UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

REBECA RIVAS COSTA DE ALBUQUERQUE SILVA

ECOFISIOLOGIA E ANATOMIA DE *Calotropis procera* **SOB ESTRESSE ABIÓTICO**

Recife - PE

2016

REBECA RIVAS COSTA DE ALBUQUERQUE SILVA

ECOFISIOLOGIA E ANATOMIA DE *Calotropis procera* SOB ESTRESSE ABIÓTICO

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutora em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Guida dos Santos

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Benko Iseppon

Recife - PE

2016

Catalogação na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Rebeca Rivas Costa de Albuquerque
Ecofisiologia e anatomia de *Calotropis procera* sob estresse abiótico/ Rebeca Rivas Costa de Albuquerque Silva– Recife: O Autor, 2016.
114 folhas : il., fig., tab.
Orientador: Mauro Guida dos Santos
Coorientadora: Ana Maria Benko Iseppon
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biologia Vegetal, 2016.
Inclui referências e anexos

1. *Calotropis procera* 2. Ecofisiologia vegetal 3. Fotossíntese I. Santos, Mauro Guida dos (orientador) II. Iseppon, Ana Maria Benko (orientadora) III. Título

583.93 CDD (22.ed.) UFPE/CCB-2016-185

REBECA RIVAS COSTA DE ALBUQUERQUE SILVA

ECOFISIOLOGIA E ANATOMIA DE *Calotropis procera* **SOB ESTRESSE ABIÓTICO**

APROVADA EM: 23/02/2016

BANCA EXAMINADORA:

_____

Prof. Dr. Mauro Guida dos Santos (Orientador) – UFPE

_____

Profa. Dra. Lilia Gomes Wiladino – UFRPE

_____

Prof. Dr. André Luiz Alves de Lima - UFRPE

_____

Profa. Dra. Keila Rêgo Mendes - UFPE

_____

Profa. Dra. Jarcilene Silva de Almeida Cortez – UFPE

_____

Profa. Dra. Eugênia Cristina Gonçalves Pereira – UFPE (Suplente)

_____

Prof. Dr. José Ribamar Costa Ferreira Neto - UFPE (Suplente)

Recife – PE

2016

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar o meu caminho, por me mostrar as respostas no momento de dúvida, por me proteger no dia-a-dia.

Ao Prof. Dr. Mauro G. Santos pela orientação, pelos ensinamentos, pela confiança e pela amizade.

A Profa. Dra. Ana M. Benko Iseppon pela co-orientação e confiança.

A Profa. Dra. Valesca Pandolfi por toda a dedicação, confiança, paciência e amizade.

Ao Prof. Dr. Adriano Barbosa, Universidade de Luxemburgo, pelo suporte na montagem do RNAseq de *Calotropis procera*.

Ao Prof. Dr. Bernd Müller Röber e todos que fazem parte do laboratório de Genética Molecular da Universidade de Potsdam.

Ao Prof. André Lima pelo suporte no campo em Serra Talhada.

A Profa. Dra. Emília Arruda pela orientação na etapa de análise anatômica.

Ao Prof. Rômulo Menezes e a todos que fazem parte do Laboratório de Fertilidade de Solos pelo suporte nas análises de nutrientes.

A Prof. Lilia Willadino e a todos que fazem parte do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais pelo suporte na análise de nutriente.

Ao Prof. Dr. Marciel T. de Oliveira pelo suporte no trabalho, incentivo e amizade.

A Gabriella Frosi por sempre me socorrer e pela bela amizade.

A Karla V. Figueiredo e Hiram M. Falcão pelo suporte no trabalho (principalmente nas idas ao campo), pela amizade e principalmente pelas boas risadas.

Ao João Pacífico pela imensa ajuda no trabalho, pela amizade, pelas boas conversas e principalmente pelas belas palavras quando eu mais precisei.

Ao José Ribamar C. F. Neto pelo suporte no trabalho e bom humor.

A todos que fazem parte do CETENE pela disponibilidade em realizar a análise de microscopia eletrônica de varredura.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado e pela bolsa do doutorado sanduíche.

A Hildebrando e a todos que fazem parte do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal (PPGBV) alunos, funcionários e professores.

Camila D. B. Medeiros, Diego Ramos, Maria Reis, Mariana Gonçalves, Silvia Caroline F. Pereira, Vanessa Andrade por toda ajuda no trabalho, pela amizade, pelos bons momentos compartilhados profissionalmente e pessoalmente.

A todos os colegas do Laboratório de Ecofisiologia Vegetal (LEV) pelo apoio, pelo bom convívio profissional e pelas boas risadas.

A todos os colegas do Laboratório de Genética e Biotecnologia vegetal (LGBV) por toda experiência compartilhada.

A minha irmã Andressa Rivas, à minha mãe Dione Rivas, à minha avó Laudione Rivas (vó Lau), à minha bisavó Dionélia Rivas (vó Lola), que são as mulheres da minha vida. Me espelho em cada uma para seguir adiante. A minha irmã, sou muito grata por sempre me ajudar na edição de fotos, parte gráfica e todo o aparato tecnológico. A minha mãe por sempre pedir pela minha proteção nas suas orações, por sempre me incentivar na minha carreira e por fazer sempre deliciosos bolos de chocolate que me auxiliaram na composição da tese. A minha avó que me deu os primeiros ensinamentos sobre meio ambiente, que me ajuda em todos os segmentos, inclusive emprestando o seu computador quando o meu quebrou durante a redação da tese. E a minha bisavó que é a nossa matriarca, minha inspiração de vida e foi quem me ensinou a apreciar um bom vinho.

