT, J.M., COOPER, K., KRUGER, L.A., SHERWIN, H.W. The effect of drying rate on the survival of three desiccation-tolerant angiosperm species. **Annals of Botany**, London, v. 84, p. 371-379, 1999.

FARRANT, JM; LEHNER, A; COOPER, K; WISWEDEL, S. Desiccation tolerance in the vegetative tissues of the fern *Mohria caffrorum* is seasonally regulated. **The Plant Journal**, Michigan, v. 57, p.65-79, Oct. 2009.

FARRANT, J.M., WILLIGEN, C.V., LOFFELL, D.A., BARTSCH, S., WHITTAKER, A. An investigation into the role of light during desiccation of three angiosperm resurrection plants. **Plant, Cell and Environment**, Logan, v. 26, n.8, p. 1275-1286, Aug. 2003.

FERNÁNDEZ-MARÍN, B.; BALAGUER, L.; ESTEBAN, R.; BACERRIL, J.M.; GARCÍA-PLAZAOLA, J. I. Dark induction of the photoprotective xanthophyll cycle in response to dehydration. **Journal of Plant Physiology**, Baltimore, v.166, p.1734-1744, Feb. 2009.

FLEXAS, J.; BOTA, J.; CORNIC, G., SHARKEY, T.D. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. **Plant Biology**, Netherlands, v. 6, p. 269-279, 2004.

GAFF, D.F. Desiccation-tolerant flowering plants in southern Africa. **Science**, New York, v. 174, p. 1033-1034, 1971

GAFF, D.F. Desiccation tolerant vascular plants of southern Africa. **Oecologia**, Berlin, v. 31, p. 95-109, 1977.

GAFF, D.F. Desiccation tolerant plants in South America. **Oecologia**, Berlin, v. 74, p. 133-136, 1987.

GAFF, D.F.; CHURCHILL, D.M. *Borya nitida* Labill.- an australian species in the Liliaceae with desiccation-tolerant leaves. **Australian Journal of Botany**, Victoria, v. 24, p. 209-224, Feb. 1976.

GAFF, D.F.; HALLAM, N.D. Resurrecting Desiccated Plants. In: BIELESKI, R.L.; FERGUSON, A.R.; CRESSWELL, M. M. (Ed.). **Mechanisms of regulation of plant growth**. Wellington: The Royal Society of New Zeland, 1974, p. 389-393. (Bulletin 12)

GENTY, B., BRIANTAIS, J.M., BAKER, N.R. The relationship between quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 990, p. 87-92, 1989.

GHASEMPOUR, H.R.; GAFF, D.F.; WILLIAMS, R.P.W.; GIANELLO, R.D. Contents of sugars in leaves of drying desiccation tolerant flowering plants, particularly grasses. **Plant Growth Regulation**, Netherlands, v. 24, p. 185-191, 1998.

GIARDI, M.T.; CONA, A.; GEIKEN, B.; KUCERA, T.; MAOJIDEK, J.; MATTOO, A.K. Long-term drought stress induces structural and functional reorganization of photosystem II. **Planta**, Berlin, v. 199, n.1, p. 118-125, May 1996.

GILDNER, B.S.; LARSON, D.W. Seasonal changes in photosynthesis in the desiccation-tolerant fern *Polypodium virginianum*. **Oecologia**, Berlin, v. 89, p. 383-389, Jan. 1992.

GILMORE, A.M.; YAMAMOTO, H.Y. Dark induction of zeaxanthin-dependent nonphotochemical fluorescence quenching mediated by ATP. **Proceedings of the National Academy of Science**, Stanford, v. 89, 1899-903, Mar. 1992.

HAMBLER, D.J. A poikilohydrous, poikilochlorophyllous angiosperm from Africa. **Nature**, London, v. 191, p. 1415-1416, 1961.

HARE, P.D.; CRESS, W.A.; VAN STADEN, J. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. **Plant Cell and Environment**, Canada, v. 21, p. 535-553, Jun.1998.

HARTEN, J.B.; EICKMEIER, W.G. Comparative desiccation tolerance of three desert pteridophytes: response to long-term desiccation. **The American Midland Naturalist**, Indiana, v. 118, n. 2, p. 337-347, Jan. 1987.

HEBER, U. Photoprotection of green plants: a mechanism of ultra-fast thermal energy dissipation in desiccated lichens. **Planta**, Berlin, v. 228, p. 641-650, 2008.

HEBER, U; LANGE, O-L, SHUVALOV, V.A. Conservation and dissipation of light energy by plants as complementary processes involved in sustaining plant life: homoiohydric and poikilohydric autotrophs. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, p. 1211-1223, Mar. 2006.

HETHERINGTON, S.E.; SMILLIE, R.M. Humidity-sensitive degreening and regreening of leaves of *Borya nitida* Labill. As followed by changes in chlorophyll fluorescence. **Australian Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 9, p. 587-599, Apr. 1982.

HIETZ, P.; BRIONES, O. Photosynthesis, Chlorophyll Fluorescence and Within-Canopy Distribution of Epiphytic Ferns in a Mexican Cloud Forest. **Plant Biology**, New York, v. 3, p. 279-287, May 2001.

IBISCH, P.L.; RAUER, G.; RUDOLPH, D.; BARTHLOTT, W. Floristic, biogeographical, and vegetational aspects of Pre-Cambrian rock outcrops (inselbergs) in eastern Bolivia. **Flora**, Amsterdam, v. 190, p. 299-314, 1995.

INGLE, R.A.; SCHMIDT, U.G.; FARRANT, J.M.; THOMSON, J.A.; MUNDREE, S.G. Proteomic analysis of leaf proteins during dehydration of the resurrection plant *Xerophyta viscosa*. **Plant Cell and Environment**, v. 30, p. 435-446, 2007.

ISHARA, K.L.; DÉSTRO, G.F.G.; MAIMONI-RODELLA, R.C.S., YANAGIZAWA, Y.A.N.P. Composição florística de remanescente de cerrado *sensu stricto* em Botucatu, SP. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 576-586, 2008.

KERSHAW, K. A. Physiological Ecology of Lichens. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, London, v. 66, p 267-267, 1985.

KIMENOV, G.P., MARKOVSKA, Y.K., TSONEV, T.D. Photosynthesis and transpiration of *Haberlea rhodopensis* Friv. in dependence on water deficit. **Photosynthetica**, Netherlands, v. 23, p. 368-371, 1989.

KITAJIMA, E.W.; LEITE, B. **Curso introdutório de microscopia eletrônica de Varredura**. 2 ed. Piracicaba: ESALQ; USP, 1999. p.46.

KOOTEN, O.V.; SNEL, J.F.H. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. **Photosynthesis Research**, Netherlands, v. 25, p. 147-150, 1990.

LATOWSKI, D.; GRZYB, J.; STRZALKA, K. The xanthophylls cycle - molecular mechanism and physiological significance. **Acta Physiologiae Plantarum**, Berlin, v. 26, n.2, p.197-212, jun. 2004.

LAWLOR, D.W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell and Environment**, Logan, v. 25, p. 275-294, Mar. 2002.

LEBKUECHER, J.G.; EICKMEIER, W.G. Reduced photoinhibition with stem curling in the resurrection plant *Selaginella lepidophylla*. **Oecologia**, Berlin, v.88, n. 4, p.597-604, Dec.1991.

LEBKUECHER, J.G.; EICKMEIER, W.G. Physiological benefits of stem curling for resurrection plants in the field. **Ecology**, Washington, v.74 , n. 4, p. 1073-1080, Jun. 1993.

LEVITT, J. The nature of stress injury and resistance. In: LEVITT, J. **Physiological ecology i, responses of plants to environmental stresses**. 2nd ed. Orlando, Florida: Academic Press, 1980. chap. 2, v.1: Chilling, freezing and high temperature stresses. p. 10-19.

LICHTENTHALER, H.K.; WELLBURN, A.R. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. **Biochemical Society Transactions**, Norwich, v. 11, p. 591-592, 1983.