Ao meu pai, Felenius Costa pelo apoio e carinho.

Ao Marcio Silva por todo o amor, carinho, atenção, e sem dúvida pela ajuda no trabalho. E também à sua família Marcos, Avani e Juliana pelo apoio, carinho e cuidado.

A minha tia Laudenir Rivas (Tia Binha), por toda a atenção, carinho, suporte, por me proporcionar vários momentos preciosos de higiene mental e por realizar a revisão textual do manuscrito desta dissertação.

A Sue Marr e Usha Akula por todo carinho e suporte durante a minha estada na Alemanha.

Aos meus Amigos Alice, André Dias, Aninha, Aziza, Bárbara Laine, César Vassão, Elis Vassão, Elkênita, Eugênia Alves, Felipe Ferreira, Geórgia Cerqueira, Iru, Itamar Moura, Jacira, Laudelino Alves, Luciana Alves, Maria Dolores e Vanessa Oliveira simplesmente por tudo! Meu muito obrigada!

A todos mencionados aqui ou não que contribuíram direta ou indiretamente para a composição da minha tese. O meu muito obrigada!

RESUMO

Calotropis procera (Apocynaceae) é nativa de áreas áridas e semiáridas. Essa espécie sempre verde e de metabolismo fotossintético C_3, é um excelente modelo de estudo para a compreensão da tolerância aos fatores abióticos. A seca é o estresse abiótico que mais influencia no crescimento, no desenvolvimento e na produtividade das espécies vegetais. O presente estudo visa avaliar sob aspectos ecofisiológicos, anatômicos e bioquímicos duas populações de *C. procera,* durante as estações seca e chuvosa de 2012 e 2013, em condições ambientais diferentes: uma no semiárido e outra no litoral; bem como avaliar plantas jovens de *C. procera* sob déficit hídrico em condições de casa-de-vegetação. Foram avaliadas as trocas gasosas, quantificação de solutos do metabolismo primário, atividade de enzimas do sistema antioxidativo, análise de atributos anatômicos foliar. *Calotropis procera* mesmo exposta a ambientes contrastantes apresentou alta taxa fotossintética mesmo na estação seca sob déficit de pressão de vapor (DPV) e densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF) elevados. Também foi observado aumento de pigmentos fotossintéticos, acúmulo de açúcares e aumento na atividade de enzimas do ciclo antioxidativo em ambas as localidades no período seco. Contudo, os ajustes anatômicos foram contrastantes, enquanto no semiárido houve aumento na espessura do mesofilo no período seco, no litoral houve aumento na espessura da cutícula e aumento na densidade de tricomas. As plantas jovens de *C. procera* alcançaram o máximo estresse após 10 dias de suspensão de rega, quando a condutância estomática (g_s) chegou a zero. Para minimizar a perda d'água *C. procera* reduziu a g_s, número de folhas, aumentou na espessura da cutícula e na densidade estomática. O aumento da fotorrespiração, da respiração mitocondrial do dia (R_d), do *quenching* não fotoquímico (NPQ), dos carotenóides, carboidratos solúveis totais (CST), aminoácidos livres totais (ALT), prolina e aumento na atividade da superóxido dismutase (SOD) garantiram a fotoproteção ao aparato fotoquímico. Com base nos resultados obtidos, *C. procera* apresenta alta performance fotossintética mesmo sob seca. O metabolismo bioquímico primário apresenta ajustes diferentes nas diferentes condições estudadas. Entretanto, *C. procera* no litoral e em casa de vegetação sob seca apresentaram estratégias semelhantes quanto aos atributos anatômicos. O conjunto de dados nos faz entender como uma espécie C_3, sempre verde apresenta um metabolismo fotossintético intenso sob seca, divergindo da maioria das plantas de metabolismo C_3.

Palavras-chave: semiárido, litoral, seca, maquinário fotossintético, C_3, fotoproteção

ABSTRACT

Calotropis procera (Apocynaceae) is native from arid and semiarid areas. This species evergreen, and C_3 photosynthetic metabolism is an excellent study model for the understanding of the tolerance to abiotic factors. Drought is the most abiotic stress harmful the growth, development and productivity of plant species. This study aims to evaluate in ecophysiological, anatomical and biochemical aspects of two populations of *C. procera*, during the dry and rainy seasons of 2012 and 2013 in different environments: one in semiarid and another on the seacoast; and evaluate young plants of *C. procera* under drought at greenhouse conditions. We evaluated the gas exchange, solute quantification of the primary metabolism, enzyme activity of the antioxidant system, analysis of leaf anatomical. *Calotropis procera* even exposed to contrasting environments showed high photosynthetic rate even the dry season under high vapor pressure deficit (VPD) and photosynthetic photon flux density (PPFD). In addiction was observed increase in photosynthetic pigments, accumulation of sugars and increase in antioxidant enzyme activity in both locations during the dry season. However, the anatomical adjustments were contrasting, while in the semiarid region was observed increase in mesophyll thickness in the dry season, on the seacoast was observed increase in cuticle thickness and increase in trichomes density. Young plants of *C. procera* reached the maximum stress after 10 days withhold water, when stomatal conductance (g_s) reached zero. To minimize water loss, *C. procera* reduced g_s, leaf number, increased cuticle thickness and stomata density. The increase in photorespiration, mitochondrial day respiration (R_d) of non-photochemical quenching (NPQ), carotenoids, soluble carbohydrates, free amino acids, proline and increase in superoxide dismutase (SOD) activity garantee the photoprotection to the photochemical apparatus. Based on the results obtained, *C. procera* present high photosynthetic performance even under drought. The primary biochemical metabolism has different settings under different conditions. However, *C. procera* on the seacoast and in greenhouse under drought showed similar strategies regarding the anatomical attributes. The data set help us understand how C_3 species, evergreen, present an intense photosynthetic metabolism under drought, diverging of the most C_3 plants.