MARKOVSKA, Y., TSONEV, T., KIMENOV, G., TUTEKOVA, A.A. Physiological changes in higher poikilohydric plants *Haberlea rhodopensis* Friv. and *Ramonda serbica* Panc. during drought and rewatering at different light regimes. **Journal of Plant Physiology**, Baltimore, v. 144, p.100-108, 1994.

MEDRANO, H.; ESCALONA, J.M.; BOTA, J.; GULIAS, J.; FLEXAS, J. Regulation of photosynthesis of C3 plants in response to progressive drought: stomatal conductance as a reference parameter. **Annals of Botany**, Oxford, v. 89, p. 895-905, Feb. 2002.

MEGURO, M.; JOLY, C.A.; BITTENCOURT, M.M. Stress hídrico e alguns aspectos do comportamento fisiológico em *Xerophyta plicata* Spreng. - Velloziaceae. **Boletim de Botânica**, São Paulo, v. 5, p. 27-42, 1977.

MEIRELLES, S.T. **Ecologia da Vegetação de Afloramentos Rochosos do Litoral Sudeste**. Ano. 263 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia). Universidade de Campinas, Campinas, 1990.

MEIRELLES, S.T.; MATTOS, E.A.; SILVA, A.C. Potencial desiccation tolerant vascular plants from southeastern Brazil. **Polish Journal of Environmental Studies**, Poland, v. 6, p. 17-21, Jan. 1997.

MEIRELLES, S.T.; PIVELLO, V.R.; JOLY, C.F. The vegetation of granitic rock outcrops in Rio de Janeiro, Brazil, and the need for its protection. **Environmental Conservation**, Cambridge, v. 26, p. 10-20, Dec. 1999.

MENEZES, N.L. Re-establishment of genus *Pleurostima* Rafinesque (Velloziaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, v. 3, p. 37-47, Nov. 1980.

MOORE, J.P.; LINDSEY, G.G.; FARRANT, J.M.; BRANDT, W.F. An overview of the biology of the desiccation-tolerant resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia*. **Annals of Botany**, Oxford, v. 99, p. 211-217, Mar. 2007.

MORELLO, J. Ecologia de una planta reviviscente de la caatinga. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 83, p. 83-108, Apr. 1954.

MUSLIN, E.H.; HOMANN, P.H. Light as a hazard for the desiccation-resistant 'resurrection' fern *Polypodium polypodioides* L. **Plant, Cell and Environment**, Logan, v. 15, p. 81-89, Jul. 1992.

NIELSEN, E.T.; ORCUTT, D.M. **Physiology of plants under stress: abiotic factors**. New York: Wiley, 1996. p. 704

OLIVER, M.J. Desiccation tolerance in vegetative plant cells. **Physiologia Plantarum**, Denmark, v. 97, p. 779-787, Sep.1996.

OLIVER, M.J.; BEWLEY, J.D. Desiccation-tolerance of plant tissues: A mechanistic overview. In: JANICK, J. (Ed.). **Horticultural Reviews**. New York: John Wiley, 1997. v. 18, chap. 3, p. 171-213.

OLIVER, M.J.; WOOD, A.J.; O'MAHONY, P. To dryness and beyond – preparation for the dried state and rehydration in vegetative desiccation-tolerant plants. **Plant Growth Regulation**, Netherlands, v. 24, p. 193-201, Mar. 1998.

OSMOND, C.B. What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. In: BAKER, N.R.; BOWYER, J.R. (Ed). **Photoinhibition of Photosynthesis, from molecular mechanisms to the field**. Lancaster, UK: Bios Scientific Publishers, 1994, chap. 1, p. 1-24.

OSMOND, C.B.; RAMUS, J.; LEVAVASSEUR, G.; FRANKLIN, L. HENLEY, N.J. Fluorescence quenching during photosynthesis and photoinhibition of *Ulva rotundata* Blid. **Planta**, Berlin, n.190, p. 91-106, Aug. 1993.

OWOSEYE, J.A.; SANFORD, W.W. An ecological study of *Vellozia schnitzleinia*, a drought-enduring plant of northern Nigeria. **Journal of Ecology**, London, v. 60, p. 807-817, Jul. 1972.

PARRY, M.A.J; ANDRALOJC, P.J.; KHAN, S.; LEA, P.J.; KEYS, A.J. Rubisco activity: effects of drought stress. **Annals of Botany**, Oxford, v. 89, p. 833-839, Oct. 2002.

PFÜNDEL, E.E.; RENGANATHAN, M.; GILMORE, A.; YAMAMOTO, H.; DILLEY, R.A. Intrathylakoid pH in isolated pea chloroplasts as probed by violaxanthin de-epoxidation. **Plant Physiology**, Baltimore, v.106, p. 1647-1658, Dec.1994.

POREMBSKY, S.; BARTHLOT, W. Granitic and gneissic outcrops (inselbergs) as centers of diversity for desiccation-tolerant vascular plants. **Plant Ecology**, Netherlands, v. 151, p. 19-28, 2000.

PROCTOR, M.C.F. Comparative Ecophysiological Measurements on the light responses, water relations and desiccation tolerance of the film ferns *Hymenophyllum wilsonii* Hook. and *H. tunbrigense* (L.) Smith. **Annals of Botany**, Oxford, v.91, p.717-727, Mar. 2003.

PROCTOR, M.C.F. Recovery rates of chlorophyll-fluorescence parameters in desiccation-tolerant plants: fitted logistic curves as a versatile and robust source of comparative data. **Plant Growth Regulation**, Publish on line: 24 Feb. 2010. In press.

PROCTOR, M.C.F.; TUBA, Z. Poikilohydry and homoihydry: antithesis or spectrum of possibilities? **New Phytologist**, Oxford, v.157, p. 357-349, 2002.

QUARTACCI, M.F., GLISIC, O., STEVANOVIC, B., NAVARI-IZZO, F. Plasma membrane lipids in the resurrection plant *Ramonda serbica* following dehydration and rehydration. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 378, p. 2159-2166, 2002.

RASCIO, N.; LA ROCCA, N. Resurrection plants: the puzzle of surviving extreme vegetative desiccation. **Critical Reviews in Plant Sciences**, New York, v. 24, p. 209-225, 2005.

SALINO, A.; ALMEIDA, T.E. Diversidade e conservação das pteridófitas na Cadeia do Espinhaço, Brasil. In: SILVA, J.M.C. (Ed.). **Megadiversidade. Cadeia do Espinhaço: avaliação do conhecimento científico e prioridades de conservação**. Conservação Internacional, Brasil. v. 4, n. 1/2, p. 50-70, Dez. 2008.

SÁNCHEZ, S.; ESPINOZA, A.M. Ultrastructure of *Oryza glumaepatula*, a wild rice species endemic of tropical America. **Revista de Biología Tropical**, La Paz, v. 53, n. 1/2, p.15-22, Mar-Jun., 2005.

SÁNCHEZ, E.; MONTIEL, M.; ESPINOZA, A.M. Ultrastructural morphologic description of the wild rice species *Oryza latifolia* in Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**, La Paz, v.51, n.2, p.345-354, 2003.

SARMIENTO, G.; GOLDSTEIN, G.; MEINZER, F. Adaptative strategies of woody species in neotropical savannas. **Biological Review**, Cambridge, v. 60, p. 315-355, Sep. 1985.

SCHEIBE, R.; BACKHAUSEN, J.E.; EMMERLICH, V.; HOLTGREFE, S. Strategies to maintain redox homeostasis during photosynthesis under changing conditions, **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 416, p. 1481-1489, Jun. 2005

SCHNEIDER, H.; WISTUBA, N.; WAGNER, H.J.; THÜRMER, F.; ZIMMERMANN, U. Water rise kinetics in refilling xylem after desiccation in a resurrection plant. **New Phytologist**, Oxford, v. 148, p. 221-238, 2000.

SCHREIBER, U.; BILGER, W. Rapid assessment of stress effects on plant leaves by chlorophyll fluorescence measurements. In: Tenhunen, J.D., Catarino, F.M., Lange, O.L., Oechel, W.D. (eds.) *Plant Response to Stress*. Springer, Berlin, 1987, p. 27-53.

SCHWAB, K.B.; SCHREIBER, U.; HEBER, U. Responses of photosynthesis and respiration of resurrection plants to desiccation and rehydration. **Planta**, Berlin, v. 177, p.217-227, Mai. 1989.