Keywords: semiarid, seacoast, drought, photosynthetic machinery, C_3, photoprotection

SUMÁRIO

1. Apresentação 09

2. Fundamentação Teórica 11

2.1 *Calotropis procera* 11

2.1.1Classificação 11

2.1.2 Distribuição 11

2.1.3 Caracterização 12

2.1.4 Uso 13

2.2 Déficit hídrico 14

2.2.1 Comportamento das trocas gasosas e do maquinário fotossintético sob déficit hídrico 14

2.2.2 Bioquímica foliar 17

2.2.3 Anatomia foliar 20

3. Referências bibliográficas 21

4. Manuscrito I - Alta atividade fotossintética sob seca severa e intensidade da luz em condições de campo contrastante em *Calotropis procera* uma espécie sempre verde com metabolismo C_3 33

5. Manuscrito II - Condutância mesofílica e mecanismos fotoprotetores suportam a performance fotossintética sob déficit hídrico e reidratação de *Calotropis procera* uma C_3 nativa de região desértica 74

6. Conclusão 109

Anexo I 110

Anexo II 112

1. APRESENTAÇÃO

Algumas espécies possuem a capacidade de colonizar outros ambientes, além do seu ambiente de ocorrência natural. Tal fenômeno sempre exerceu um papel fundamental na dinâmica da biodiversidade (HURKA; BLEEKER; NEUFFER, 2003). Invasores bióticos são espécies que estabelecem uma nova área de distribuição na qual elas proliferam, espalham-se e persistem em detrimento do ambiente (ADAIR; GROVES, 1998; MACK et al., 2000).

Calotropis procera (Aiton) W. T. Aiton (Apocynaceae) é uma espécie invasora (COSTA et al., 2009), de hábito arbustivo (CSURHES, 2009; BOUTRAA, 2010), sempre verde, com metabolismo C_3 (SAYED; MOHAMED, 2001), nativa do noroeste e norte da África e sudoeste da Ásia (PARSONS; CUTHBERTSON, 2001; BRANDES, 2005). Apresenta ampla distribuição geográfica principalmente em áreas tropicais e subtropicais. No Brasil, foi introduzida no início do século XX e já se encontra na Caatinga, Cerrado, Restinga (FERREIRA; GOMES, 1976; LISITA, 2006; BARBOSA; ALMEIDA-CORTEZ; FERNANDES, 2007; OLIVEIRA et al., 2009; RANGEL; NASCIMENTO, 2011; OLIVEIRA-BENTO, 2012).

O padrão global climático tem mudado em ambientes áridos e semiáridos, comum a *C. procera*, apresentando estiagens prolongadas cada vez mais frequentes (INTERGOVERNMENTAL PAINEL ON CLIMATE CHANGE, 2013). A maioria das plantas C_3 pouco tolera esse novo cenário. Diferentemente, *C. procera* no semiárido apresenta picos de floração e frutificação na estação seca (SOBRINHO et al., 2013), exigindo muito do metabolismo do carbono. Estudo recente realizado por Frosi et al. (2013) mostrou comportamento inverso ao da maioria das plantas C_3, no qual *C. procera* apresentou baixa condutância estomática com taxas elevadas de fotossíntese na seca.

Em um ambiente árido e semiárido é comum a ocorrência de déficit hídrico, limitando o crescimento, desenvolvimento e produtividade das plantas (DONOHUE et al., 2013; ZHU et al., 2012). Em geral, as plantas respondem a seca através de mudanças na morfologia, na fisiologia, em processos bioquímicos e metabólicos e que coletivamente irão permitir um grau de tolerância à seca (KOTTAPALLI et al., 2009). Com base na sua capacidade de tolerância à seca e à níveis altos de sal (KHAN et al., 2007) associados à manutenção das suas folhas e da atividade fotossintética, *C. procera*

torna-se uma espécie de interesse de investigação ecofisiológico, anatômico e molecular (COLOMBO et al. 2007).