SHERWIN, H.W., FARRANT, J.M. Rehydration of three desiccation-tolerant species. **Annals of Botany**, Oxford, v. 78, p. 703-710, 1996.

SHERWIN, H.W., FARRANT, J.M. Protection mechanisms against excess light in the resurrection plants *Craterostigma wilmsii* and *Xerophyta viscosa*. **Plant Growth Regulation**, Netherlands, v. 24, p. 203-210, 1998.

SHERWIN, H.W.; PAMMENTER, N.W.; FEBRUARY, E.D.; WILLIGEN, C.V.; FARRANT, J.M. Xylem hydraulic characteristics, water relations and wood anatomy of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolius* Welw. **Annals of Botany**, Oxford, v. 81, p. 567-575, 1998.

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and dessiccation. **New Phytologist**, Oxford, v. 125, p. 27-58, Feb. 1993.

SMITH, D.C.; MOLESWORTH, S. Lichen Physiology. XIII. Effects of rewetting dry lichens. **New Phytologist**, Oxford, v. 72, p. 525-533, 1973.

STUART, T.S. Revival of respiration and photosynthesis in dried leaves of *Polypodium polypodioides*. **Planta**, Berlin, 1968, v. 83, p. 185-206, Feb. 1968.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 3rd ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2002.

TAKIZAWA, K. CRUZ, J.A.; KANAZAWA, A.; KRAMER, D.M. The thylakoid proton motive force in vivo. Quantitative, non-invasive probes, energetic, and regulatory consequences of light-induced *pmf*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1767, n.10, p. 1233-1244, Oct. 2007.

TRYON, R.M.; TRYON, A.F. Schizaeaceae. In: TRYON, R.M.; TRYON, A.F. **Ferns and Allied Plants with Special References to Tropical America**. New York: Springer-Verlag, 1982, chap. 4, p. 58-83.

TUBA, Z. Notes on the poikilochlorophyllous desiccation-tolerant plants. **Acta Biologica Szegediensis**, Hungary, v. 52, p. 111-113, 2008.

TUBA, Z.; PROCTOR, M.C.F.; CSINTALAN, Z. Ecophysiological responses of homoiochlorophyllous and poikilochlorophyllous desiccation tolerant plants: a comparison and an ecological perspective. **Plant Growth Regulation**, Netherlands, v. 24, p. 211-217, 1998.

TUBA, Z.; LICHTENTHALER, H.K.; CSINTALAN, Z.; PÓCS, T. Regrenning of desiccated leaves of the poikilochlorophyllous *Xerophyta scabrida* upon rehydration. **Journal of Plant Physiology**, Baltimore, v. 142, p. 103-108, 1993a.

TUBA, Z.; LICHTENTHALER, H.K.; MAROTI, I.; CSINTALAN, Z. Resynthesis of thylakoids and functional chloroplasts in the desiccated leaves of the poikilochlorophyllous plant *Xerophyta scabrida* upon rehydration. **Journal of Plant Physiology**, Baltimore, v. 142, p. 742-748, 1993b.

TUBA, Z.; LICHTENTHALER, H.K.; CSINTALAN, Z.; NAGY, Z.; SZENTE, K. Reconstitution of chlorophylls and photosynthetic CO₂ assimilation upon rehydration of the desiccated poikilochlorophyllous plant *Xerophyta scabrida* (Pax) Th. Dur. Et Schinz. **Planta**, Berlin, v. 192, p. 414-420, 1994.

TUBA, Z.; SMIRNOFF, N.; CSINTALAN, Z.; SZENTE, K.; NAGY, Z. Respiration during slow desiccation of the poikilochlorophyllous desiccation tolerant plant *xerophyta scabrida* at present day CO₂ concentration. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, France, v.35, p. 381-386, 1997.

TURNER, N.C. Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 58, p. 339-366, 1981.

TYREE, M.T., J.S. SPERRY. Do woody plants operate near the point of catastrophic xylem dysfunction caused by dynamic water stress? Answers from a model. **Plant Physiology**, Baltimore, v. 88, p. 574-580, 1988.

TYREE, M.T.; DAVIS, S. D.; COCHARD, H. Biophysical perspectives of xylem evolution: Is there a tradeoff of hydraulic efficiency for vulnerability to dysfunction. **International Association of Wood Anatomists Journal**, Netherlands, v. 15, n.4, p. 335-360, 1994.

VEERMAN, J.; VASIL'EV, S.; PATON, G. D.; RAMANAUSKAS, J.; BRUCE, D. Photoprotection in the lichen, *Parmelia sulcata*. The origins of desiccation induced fluorescence quenching. **Plant Physiology**, Baltimore, v. 145, p.997-1005, Sep. 2007.

VERTUCCI, C.W.; FARRANT, J.M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Ed.). **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995, chap. 10, p. 237-271.

WAGNER, H.J.; SCHNEIDER, H.; MIMIETZ, S.; WISTUBA, N.; ROKITTA, M.; KROHNE, G.; HAASE, A.; ZIMMERMANN, U. Xylem conduits of a resurrection plant contain a unique lipid lining and refill following a distinct pattern after desiccation. **New Phytologist**, Oxford, v. 148, p. 239-255, 2000.

WALKER, D. Fluorescence. In: WALKER, D. **The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis**. Sheffield: Research Institute for Photosynthesis, 1987. Part B, p. 17-46.

WALTER, H.; STADELMANN, E. The physiological prerequisites for the transition of autotrophic from water to terrestrial life. **BioScience**, Maryland, v. 18, n.7, p. 694-701, 1968.

WATKINS, J.E.; MARCK, M.C.; THOMAS, R.S.; MULKEY, S.S. Ecological and evolutionary consequences of desiccation tolerance in tropical fern gametophytes. **New Phytologist**, Oxford, v.176, p.708-717, Jun. 2007.

WILLIAMS, R.J.; LEOPOLD, A.C. The glassy state in corn embryos. **Plant Physiology**, Baltimore, v. 89, p. 977-981, 1989.

WILLIGEN, C.V., PAMMENTER, N.W., MUNDREE, S.G.; FARRANT, J.M. Some physiological comparisons between the resurrection grass, *Eragrostis nindensis*, and the related desiccation-sensitive species, *E. curvula*. **Plant Growth Regulation**, Netherlands, v. 35, p. 121-129, 2001.

WILLIGEN, C.V.; PAMMENTER, N.W.; MUNDREE, S.G.; FARRANT, J.M. 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**, Oxford, v. 55, n. 397, p. 651-661, Mar. 2004.

WILSON, A.; AJLANI, G.; VERBAVATZ, J.-M.; VASS, I.; KERFELD, C.A.; KIRILOVSKY, D. A soluble carotenoid protein involved in phycobilisome-related energy dissipation in Cyanobacteria. **The Plant Cell**, Stanford, v. 18, p. 992-1007, Mar. 2006.

YANG, W.L., HU, Z.A., WANG, H.X., KUANG, T.Y. Photosynthesis of Resurrection Angiosperms. **Acta Botanica Sinica**, Pekin, v. 45, n. 5, p. 505-508, Sep. 2003.

YORDANOV, I.; TSONEV, T.; GOLTSEV, V.; KRULEVA, L. Interactive effect of water deficit and high temperature on photosynthesis of sunflower and maize plants. 1 – Changes in parameters of chlorophyll fluorescence induction kinetics and fluorescence quenching. **Photosynthetica**, Netherlands, v. 33, n. 4/4, p.391-402, 1997.

ZHANG, R.; SHARKEY, T.D. Photosynthetic electron transport and proton flux under moderate heat stress. **Photosynthesis Research**, Netherlands, v. 100, p. 29-43, 2009.

ZIMMERMANN, U.; WAGNER, H.-J.; SZIMTENINGS, M.; SCHNEIDER, H.; HAASE, A. Restoration of the hydraulic system in a resurrection plant: fitting the theory with facts. **New Phytologist**, Oxford, v. 151, n.2, p. 314-317, Aug. 2001.