Neste sentido, este estudo visa avaliar sob aspectos ecofisiológicos, anatômicos e bioquímicos de duas populações de *C. procera* em condições ambientais diferentes: uma no semiárido e outra no litoral; bem como avaliar plantas jovens de *C. procera* sob déficit hídrico em condições de casa-de-vegetação.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 *Calotropis procera*

2.1.1 Classificação

Segundo classificação de Angiosperm Phylogeny Group (2009), *Calotropis procera* pertence à classe Equisetopsida, subclasse Magnoliidae, superordem Asteranae, ordem Gentianales, família Apocynaceae. O pequeno gênero *Calotropis* compreende três espécies *C. procera*, *C. gigantea* e *C. acia*, sendo a *C. procera* mais bem distribuída nas regiões tropicais e subtropicais (RAHMAN; WILCOCK, 1991). *Calotropis procera* é popularmente conhecida como algodão-de-ceda, flor-de-seda, leiteira, ciúme, queimadeira, janaúba, paininha-de-seda (GALLEGOS-OLEA et al., 2008; RANGEL; NASCIEMENTO, 2011).

2.1.2 Distribuição

Calotropis procera é nativa da África e Ásia, abrangendo desde o noroeste (Senegal e Mauritânia) e norte (Marrocos, Argélia, Líbia e Egito) da África e se estendendo até Península Arábica, Afeganistão, Paquistão e Índia (RAHMAN; WILCOK, 1991; CSURHES; EDWARD, 1998; PARSONS; CUTHBERTSON, 2001; BRANDES, 2005; CSURHES, 2009; BOUTRAA, 2010). Além da sua localidade natural, *C. procera* é amplamente distribuída ao longo do globo principalmente regiões áridas e semiáridas (RANGEL; NASCIMENTO, 2011) como Califórnia, América do Sul, América Central, Caribe, México, Tailândia, Vietnã, Austrália e Havaí (CAB International, 2005; BOUTRAA, 2010).

No Brasil, a *C. procera* foi introduzida no início do século XX na cidade do Recife (KISSMANN; GROTH, 1992; LISITA, 2006; OLIVEIRA-BENTO, 2012), primeiro com intenção ornamental em seguida sendo usada como forragem (SOBRINHO et al., 2013). Entretanto, segundo relatos de Pio Corrêa *C. procera* foi trazida pelos escravos proveniente da África. *Calotropis procera* é bem distribuída na

região Nordeste, mas também é encontrada em outros estados como Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Mato Grosso, Rio de Janeiro, Goiás e no Distrito Federal.

Calotropis procera habita áreas abertas, onde há pouca concorrência de outras plantas, como por exemplo áreas degradadas, terrenos baldios, beira de estrada, em áreas abandonadas, geralmente em solos arenosos em áreas de baixa pluviosidade (KHAN; BEENA, 2002; CAB internacional, 2005). Contudo não é encontrada em florestas densas.

2.1.3 Caracterização

Calotropis procera é uma planta perene, arbustiva ou semi-arbórea, medindo por volta de 2 - 4 m, podendo alcançar 6 m de altura (ISMAIL, 1992; CSURHES, 2009; BOUTRAA, 2010). Possui um sistema radicular bem desenvolvido, com raiz principal pivotante, podendo chegar a 4 m em solos arenosos de desertos (GRACE, 2006; BARBOSA et al., 2013).

Possui fácil propagação através de suas sementes devido a excelente germinação, sem haver necessidade de pré-tratamentos, pois não apresentam dormência, podendo ser plantadas diretamente no solo (VOGT, 1995; BARBOSA; ALMEIDA-CORTEZ; FERNANDES, 2007; CSURHES, 2009). A planta madura pode produzir milhares de sementes a cada ano, que são disseminadas de forma anemocórica, podendo alcançar vários quilômetros (LITTLE; WOODBURY; WADSWORTH, 1974; STAPLES; HERBST, 2005), sendo essa dispersão favorecida devido às sementes serem aladas, envoltas por uma plumagem que facilita o transporte pelo vento (JOLY, 1997; SOUTO et al., 2008; CSURHES, 2009). *Calotropris procera* apresenta crescimento rápido (ANDRADE et al., 2005) e com florescimento e frutificação durante todo o ano (LITTLE; WOODBURY; WADSWORTH, 1974; BARBOSA; ALMEIDA-CORTEZ; FERNANDES, 2007; SOBRINHO et al., 2013), entretanto a maior incidência é na estação seca como observado por Sobrinho et al. (2013).

Calotropis procera ocorre em áreas áridas e semiáridas com precipitação anual variando de 150 a 1000 mm, sendo tolerante à seca e a salinidade (KHAN et al., 2007). Embora preferindo habitats de baixa precipitação, *C. procera* pode persistir nas áreas mais úmidas, desde que o solo seja bem drenado (por exemplo, solo arenoso) (CAB International, 2005). Tolera altitudes de até 1000 m e temperaturas entre 20 e 30ºC, permitindo desenvolver-se em montanhas ou mesmo ao nível do mar, conferindo a esta

espécie uma alta dinâmica em sua ocorrência (LINDLEY, 1985; SAYED; MOHAMED, 2001; KHAN; BEENA, 2002). Essa alta tolerância aos fatores abióticos, associados à manutenção das suas folhas e atividade fotossintética torna a *C. procera* uma espécie de interesse de investigação ecofisiológico, anatômico e molecular (COLOMBO et al. 2007).