ZIVKOVIC, T.; QUARTACCI, M.F.; STEVANOVIC, B.; MARINONE, F.; NAVARI-IZZO, F. Low-molecular weight substances in the poikilohydric plant *Ramonda serbica* during dehydration and rehydration. **Plant Science**, Amsterdam, v. 168, p. 105-111, 2005.

ANEXO

Desiccation tolerance in *Pleurostima purpurea* (Velloziaceae)

S. T. Aida · S. T. Meirelles · O. Pocius ·
W. B. C. Delitti · G. M. Souza · A. N. Gonçalves

Received: 30 June 2009 / Accepted: 4 June 2010
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

Abstract Previous works suggested that *Pleurostima purpurea* (Velloziaceae—Barbacenioidae) shows a remarkable capacity to endure desiccation of its vegetative tissues. *P. purpurea* occurs in monocotyledons mats on soil islands in the Pão de Açúcar (Sugar Loaf) one of the most recognizable rock outcrops of the world, in Rio de Janeiro, southeastern Brazil. Mats of *P. purpurea* occur in cliffs by the sea some meters above the tidal zone. Although living in rock outcrops almost devoid of any soil cover, *P. purpurea* seems to occur preferably on less exposed rock faces and slightly shady sites. Usually, less extreme adaptations to drought would be expected in plants with the habitat preference of *P. purpurea*. Relying on this observation, we argue if a combination of different strategies of dealing with low water availability can be found in *P. purpurea* as on other desiccation tolerant angiosperms. This study aims to examine the occurrence of desiccation tolerant behavior in *P. purpurea* together with the expression of drought avoidance mechanisms during dehydration progression. For this, it

was analyzed the gas exchanges, leaf pigments and relative leaf water content during desiccation and rehydration of cultivated mature individuals. *P. purpurea* behaved like typical drought avoiders under moderated drought condition with stomatal closure occurring around a relative leaf water content up to 90%. During this process, it was observed a delay in the leaf relative water content (RWC_{leaf}) decrease comparing to the plant-soil relative water content ($RWC_{plant-soil}$). As soil dehydration worsened, gas exchanges restrictions progressed until a lack of activity which characterizes anabiosis. The loss of chlorophyll occurs before the end of total dehydration, characterizing the presence of poikilochlorophylly. The chlorophyll degradation follows the RWC_{leaf} decrease, which achieved the minimum average value of 17% without incurring in leaf abscission. The chlorophyll re-synthesis seems to start well after the full rehydration of the leaf. During all of this process, carotenoid content remained stable. These results are coherent with a combination of drought avoidance and desiccation tolerance in *P. purpurea* which seems to be coherent with the amplitude of water availability in the rock outcrop habitat where it occurs, suggesting that the periods of water availability are sufficiently long for the success of the costly desiccation tolerant behavior but too short to make a typical drought avoider species win the competition for exploring the rock outcrop substrate where *P. purpurea* occurs.

S. T. Aida (✉)

Departamento de Ciências Biológicas, Escola Superior de
Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo,
Av. Pádua Dias, 11, Piracicaba, SP 13418-900, Brazil
e-mail: staidar@esalq.usp.br

S. T. Meirelles · O. Pocius · W. B. C. Delitti

Departamento de Ecologia Geral, Instituto de Biociências,
Universidade de São Paulo, São Paulo, SP 05508-090, Brazil

G. M. Souza

Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade do Oeste Paulista,
Presidente Prudente, SP 19067-175, Brazil

A. N. Gonçalves

Departamento de Ciências Florestais, Escola Superior de
Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo,
Piracicaba, SP 13418-900, Brazil

Keywords Velloziaceae · Poikilohydry ·
Poikilochlorophylly · Drought resistance · Rock outcrops

Introduction

Desiccation tolerance, conceived of as the ability to withstand equilibrium of the living tissues with the atmosphere

in conditions of low relative humidity, is a rare attribute in angiosperms. Although the first report of desiccation tolerance in angiosperms can be traced back to the beginning of the twentieth century, most of the knowledge regarding this phenomenon has been acquired in the last two decades (Kimenov et al. 1989; Farrant 2000; Cooper and Farrant 2002; Quartacci et al. 2002; Alpert and Oliver 2002; Farrant et al. 2003; Röhrig et al. 2006; Kappen and Valladares 1999; Tuba 2008; Georgieva et al. 2008; Vicré et al. 2004), indicating that there is still much to be learned.

In Brazil, the existence of desiccation-tolerance in angiosperms was first reported in a study of *Xerophyta plicata* (*Nanuza plicata*) conducted by Meguro et al. (1977). Some Brazilian species were included in a list of desiccation tolerant plants from South America, published by Gaff (1987). Another extensive list of desiccation-tolerant plants was presented by Meirelles et al. (1997), including 30 species from various locations in Brazil mainly on rock substrates. All the plants on the Meirelles et al. (1997) list were regarded as “potentially” tolerant, because most evidence relies on single or few aspects related to desiccation tolerance, such as recovery of growth after reaching less than 1% leaf water content, regaining of chlorophyll in leaves of poikilochlorophyllous species and recovery of growth after equilibrium with near 0% RH atmospheres, together with contraction of leaf surfaces, along with changes in color and texture. These changes occur during dry periods in natural conditions or under induced equilibrium with low relative humidity in controlled environments. In desiccation-tolerant species, the normal appearance of leaves was always recovered upon rehydration, and that ability was taken as strong evidence of desiccation tolerance.

Most desiccation-tolerant angiosperms presented in the Meirelles et al. (1997) survey belong to Velloziaceae. Some African members of this family have already been identified as desiccation tolerant (Gaff 1971, 1977; Owoseye and Sanford 1972; Sherwin and Farrant 1996, 1998; Dace et al. 1998; Gaff and Hallam 1974; Tuba et al. 1993a, b, 1994, 1998). Almost all species described as potentially desiccation-tolerant thrive on rocky outcrops. This hostile environment shows a combination of high exposure and extreme water deficit which seems to favor the desiccation tolerant strategy in plants (Porembski and Barthlott 2000).

One of the remarkable inhabitants of rock outcrops near the famous Pão de Açúcar (Sugar Loaf Mountain) in Rio de Janeiro is the Velloziaceae *Pleurostima purpurea* (Rafinesque). Plant clumps forming “soil islands” on these outcrops are composed mostly of individuals of *P. purpurea* (Meirelles et al. 1999) and occur from the most humid and shaded habitats to the totally exposed bare rock, usually on the south-facing slopes of the outcrop which, in the southern hemisphere, are less exposed to solar radiation.

During dry spells, plant clumps of *Pleurostima purpurea* dry out, and its leaves look yellowish and rolled-up. This condition makes apparent the “poikilochlorophyllous” behavior (Hamblen 1961) associated with desiccation tolerance in this angiosperm. Since *P. purpurea* plants occur in what seems to be a relatively humid habitat, we argued if the desiccation-tolerant behavior would always be an advantage as an efficient pattern of carbon acquisition in less extreme conditions of exposure and drought. That condition would favor a combination of drought avoidance during short dry spells and desiccation tolerance, during extended drought periods. Thus, we aim to detect and describe the dynamics of the drought resistance responses, trying to detect different strategies in *P. purpurea*.

Materials and methods

Mature *Pleurostima purpurea* plants were grown from seeds collected in natural populations from Morro da Urca, near Pão de Açúcar (Sugar Loaf Mountain) in Rio de Janeiro, Brazil. The experimental units were constituted of 7-year-old plants, growing in pots containing 5 liters of commercial substrate made of turf and vermiculite (Plantmax®). Plants were maintained outside greenhouse and watered daily except for erratically applied desiccation episodes. Fertilization with 10-10-10 NPK with micronutrients was applied 2 times a year. Collections of 30 plants were randomly chosen for the experimental and control groups in a completely randomised design. Prior to watering cessation, plants were irrigated daily. All measurements were done from 09:00 to 11:00 a.m. when temperature, atmosphere relative humidity, and photosynthetic photon flux density varied from 25 to 33°C, 40–65%, and 1,600–2,200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD, respectively. The experiments were conducted between July and August 2005.

The soil dehydration was induced by watering cessation. A control group was maintained in conditions of regular water availability by daily irrigation. The measurements were done on days 0, 2, 3, 4, 8, 9, 11, 12, 14, 16, and 20 after watering cessation, and 0, 12, 36, 84 and 132 h after restoring the irrigation regime, which fell on days 20, 21, 22, 24, and 26. In each period during the dehydration process, three replicates were chosen for measurements of plant and soil water status, gas exchanges and leaf pigments. The three replicates consisted of leaf samples from three different apices in three potted plants. Leaf samples consisted of 2 cm long pieces taken from the middle of the first fully expanded leaf. These pieces were used for measurement of water status and pigment content. The excised pieces corresponded to the part of intact leaf inserted in the leaf chamber of the portable photosynthesis

analyzer (LI-6400) so as to relate all the measurements to the estimated gas exchange parameters. The leaf pieces were divided longitudinally through the middle vein to allow related measurements of leaf water status and pigment content.

Leaf water status as soil water status were evaluated using relative water content (RWC) formula (Turner 1981) for the leaf pieces (RWC_{leaf}) and the plant-soil units ($RWC_{\text{plant-soil}}$), respectively. These parameters were estimated as the weight of the fully watered leaf piece or plant-soil unit (saturated, “turgid” weight, TW), in relation to the lowest constant weight attained for these samples after watering withdrawal (“dry” weight, DW). The relative water content was estimated by the “fresh” weight minus the “dry” weight divided by the “turgid” weight minus “dry” weight, and the result multiplied by 100:

$$RWC(\%) = \frac{(FW - DW)}{(TW - DW)} \times 100$$

Leaf piece instantaneous fresh weight (FW_{leaf}) was taken before saturation, attained by floating on distilled water (TW_{leaf}). Leaf dry weight (DW_{leaf}) was measured after oven drying overnight at 80°C. The $RWC_{\text{plant-soil}}$ is only an approximate value to have a reference of the water lost during the dehydration process. The fully watered plant-soil weight ($TW_{\text{plant-soil}}$) was taken after dipping the potted plant in water for 3 h and draining for 6 h. The instantaneous weight during the dehydration treatment was considered the fresh weight ($FW_{\text{plant-soil}}$) of the potted plant. The minimum plant-soil dry weight ($DW_{\text{plant-soil}}$) was obtained after constant weight when dehydration was concluded.

The soil amount in each pot weighed more than a hundred times the plant fresh weight allowing us to consider $RWC_{\text{plant-soil}}$ a good approximation of the availability of soil water. Even then, we considered $RWC_{\text{plant-soil}}$ not to be independent of the plant water status and was taken as an index to compare with other parameters.

For pigment analysis, the leaf pieces were incubated in 96% alcohol in a water bath at 75°C for 5 min and then transferred to ice-water bath at 4°C, always in darkness or handled under green light to prevent chlorophyll degradation. The extracts were centrifuged for 5 min at 3,000 rpm or until a clear solution was achieved. Chlorophyll and carotenoid concentration in the supernatant were estimated according to Lichtenthaler and Wellburn (1983). Pigment content was calculated for mass of leaf dry weight, using the estimated ratio between leaf fresh weight and dry weight obtained for the other half.

Gas exchange measurements were made with a LI-6400 Portable Photosynthesis System (LI-COR, USA). Parameters such as net photosynthesis (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), transpiration (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), stomatal water vapor conductance (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) and intercellular and

air CO_2 concentration (C_i and C_a , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol air}^{-1}$) were obtained according to the equations described by Caemmerer and Farquhar (1981).

Light response curves were done on the 2nd, 8th and 11th days of the desiccation induction and the 4th day of the recovery experiment. Photosynthesis (A) was measured as a function of the photosynthetic photon flux density (PPFD, $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) using one of the three sampled leaves of the three individuals sampled daily in the control and experimental groups. Light compensation point (LCP, $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) and apparent photosynthetic quantum yield (Φ_a) were estimated by fitting the light response curve to a non-rectangular hyperbola function according to Potvin et al. (1990). Curve fitting was performed using the software Origin 5.0 (Microcal Software, Northampton, USA).

Results

Dehydration

The plant-soil water content ($RWC_{\text{plant-soil}}$) decreased steadily after watering withdrawal, reaching its lowest value around the 16th day of experimental induction of drought. The control group showed soil-plant relative water content around 96% throughout that period (Fig. 1).

The leaf relative water content (RWC_{leaf}) was above 90% during the first 9 days without watering, followed by a decrease to an average value of 17.04% until the 20th day (Fig. 1), which coincides with rolling and changes in color and toughness of leaves without abscission. The most

Fig. 1 Time progression of Relative Water Content of “pots” ($RWC_{\text{plant-soil}}$) and leaf pieces (RWC_{leaf}) of *P. purpurea* after irrigation withdrawal. Squares—plant-soil (pot) RWC; triangles—leaf sections RWC. Open symbols—experimental; solid symbols—control group. Vertical bars—standard deviation. Linear regression of control group data is presented as dotted line. Vertical dotted line marks the moment of rehydration in desiccated plants

intense leaf dehydration period started at an average $RWC_{\text{plant-soil}}$ below 20%, which corresponds to a time break in slope of the water-loss curve attributable to a water conserving mechanism.

Re-watering induced recovery to a fully saturated state in the leaves. After 12 h, RWC_{leaf} reached 95.65%, which improved to 98% after 36 h, attaining values found in the control group. The leaves unrolled and acquired normal texture upon rehydration. Leaf color gradually returned to normal.

The leaf chlorophyll and total carotenoid contents were affected differently as dehydration progressed. Chlorophyll concentration was near control values until the 14th day of dehydration. Thereafter, chlorophyll values fell to undetectable levels on the 20th day of watering withdrawal (Fig. 2). The decrease in leaf relative water content preceded the loss of chlorophyll. Chlorophyll recovery started after complete leaf rehydration, taking more than 5 days to reach control values. Total carotenoid concentration remained stable around $350 \mu\text{g g}^{-1}$ during the entire process, presenting comparable levels in the control and experimental groups (Fig. 3).

Throughout the experimental period, the control group maintained stable values of net photosynthesis (A) (Fig. 4), with a slightly variable stomatal conductance (g_s) (Fig. 5) possibly due to oscillation in vapor pressure deficit (VPD) and leaf temperature (Fig. 6). The experimental group presented four distinguishable phases during progressive dehydration: Phase 1 (days 0–4), water was freely available, stomata were open with maximal A ; Phase 2 (days 4–9) was characterized by stomata closing, g_s and A declining

Fig. 2 Total chlorophyll content ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight) in leaf pieces of *P. purpurea* during the desiccation and rehydration phases. Open circles—desiccated experimental group; solid circles—irrigated control group. Vertical bars—standard deviation. Linear regression of control group data is presented as dotted line. Vertical dotted line marks the moment of rehydration in desiccated plants

Fig. 3 Total carotenoids content ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight) in leaf pieces of *P. purpurea* during the desiccation and rehydration phases. Open circles—desiccated experimental group; solid circles—irrigated control group. Vertical bars—standard deviation. Linear regression of control group data is presented as dotted line. Vertical dotted line marks the moment of rehydration in desiccated plants

in parallel to about a quarter of maximum in response to incipient soil water stress, even with a RWC_{leaf} more than 90%; Phase 3 (days 9–14), stomata were closed, g_s and A near zero, $RWC_{\text{plant-soil}}$ declining more slowly than in the previous phase, RWC_{leaf} declining slowly from more than 90% to about 75%, and chlorophyll remaining at normal levels; Phase 4 (days 14–20), $RWC_{\text{plant-soil}}$ was very low, with RWC_{leaf} declining steeply from 75 to 17%, chlorophyll content declining at the same time, g_s near zero, and A first showing tendency to small negative values, then zero.