2.1.4 Uso

Calotropis procera tem sido amplamente utilizada na medicina tradicional devido a seus compostos ativos farmacológicos encontrados em todas as partes da planta: casca, raiz, folha, flor e, especialmente, o seu látex. Uma vasta gama de compostos químicos foram isolados a partir da *C. procera*, incluindo glicosídeos flavônicos, glicosídeos cardíacos, flavonóides, compostos fenólicos, terpenóides (KHAN; MALIK, 1989; AKTAR et al., 1992; BASU et al., 1992; HUSSEIN et al., 1994; TANIRA et al., 1994; KUMAR; PADHY, 2011; JUCÁ et al., 2013). Muito tem se estudado sobre as propriedades químicas de seu látex (FLEURENTIN; PELT, 1982; AKINLOYE et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2009), usado na defesa contra microorganismos ou insetos (LARHSINI et al., 1997; ALENCAR et al., 2002).

Devido a estes compostos químicos ativos, *C. procera* tem sido utilizado para o tratamento de um número de doenças, tais como úlceras, tumores, lepra, doenças do baço, fígado e abdômen, reumatismo, funciona como um anti-inflamatório, anti-microbiano, analgésico e antihelmínticos (KHAN; MALIK, 1989; AKTAR et al., 1992; BASU et al., 1992; HUSSEIN et al., 1994; TANIRA et al., 1994; MUEEN et al., 2005; KUMAR; ARYA, 2006; KUMAR; PADHY, 2011; JUCÁ et al., 2013).

Além do seu uso medicinal, *C. procera* também tem sido usada para produzir fibra (CROTHERS; NEWBOUND, 1998; CAB International, 2005), e tem sido sugerido como adequado para biocombustível, com um rendimento de culturas potencial de cerca de 90 toneladas por hectare, duas vezes por ano (PARSONS; CUTHBERTSON, 2001); além de grande interesse ornamental (SOBRINHO et al., 2013).

2.2 Déficit hídrico

O estresse pode ser definido, em sentido geral, como uma pressão excessiva de um ou vários fatores adversos que apresenta a tendência de inibir o normal funcionamento dos sistemas (NIU et al., 1995). No campo, as plantas podem experimentar diversos fatores abióticos simultaneamente ou em momentos diferentes, tais como, seca, salinidade, alta temperatura, baixa umidade, alta incidência luminosa, vento, entre outros (TESTER; BACIC, 2005). Dentre esses fatores, a seca é um dos mais limitante na produção vegetal e interfere na distribuição das espécies em diferentes ambientes (FLOWERS, 2004; BARTELS; SUNKAR, 2005; GODFRAY et al., 2010; TESTER; LANGRIDGE, 2010; AGARWAL et al., 2013). Segundo o IPPC (2013) os cenários previstos para as mudanças climáticas preveem o aumento da aridez para áreas semiáridas e mediterrâneas.

Turner (1986, 1997) e Subbarao et al. (1995) propuseram três tipos de resposta das plantas ao déficit hídrico: o mecanismo de escape, o mecanismo de tolerância sob baixo conteúdo de água (tolerância à desidratação) e o mecanismo de tolerância sob alto conteúdo de água (evitamento) que envolve a manutenção de um alto potencial hídrico mesmo sob déficit hídrico (LÜTGE; SCARANO, 2004).

Quanto aos mecanismos de escape, abrange as plantas que tem a capacidade de rápido desenvolvimento fenológico, no qual as plantas podem completar o seu ciclo em um curto período de chuva, e apresentam capacidade de plasticidade no desenvolvimento (TURNER, 1986, 1997; SUBBARAO et al., 1995). No semiárido, há a predominância de comportamento decíduo no período de estiagem, e, no curto período de chuva as plantas desenvolvem o brotamento e a floração (MACHADO; BARROS; SAMPAIO, 1997; BARBOSA; BARBOSA; LIMA, 2003; AMORIM; SAMPAIO; ARAÚJO, 2009; SOUZA et al., 2010). Em algumas espécies a brotação pode ocorrer em decorrência de chuvas esporádicas no período seco, como foi observado em *Croton sonderianus, Combretum leprosum, Mimosa acutistipula* e *Jatropha molíssima* por Amorim et al. (2009).

2.2.1 Comportamento das trocas gasosas e do maquinário fotossintético sob déficit hídrico

Quanto aos mecanismos de tolerância sob alto conteúdo de água, envolve a manutenção de um alto potencial hídrico mesmo sob déficit hídrico (LÜTGE; SCARANO, 2004). Para garantir um alto conteúdo hídrico as plantas aclimatam-se para minimizar a perda d'água. Portanto, o fechamento estomático é a primeira linha de defesa das plantas ao déficit hídrico, desta forma as plantas podem evitar a dessecação por reduzir a taxa transpiratória (MANSFIELD; ATKINSON, 1990; MAHAJAN; TUTEJA, 2005). Além disso, a resistência da camada limítrofe e da cutícula ao vapor d'água também exercem papel importante no declínio na transpiração. O fechamento estomático é mediado pelo ácido abicísico (ABA) que funciona como mensageiro de déficit hídrico no solo entre a raiz e parte aérea mesmo antes da redução do potencial hídrico foliar (SALAH; TARDIEU, 1997; MAHAJAN; TUTEJA, 2005).