Fig. 4 Photosynthesis (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) in leaves of *P. purpurea* during watering cessation (open circles) and irrigated control conditions (solid circles). Vertical bars—standard deviation. Linear regression of control group data is presented as dotted line. Vertical dotted line marks the moment of rehydration in desiccated plants

Fig. 5 Stomatal conductance to water vapor (g_s , mol H₂O m⁻² s⁻¹) in leaves of *P. purpurea* during watering suspension (open circles) and irrigated control conditions (solid circles). Vertical bars—standard deviation. Linear regression of control group data is presented as dotted line. Vertical dotted line marks the moment of rehydration in desiccated plants

Fig. 7 Transpiration (E , mmol H₂O m⁻² s⁻¹) in leaves of *P. purpurea* subjected to watering suspension (open circles) and in irrigated control conditions (solid circles). Vertical bars—standard deviation. Linear regression of control group data is presented as dotted line. Vertical dotted line marks the moment of rehydration in desiccated plants

Fig. 6 Time progression of vapor pressure deficit (VPD, kPa) between the air and the leaf of *P. purpurea* after irrigation withdrawal. Open symbols—experimental; solid symbols—control group. Vertical bars—standard deviation. Linear regression of control group data is presented as dotted line. Vertical dotted line marks the moment of rehydration in desiccated plants

Fig. 8 Intercellular CO₂ concentration in leaves of *P. purpurea* (C_i , μmol CO₂ mol air⁻¹) subjected to watering suspension (open circles), irrigated control conditions (solid circles) and air CO₂ concentration (C_a , μmol CO₂ mol air⁻¹) (open triangles). Vertical bars—standard deviation. Linear regression of control group data is presented as dotted line. Vertical dotted line marks the moment of rehydration in desiccated plants

Rehydration

After restoring irrigation, RWC_{leaf} reached 90% in 12 h (Fig. 1). At that time, we found intense respiratory activity, corresponding to an average A value of $-2.5 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. This increase in respiratory activity is probably involved in metabolic recovery of basic physiological processes. Measurements done 36 h after irrigation showed photosynthetic activity with A values around $3.6 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Four days after re-watering, plants from the

experimental group attained A values found in the control group (Fig. 4). Stomatal conductance values attained the highest levels in the experimental group after full rehydration, even considering values found in the control. Transpiration (Fig. 7) closely followed the g_s , as well as the $RWC_{\text{plant-soil}}$.

C_i values were similar between the control and experimental groups up to day 9 of the experiment. After that, C_i values recorded in plants subjected to water deficit were higher than in the control group (phase 3), as would be expected due to reduced CO₂ demand (Fig. 8). Following

Fig. 9 Light response curves of leaves from *P. purpurea* plants subjected to **a** watering suspension during 8 and 11 days, and **b** recovery after 4 days of re-watering with a mean RWC_{leaf} of 99%. Experimental (open circles) and control group (closed circles) curves were obtained from fitting values to a nonrectangular hyperbola model

re-wetting, C_i increased accompanying the peak of rehydration respiration, and subsequently attained values still slightly higher than the controls, indicating incomplete recovery.

The parameters for light response curves of photosynthesis calculated from non-rectangular hyperbolic curve fitting (Fig. 9) showed a reduction in the estimated maximum photosynthesis after 8 and 11 days of watering withdrawal, which corresponded to leaf relative water contents of about 94 and 86%, respectively. Quantum efficiency showed no obvious pattern during the experiment. Initial values matched control values with leaf

relative water content around 98%. After 11 days without water, maximum photosynthesis was close to zero, and the light compensation point was higher than initial values (Fig. 9; Table 1), probably due to deranged photosynthetic system machinery. Four days after re-watering, with leaf relative water content around 99%, light response curve parameters returned to near-control values.

Discussion

The delay in leaf dehydration of *P. purpurea*, when compared to the plant-soil water content was consistent with the presence of drought-avoidance mechanisms which limited the rate of dehydration of its tissues. This aspect is in agreement with the modified desiccation tolerant (MDT) behavior in the concept of Oliver et al. (1998), according to which the acquisition of tolerance depends on the induction of preparatory mechanisms (of protection and repair) by the plant tissues prior to anabiosis. This behavior is linked to the control of the dehydration rate allowing time for gene expression and protein synthesis. Furthermore, the delay in leaf dehydration probably also functions as providing a time-window during which the leaf tissues remain capable of rapid return to normal physiological activity if soil water content is rapidly restored before the desiccation process is started. This can be inferred from the maintenance of the chlorophyll content in this poikilochlorophyllous plant, which could enable a rapid return to previous levels of photosynthesis without the energy costs of restoring the chlorophyll content. The events on the desiccation phase suggest that, under conditions of mild or moderate drought, *P. purpurea* behaves as a typical water-conserving homoiohydric. These findings may be true for others MDT plants, as has also been reported for *Xerophyta plicata* (*Nanua plicata*) (Meguro et al. 1977), *Xerophyta humilis*, *Craterostigma wilmsii* (Farrant et al. 1999) and *Eragrostis nindensis* (Willigen et al. 2001). The drought-avoidance mechanism in *P. purpurea* was consistent with a role of stomatal closure and a probable osmotic adjustment

Table 1 Average and standard deviations (SD) values of maximum photosynthesis (A_{max}), quantum yield (Φ_a) and light compensation point (LCP) from light response curves of leaves from *P. purpurea* plants subjected to watering suspension (desiccation phase) and recovery after 4 days of re-watering

Phase	Group	Day	A_{max}	SD	Φ_a	SD	LCP	SD
Desiccation	Control	2°	8.62	0.41	0.003	0.0004	36.24	6.92
	Experimental	2°	8.92	0.68	0.002	0.0005	45.56	10.45
		8°	3.67	0.35	0.004	0.0010	72.82	11.35
		11°	0.093	0.06	0.003	0.0007	665.64	125.49
Recovery	Control	4°	10.94	0.30	0.0027	0.0002	44.61	4.08
	Experimental	4°	10.15	0.61	0.0036	0.0005	31.44	6.17

Experimental and control group curves were obtained from fitting values to a nonrectangular hyperbola model

as found in other typical homoiohydric plants (Larcher 1995; Nielsen and Orcutt 1996). In *P. purpurea*, stomatal closure seems to be a response to the reduction of $RWC_{\text{plant-soil}}$ even before the leaf RWC reaches significantly lower values (Figs. 1, 5, respectively). This response suggests the existence of an interaction between the root and the aerial portion by means of chemical signals, probably via abscisic acid (ABA), as a way of monitoring water status of the soil (Zhang and Davies, 1989). Next, it is likely that the retention of internal water content was the consequence of osmotic adjustment in the leaf face of continued dehydration of the soil (Nielsen and Orcutt 1996; Hare et al. 1998). With the advance of water deficit, however, the osmotic adjustment of the plant tissues probably becomes insufficient to maintain the water content at an elevated level leading to a phase of more rapid water loss to the environment until hygroscopic balance with surrounding air is established (Fig. 1).

Although stomatal closure is important to restrict transpiration in conditions of water deficit and high exposure, the temperature of the mesophyll tends to increase as a consequence. This condition would be sufficient to predispose the leaf tissues of *P. purpurea* to photoinhibition (Osmond, 1994) lowering the efficiency of light use during the water conserving phase (Fig. 9; Table 1). In addition, the effect of the water deficit on the decrease in photosynthesis (A) would be explained by non-stomatal causes (Kaiser 1987), such as the reduction in regeneration of RuBP (Medrano et al. 2002), inhibition of rubisco activity (Parry et al. 2002), or limitation of CO_2 diffusion in the mesophyll (Flexas et al. 2004). This can be considered by the fact that photosynthesis was inhibited even with the maintenance or increase in C_i values following stomatal closure during the desiccation process. Caution is needed, however, in considering this interpretation, since water deficit tends to increase stomatal heterogeneity (patchiness phenomenon) which could lead to overestimation of C_i (Kaiser 1987; Mott and Buckley 1998). On the other hand, the data suggest that the increase in C_i following stomatal closure can be considered consistent, as they reflect the maintenance of respiratory activity with progressive suspension of photosynthesis, characterizing the “desiccation respiration” (Tuba et al. 1997) that precedes anabiosis. With the suspension of leaf gas exchanges after desiccation, the C_i values might reflect the air CO_2 concentration (Fig. 8).