Em compensação, o fechamento estomático também reduz a disponibilidade do CO_2 no cloroplasto, pelo aumento da resistência na sua difusão através da redução da condutância estomática (g_s) e da condutância mesofílica (g_m) (FLEXAS et al., 2008; GALMÉS et al., 2007a; GALMÉS; MEDRANO; FLEXAS, 2007). Com isso, a atividade de carboxilação da Rubisco é reduzida, (BOTA; FLEXAS; MEDRANO, 2004) resultando no declínio das taxas fotossintéticas, bem como, no crescimento e na produtividade (CHAVES, 1991; KRAMER; BOYER, 1995; FOYER; NOCTOR, 2000; CHAVES et al., 2002; TANG et al., 2002; FLEXAS et al., 2006; NIINEMETS; KEENAN, 2014). A taxa transportadora de elétrons é sintonizada com a disponibilidade de CO_2 e geralmente declina sob condições de seca, diminuindo a fosforilação, diminuindo a síntese de ATP e consequentemente a regeneração da ribulose-1,5-bifosfato (RuBP). A manutenção de uma alta eficiência do uso da água (EUA) é crucial para a tolerância ao déficit hídrico no solo, pois representa a relação da assimilação de CO_2 por molécula de H_2O perdida para atmosfera (*E*) (MANSUR; BARBOSA, 2000; SILVA et al., 2008). Muitas espécies toleram a seca apresentando alta EUA, como *Calotropis procera*, *C. gigantea* (COLOMBO et al., 2007), *Persea indica* (SÁNCHEZ-DÍAZ; TAPIA; ANTOLÍN, 2007) mantendo o conteúdo hídrico foliar (CHR).

Com a redução na taxa de assimilação do CO_2, pouco poder redutor (NADPH) e energia química (ATP) é consumido no clico de Calvin reduzindo a disponibilidade de NADP+ para receber elétron da cadeia transportadora e aumentando o excesso de energia no sistema (SILVA et al., 2010; UZILDAY et al., 2012). No entanto, o excesso de energia é prejudicial ao sistema, pois desta forma, o fluxo de elétrons proveniente da fotólise da água reduz o O_2 para a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) no

PSI. Formação de ERO é iniciada pela redução de oxigênio molecular univalente utilizando um (superóxido, $O_2^{\cdot -}$), dois (peróxido de hidrogênio, H_2O_2) ou três (radical hidroxila $OH^{\cdot}$) elétrons, ou pela formação de oxigênio singleto ($^1O_2$) por transferência do excesso de energia de excitação ao O_2 no PSII levando a oxidação da proteína D1 (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002; EVA; DEAN, 2003; FOYER; NOCTOR, 2003; WU et al., 2008). ERO são divididas em duas classes principais consistindo em espécies não-radicais (H_2O_2) ou radicais livres ($O_2^{\cdot -}$, $OH^{\cdot}$). Os superóxidos não conseguem atravessar membranas biológicas, ficando confinados no compartimento onde foram gerados (SOARES; MACHADO, 2007), oxidam aminoácidos específicos, como metionina, histidina e triptofano, e também pode causar peroxidação de lipídeos no ambiente celular e nas membranas celulares (BREUSEGEM et al., 2001). Posteriormente, a redução do oxigênio gera peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que, apesar de não ser um radical livre, atravessa as biomembranas e se distribui a partir do local de sua produção (BREUSEGEM et al., 2001). O radical hidroxila é formado pela redução do H_2O_2 por íons metálicos (Fe_2^+ e Cu_2^+) e tem grande afinidade por moléculas biológicas em seu sítio de produção. O radical hidroxila apresenta uma meia-vida muito curta, pois reage muito rapidamente com moléculas biológicas, sequestrando aleatoriamente um átomo de hidrogênio (BREUSEGEM et al., 2001; NORDBERG; ARNER, 2001). Além de provocarem injúria na membrana, as ERO degradam proteína, peroxidação de lipídeos, clorofila, rompimento nos filamentos de DNA e RNA (MITTLER, 2002; UZILDAY et al., 2012).

Para minimizar o dano oxidativo, as plantas apresentam um sistema de defesa endógeno, que incluem moléculas não-enzimáticas e enzimas antioxidativas. Os antioxidantes não-enzimátios apresentam duas classes os lipossolúveis associados a membrana (α-tocoferol e β-caroteno), e os solúveis em água (glutationa, ascorbato e de compostos fenólicos) (ASADA, 1999; LOGAN et al., 2006; ASHRAF; FOOLAD, 2007; ASHRAF, 2009). Antioxidantes enzimáticos incluem o superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do superóxido em H_2O_2; ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT) e peroxidases (POX) são enzimas que catalizam a reação do H_2O_2 em água (POLLE; RENNENBERG, 1992; SGHERRI; MAFFEI; NAVARI-IZZO, 2000). A APX utiliza o ascorbato como doador de elétrons e em combinação com o ciclo do ascorbato-glutationa é um poderoso eliminador de ERO no cloroplasto (SGHERRI; COSI; NAVARI-IZZO, 2003; FOYER; SHIGEOKA, 2011). A CAT tem papel

importantíssimo na eliminação do H_2O_2 produzido pela fotorrespiração no peroxissomo em plantas C_3 (FOYER; FLETCHER, 2001; JAYAKUMAR et al., 2008).

A redução do CO_2 em carboidratos é a via de maior dreno de elétrons, com as taxas fotossintéticas reduzidas em decorrência ao déficit hídrico as plantas tem que usar outras vias para eleminar o excesso de elétrons no sistema, e assim minimizar o dano oxidativo. A fotorrespiração é considerada a segunda via mais importante no consumo de elétrons em plantas C_3 (FOYER, NOCTOR, 2000; NOCTOR et al., 2002). Em menor proporção, a respiração no escuro também funciona como dreno de elétons através da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria. As plantas podem eliminar o excesso de energia na forma de calor (HORTON; RUBAN; WALTERS, 1996), através do ciclo das xantofilas acarretando no aumento do *quenching* não-fotoquímico (DOMONKOS et al., 2013; ESTEBAN et al., 2015).

2.2.2 Bioquímica foliar

A resposta do déficit hídrico na fotossíntese pode também ser avaliada por seus produtos finais, tais como a variação de carboidratos na parte aérea (KRAMER; BOYER, 1995). As células vegetais muitas vezes reduzem o conteúdo de amido na célula e aumentam os açúcares solúveis (ROSSIELLO; FERNANDES; FLORES, 1981), devido à paralisação no crescimento celular e na síntese de sacarose (VASSEY; SARKEY, 1989) para exportação. O acúmulo de sacarose em resposta a condições de estresse (FARRAR; POLLOCK; GALLAGHER, 2000), o que contribui para a regulação osmótica e prevê uma reserva de energia para acelerar e apoiar a recuperação metabólica após a reidratação. Os carboidratos são a principal fonte de energia das mudanças metabólicas que ocorrem durante o estresse ambiental (SIVACI, 2006). Tanto os açúcares como os aminoácidos também desempenham papel importante no aumento da tolerância ao déficit hídrico por ser osmoprotetores, sinalizadores e eliminadores de ERO (BARTELS; SUNKAR, 2005; ROLLAND; BAENA-GONZALES; SHEEN, 2006; RAMEL et al., 2009; LIU et al., 2011; LABANOWSKA et al., 2013; FILEK et al. 2015). Muitos pesquisadores têm investigado a relação entre a assimilação de CO_2 e de produtos finais em várias espécies (QUICK et al., 1992; WINGLER et al., 2006), mostrando o papel dos montantes de açúcares solúveis da folha no mecanismo de *feedback* regulador da fotossíntese. Além disso, a síntese de aminoácidos livres também

pode agir como uma mecanismo de *feedback* secundário na regulação fotossintética (PAUL; PELLNY, 2003).

Quanto ao metabolismo das proteínas, pode ocorrer paralisação da biossíntese protéica inicialmente (KRAMER; BOYER, 1995) e, posteriormente pode haver proteólise (ROY-MACAULEY et al., 1992), o que causa aumento do conteúdo de aminoácidos livres nos tecidos e redução no conteúdo protéico. Contudo, algumas proteínas podem ser sintetizadas como as deidrinas, proteínas de choque térmico (HSP), que têm função na estabilização de outras proteínas citoplasmáticas e membranares (YORDANOV; VELIKOVA; TSONEV, 2000; HOEKSTRA; GOLOVINA; BUITINK, 2001), atuando também na recuperação dos danos causados pelos estresses térmico, osmótico e de desidratação (XIONG; SCUMAKER; ZHU, 2002). As aquaporinas, proteínas intrínseca de membrana, tem papel fundamental nas relações hídricas por facilitar a osmose através de poros específicos na membrana celular (TYERMAN; NIEMIETZ; BRAMLEY, 2002; BARTELS; SUNKAR, 2005). Sob seca, algumas tem sua atividade reduzida como as do metabolismo de carboidratos (CHAVES et al., 2002; VASSEY; SHARKEY, 1989), assim como algumas enzimas dos sistemas antioxidantes.

Quanto aos mecanismos de tolerância à seca sob baixo potencial hídrico, envolve a capacidade da planta em tolerar a desidratação. O ajuste osmótico é o acúmulo de solutos osmoticamente ativos na célula (TURNER, 1986; HARE; CRESS, 1997; CHAVES; MAROCO; PEREIRA, 2003) que permite a manutenção da turgescência celular e crescimento mesmo sob déficit hídrico (TYREE; JARVIS, 1982; LAWLOR; LEACH, 1985; MORGAN, 1984; TURNER, 1986; KOBATA; PALTA; TURNER, 1992; BRAY, 1993; FUNKHOUSER et al., 1994; PALTA et al., 1994; KRAMER; BOYER, 1995). A perda de turgor causado pelo déficit hídrico nas plantas pode parar o crescimento vegetal, além de afetar diversos processos bioquímicos como a diminuição na síntese de proteínas (HSIAO, 1973). Com o ajustamento osmótico, a planta reduz o seu potencial para extrair água do solo e desta forma, consegue manter seus estômatos abertos para assimilação de CO_2 (TYREE; JARVIS, 1982; BRAY, 1993). Os principais solutos responsáveis para o ajustamento osmóticos são: K, NO_3, Cl, SO_4, malato, aspartato, carboidrato (sacarose, hexoses, manitol), aminoácido (prolina, glicina betaína) (HANSON; HITZ, 1982; BARTELS; SUNKAR, 2005). Algumas poucas espécies como *Ziziphus rotundifolia* Lamk. (ARNDT et al., 2001), *Vitis vinifera* L. (PATAKAS et al., 2002), *Eucalyptus cloeziana* (NGUGI et al., 2003),

Populus tremula L. e *Tilia cordata* Mill. (AASAMAA et al., 2004), *Olea europaea* (DICHIO et al., 2006) realizam ajuste osmótico.