The pigment content is probably not associated with the reduction of photosynthesis, since the degradation of the chlorophylls, was initiated later in the process of desiccation, together with the phase of highest leaf dehydration when almost all gas exchanges ceased. Total degradation of chlorophylls during desiccation, together with the re-synthesis during the rehydration phase, characterize

poikilochlorophyllous behavior (Hambler 1961), which appear to be restricted to some desiccation tolerant monocot species (Tuba 2008). This process would confer an adaptive advantage for colonization of environments characterized by prolonged periods of severe drought and direct sunlight. The degradation of chlorophylls during the process of desiccation develops in a controlled manner in order to impede excessive light absorption and consequent damage related to photo-oxidation by leaves with low RWC_{leaf} (Sherwin and Farrant 1998; Collett et al. 2003; Ingle et al. 2007; Tuba 2008). Nevertheless, given the profound ultra-structural changes observed in vitrified cells following the desiccation process, it is likely that electron transport systems become inactivated under these conditions, due to changes in the integrity of photosynthetic membranes, among other factors. Thus, this poikilochlorophyllous behavior may be also important as a way to prevent excessive sunlight absorption during the states of partial hydration throughout the recovery phase, when metabolic activity should be more directed to repair processes. This is consistent with the fact that the initiation of re-synthesis of chlorophylls in *P. purpurea*, as well as in other poikilochlorophyllous and poikilohydric species, (Tuba et al. 1993a, b, 1994), occurred only after the total rehydration of the leaf tissues, which presumably should correspond to the safest phase for reactivation of photosynthesis, given the greater physiological capacity for protection and repair that turgid cells should present.

The fact that total carotenoid content remained stable during the phases of desiccation and rehydration suggests the importance of this group of pigments for photo-protection. In addition to their role as accessory photosynthetic pigments and antioxidants protecting the chlorophylls from damage by oxygen species of the singlet type produced during photosynthesis, carotenoids are also involved in non-photochemical quenching of energy dissipation via the xanthophyll cycle (Demmig-Adams and Adams 1996; Ksenzhek and Volkov 1998; Niyogi 2000). In this way, their permanent availability in the leaf tissues of *P. purpurea* assures constitutive protection of the photosynthesis system, since solar radiation may be recurrently excessive given the unpredictability of water deficit in the rock outcrops where *P. purpurea* occurs.

The physiological recovery after rehydration followed a sequential pattern of reactivation. Leaf turgidity was recovered 12 h after restoring the maximum soil water content, indicating an endohydric pattern of water absorption (Buch 1945 apud Proctor and Tuba 2002). That phase coincides with high rates of respiratory activity, previously described by other authors as “resaturation respiration” (Smith and Molesworth 1973; Schwab et al. 1989; Tuba et al. 1998). This event would imply in a high energy cost for the plants and denotes a fundamental role of

mitochondria in making energy available for the recovery of metabolic processes and possibly repairs. Following the recovery sequence, the experimental group presented levels of photosynthesis comparable to the control group before attaining similar chlorophyll content values. This would suggest at least a transient enhancement of the photochemical efficiency in the plants of the experimental group—a finding that deserves further investigation.

Considering the very low water content during desiccated state, the xylem vessels would be empty of water. From this we can consider that the water cohesion would be improbable as a mechanism for regaining the transpiratory current. Besides, the speed of shoot rehydration seems to be high in spite of the lack of a direct access of soil water to the desiccated leaves. We argue if root pressure would play a role as the major mechanism of sap ascension in desiccation tolerant plants. In this case the root system needs to be desiccation tolerant and root recovery and water absorption activity should start immediately after the rise in soil water content. That can be inferred from the fast water absorption after restoring the pot water content. The xylem refilling processes dependent of roots absorption was also observed in *Myrothamnus flabellifolia*, the unique desiccation tolerant woody specie known, which seems to be aided by the presence of lipids in the stem (Moore et al. 2007).

The low stomatal resistance identified during the phase of photosynthetic recovery, after full leaf saturation, would be advantageous to water and resources acquisition, since a high transpiration flux must increase the root absorption rate of soil water solution (Sarmiento et al. 1985). Since *Pleurostima purpurea* has no specialized organs for water storage, the increase in water expenditure during the recovery phase also would be expected by the advantage achieved with maximum investment in growth during the short periods of water availability. Thus, plant tolerance to desiccation would reduce the direct damage to leaves, which implies in loss of structural and nutritional material. The seemingly high cost of this process would be tolerable for the plant by taking advantage of the short periods of water availability. In some conditions, the ability to cope with such a pulsed regime of resource availability confers a competitive advantage to these plants due to the low nutrient and water availability in the environment (Meguro et al. 1977; Owoseye and Sanford 1972). This strategy, which has been documented in populations restricted to isolated environments, mainly rocky outcrops (Meirelles et al. 1999). These habitats are typically under very contrasting conditions of high water availability during rainy periods and extreme drought following some days after rain. The drought periods can reach many months and sometimes a entire year. The rock outcrop habitats are likely to predominate during previous climatic periods

characterized by extended drought periods (Ab'Sáber 1982). Populations of desiccation tolerant plants like species of *Trilepis* spp. probably presented a more continuous distribution due to their association with the rocky substrate (de Granville 1982). We speculate if the high number of species of desiccation tolerant plants found today in the Brazilian flora can be related to the fragmentation of a more continuous habitat leading to isolation and allopatric speciation. The loss of the desiccation tolerance by some species together with an enhanced role of drought avoidance would be expected in a predominating mesic condition nowadays.

In conclusion, the species *P. purpurea* showed mechanisms of drought avoidance combined with desiccation tolerance. These different mechanisms allow to survive in the rock outcrop environment with its high exposure and low water availability, in a climate regime of high humidity nearby the tropical rain forest where water is available during most of the year. First, plants exhibited a drought-avoidance mechanism, maintaining leaf *RWC* regardless of reduction of soil, achieved through stomatal control. Second, photosynthetic pigments showed a seemingly controlled degradation during desiccation, achieving photoprotection with the degradation of chlorophyll and conservation of the carotenoids. In the desiccated state, these mechanisms allow plants to maintain overall functional integrity and resources for rapid recovery when water is restored.

References

- Ab'Sáber AN (1982) The paleoclimate and paleoecology of Brazilian Amazonia. In: Prance GT (ed) Biological diversification in the tropics: 41–49. Columbia University Press, New York, p 714
- Alpert P, Oliver MJ (2002) Drying without dying. In: Black M, Pritchard HW (eds) Desiccation and survival in plants: Drying without dying, chap. 1. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, pp 3–43
- Caemmerer S, Farquhar GD (1981) Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153:376–387
- Collett H, Butowt R, Smith J, Farrant JM, Illing N (2003) Photosynthetic genes are differentially transcribed during the dehydration-rehydration cycle in the resurrection plant, *Xerophyta humilis*. *J Exp Bot* 54:2593–2595
- Cooper K, Farrant JM (2002) Recovery of the resurrection plant *Craterostigma wilmsii* from desiccation: protection versus repair. *J Exp Bot* 53:1805–1813
- Dace H, Sherwin HW, Illing N, Farrant JM (1998) Use of metabolic inhibitors to elucidate mechanisms of recovery from desiccation stress in the resurrection plant *Xerophyta humilis*. *Plant Growth Reg* 24:171–177
- de Granville JJ (1982) Rain forest and xeric flora refuges in French Guiana. In: Prance GT (ed) Biological diversification in the tropics: 159–181. Columbia University Press, New York, p 714
- Demmig-Adams B, Adams WW (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci* 1:21–26

- Farrant JM (2000) A comparison of mechanisms of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plant species. *Plant Ecol* 151:29–39
- Farrant JM, Cooper K, Kruger LA, Sherwin HW (1999) The effect of drying rate on the survival of three desiccation-tolerant angiosperm species. *Ann Bot* 84:371–379
- Farrant JM, Willigen CV, Loffell DA, Bartsch S, Whittaker A (2003) An investigation into the role of light during desiccation of three angiosperm resurrection plants. *Plant Cell Environ* 26:1275–1286
- Flexas J, Bota J, Cornic G, Sharkey TD (2004) Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant Biol* 6:269–279
- Gaff DF (1971) Desiccation-tolerant flowering plants in southern Africa. *Science* 174:1033–1034
- Gaff DF (1977) Desiccation tolerant vascular plants of southern Africa. *Oecologia* 31:95–109
- Gaff DF (1987) Desiccation tolerant plants in South America. *Oecologia* 74:133–136
- Gaff DF, Hallam ND (1974) Resurrecting desiccated plants. In: Bielecki RL, Ferguson AR, Cresswell MM (eds) Mechanisms of regulation of plant growth. The Royal Society of New Zealand (Bulletin 12), Wellington, pp 389–393
- Georgieva K, Lenk S, Buschmann C (2008) Responses of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis* to high irradiance. *Photosynthetica* 46:208–215
- Hambler DJ (1961) A poikilohydrous, poikilochlorophyllous angiosperm from Africa. *Nature* 191:1415–1416
- Hare PD, Cress WA, Van Staden J (1998) Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environ* 21:535–553
- Ingle RA, Schmidt UG, Farrant JM, Thomson JA, Mundree SG (2007) Proteomic analysis of leaf proteins during dehydration of the resurrection plant *Xerophyta viscosa*. *Plant Cell Environ* 30:435–446
- Kaiser WM (1987) Effects of water deficit on photosynthetic capacity. *Physiol Plant* 71:142–149
- Kappen L, Valladares F (1999) Opportunistic growth and desiccation tolerance: the ecological success of poikilohydrous autotrophs. In: Pugnaire FI, Valladares F (eds) Handbook of functional plant ecology, chap. 2. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, pp 9–80
- Kimenov GP, Markovska YK, Tsonev TD (1989) Photosynthesis and transpiration of *Haberlea rhodopensis* Friz. in dependence on water deficit. *Photosynthetica* 23:368–371
- Ksenzhek OS, Volkov AG (1998) Plant energetics. Academic Press, San Diego
- Larcher W (1995) Physiological plant ecology, 2nd edn. Springer, Berlin, p 506
- Lichtenthaler HK, Wellburn AR (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochem Soc Trans* 11:591–592
- Medrano H, Escalona JM, Bota J, Gulías J, Flexas J (2002) Regulation of photosynthesis of C3 plants in response to progressive drought: stomatal conductance as a reference parameter. *Ann Bot* 89:895–905
- Meguro M, Joly CA, Bittencourt MM (1977) Stress hídrico e alguns aspectos do comportamento fisiológico em *Xerophyta plicata* Spreng.—Velloziaceae. *Bol Bot Univ São Paulo* 5:27–42
- Meirelles ST, Mattos EA, da Silva AC (1997) Potential desiccation tolerant vascular plants from southeastern Brazil. *Pol J Environ Stud* 6:17–21
- Meirelles ST, Pivello VR, Joly CF (1999) The vegetation of granitic rock outcrops in Rio de Janeiro, Brazil, and the need for its protection. *Environ Conserv* 26:10–20
- Moore JP, Lindsey GG, Farrant JM, Brandt WF (2007) An overview of the biology of the desiccation-tolerant resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia*. *Ann Bot* 99:211–217
- Mott KA, Buckley TN (1998) Stomatal heterogeneity. *J Exp Bot* 49:407–417
- Nielsen ET, Orcutt DM (1996) Physiology of plants under stress: abiotic factors. Wiley, New York
- Niyogi KK (2000) Safety valves for photosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* 3:455–460
- Oliver MJ, Wood AJ, O'Mahony P (1998) “To dryness and beyond”—preparation for the dried state and rehydration in vegetative desiccation-tolerant plants. *Plant Growth Reg* 24:193–201
- Osmond CB (1994) What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. In: Baker NR, Bowyer JR (eds) Photoinhibition of photosynthesis: from molecular mechanisms to the field. Environmental Plant Biology Series, Bio Scientific, Chap. 1, pp 1–24
- Owoseye JA, Sanford WW (1972) An ecological study of *Vellozia schnitzleinia*, a drought-enduring plant of Northern Nigeria. *J Ecol* 60:807–817
- Parry MAJ, Andralojc PJ, Khan S, Lea PJ, Keys AJ (2002) Rubisco activity: effects of drought stress. *Ann Bot* 89:833–839
- Porembski S, Barthlott W (2000) Granitic and gneissic outcrops (inselbergs) as centers of diversity for desiccation-tolerant vascular plants. *Plant Ecol* 151:19–28
- Potvin C, Lechowicz MJ, Tardif S (1990) The statistical analysis of ecophysiological response curves obtained from experiments involving repeated measures. *Ecology* 71:1389–1400
- Proctor MCF, Tuba Z (2002) Poikilohydry and homoiohydric: antithesis or spectrum of possibilities? *New Phytol* 156:327–349
- Quartacci MF, Glisic O, Stevanovic B, Navari-Izzo F (2002) Plasma membrane lipids in the resurrection plant *Ramonda serbica* following dehydration and rehydration. *J Exp Bot* 53:2159–2166
- Röhrig H, Schmidt J, Colby T, Bräutigam A, Hufnagel P, Bartels D (2006) Desiccation of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* induces dynamic changes in protein phosphorylation. *Plant Cell Environ* 29:1606–1617
- Sarmiento G, Goldstein G, Meinzer F (1985) Adaptive strategies of woody species in neotropical savannas. *Biol Rev* 60:315–355
- Schwab KB, Schreiber U, Heber U (1989) Response of photosynthesis and respiration of resurrection plants to desiccation and rehydration. *Planta* 177:217–227
- Sherwin HW, Farrant JM (1996) Differences in rehydration of three desiccation-tolerant angiosperms species. *Ann Bot* 78:703–710
- Sherwin HW, Farrant JM (1998) Protection mechanisms against excess light in the resurrection plants *Craterostigma wilmsii* and *Xerophyta viscosa*. *Plant Growth Reg* 24:203–210
- Smith DC, Molesworth S (1973) Lichen physiology. XIII. Effects of rewetting dry lichens. *New Phytol* 72:525–533
- Tuba Z (2008) Notes on the poikilochlorophyllous desiccation-tolerant plants. *Acta Biol Szeg* 52:111–113
- Tuba Z, Lichtenthaler HK, Csintalan Z, Pócs T (1993a) Regreening of desiccated leaves of the poikilochlorophyllous *Xerophyta scabrada* upon rehydration. *J Plant Physiol* 142:103–108
- Tuba Z, Lichtenthaler HK, Maroti I, Csintalan Z (1993b) Resynthesis of thylakoids and functional chloroplasts in the desiccated leaves of the poikilochlorophyllous plant *Xerophyta scabrada* upon rehydration. *J Physiol* 142:742–748
- Tuba Z, Lichtenthaler HK, Csintalan Z, Nagy Z, Szente K (1994) Reconstitution of chlorophylls and photosynthetic CO₂ assimilation upon rehydration of the desiccated poikilochlorophyllous plant *Xerophyta scabrada* (Pax) Th. Dur. Et. Schinz. *Planta*, Berlin 192:414–420
- Tuba Z, Smirnoff N, Csintalan Z, Szente K, Nagy Z (1997) Respiration during slow desiccation of the poikilochlorophyllous desiccation tolerant plant *Xerophyta scabrada* at present-day CO₂ concentration. *Plant Physiol Biochem* 35:381–386
- Tuba Z, Proctor MCF, Csintalan Z (1998) Ecophysiological responses of homoiochlorophyllous and poikilochlorophyllous desiccation

- tolerant plants: a comparison and an ecological perspective. *Plant Growth Reg* 24:211–217
- Turner NC (1981) Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. *Plant Soil* 58:339–366
- Vicré M, Farrant JM, Driouich A (2004) Insights into the cellular mechanisms of desiccation tolerance among angiosperm resurrection plant species. *Plant Cell Environ* 27:1329–1340
- Willigen CV, Pammenter NW, Mundree S, Farrant J (2001) Some physiological comparisons between the resurrection grass, *Eragrostis nindensis*, and the related desiccation-sensitive species, *E. curvula*. *Plant Growth Reg* 35:121–129
- Zhang J, Davies WJ (1989) Absciscic acid produced in dehydrating roots may enable the plant to measure the water status of the soil. *Plant Cell Environ* 12:73–81