A água é o principal fator que determina a disponibilidade de nutrientes no solo, bem como a absorção pelas plantas e translocação a partir das raízes para a parte aérea. O potássio está envolvido em muitos processos fisiológico, tais como ativação de enzimas, síntese de proteínas, fotossíntese, osmoregulation, extensão celular, movimento estomático, entre outros (MARSCHNER, 1995; MENGEL; KIRKBY, 2001; MENGEL, 2007; FAROOQ et al., 2009). Além disto, o número de cloroplastos por célula, o comprimento celular, e a estabilidade de membranas são maiores em plantas bem supridas em potássio. Maiores suprimentos de potássio no milho (PREMACHANDRA; SANEOKA; OGATA, 1991) e na batata (KHOSRAVIFAR et al., 2008) podem garantir maior produção durante períodos de seca.

O nitrogênio é necessário em grandes quantidades e constitui muitas moléculas orgânicas biologicamente importantes, incluindo proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos, vitaminas, entre outros (DUBEY; PESSARAKLI, 2001; HU; SCHMIDHALTER, 2005; BARKER; PILBEAM, 2007). De acordo com Bänziger et al. (2000), cerca de 50% de todo nitrogênio foliar está diretamente envolvida na fotossíntese. Assim, se o suprimento de nitrogênio é insuficiente, fotossíntese é diminuída por redução da área da folha e taxa de fotossíntese, bem como a senescência foliar. A deficiência de nitrogênio frente ao déficit hídrico também pode levar a inibição do crescimento e clorose foliar (POWER, 1990; MAHIEU et al., 2009). Saneoka et al. (2004) demonstraram que o nitrogênio tem papel importante na manutenção na estabilidade da membrana celular e no ajuste osmótico em *Agrostis palustris* sob seca.

A seca provoca uma redução na absorção e transporte de fósforo em plantas, e, consequentemente, induz a redução no conteúdo do fósforo foliar (DOVE, 1969; SARDANS; PEÑUELA, 2004). O fósforo apresenta um importante papel na conservação e transferência de energia no metabolismo celular (JIN et al., 2006; AMTMANN; BLATT, 2009). É um frequente fator limitante para o desenvolvimento da planta (SARDANS; PEÑUELA, 2004), em plantas cultivadas sob deficiência de fósforo apresentam retardado no crescimento, redução na maioria dos processos metabólicos, incluindo células em divisão e expansão, bem como a respiração e a fotossíntese (MARSCHNER, 1995). Plantas que conseguem absorver o fósforo mesmo sob déficit hídrico, como as micorrizadas, são mais tolerantes à seca (POWER, 1990).

2.2.3 Anatomia foliar

Os mecanismos de tolerância sob alto conteúdo de água, também envolvem modificações morfológicas, tais como, manutenção do crescimento do sistema radicular em detrimento da parte aérea para extrair água do subsolo (TARDIEU, 1996; VOLAIRE; THOMAS; LELIEVRE, 1998; BLUM, 2005). A orientação foliar pode ser alterada conforme a incidência dos raios solares. Sob alta intensidade luminosa, as folhas podem estar paralelas aos raios para minimizar o tempo de exposição e evitar o aumento da temperatura foliar (HSIAO, 1990).

Em plantas de ambiente desértico, como as xerófitas, apresentam algumas adaptações à condição de seca. As folhas são pequenas e compactas, apresenta mesofilo espesso, o parênquima paliçádico é mais desenvolvido que o lacunoso, apresenta pequeno volume de espaço intercelular, rede vascular compacta (ESAU, 1974). As xerófitas apresentam muitas vezes uma hipoderme (ESAU, 1974; ARRUDA; MELO-DE-PINNA; ALVES, 2005), também pode apresentar uma epiderme múltipla, principalmente na epiderme superior. Os estômatos podem ser encontrados em depressões abaixo da epiderme proporcionando uma maior camada limítrofe para minimizar a perda d'água para o ambiente (ARRUDA; MELO-DE-PINNA; ALVES, 2005). A presença de cutícula espessa proporciona uma barreira hidrofóbica que minimizar a perda d'água para o ambiente (CHAMEL; PINERI; ESCOURBES, 1991; KERSTIENS, 1996; KOSMA et al., 2009; TIPPLE et al., 2015). Os tricomas contribuem para a reflexão de luz incidente (GALMÉS et al., 2007b) e manutenção da camada limítrofe, minimizando a perda d'água (BURKHARDT et al., 2012) também tem função na diminuição da temperatura foliar.

3 REFERÊNCIAS

AASAMAA, K. et al. Drought acclimation of two deciduous tree species of different layers in a temperate forest canopy. **Trees**. v. 18, p. 93–101, 2004.

ADAIR, R. J.; GROVES, R. H. **Impact of environmental weeds on biodiversity: a review and development of a methodology**. Canberra: National Weeds Program, Environment Australia Special Publication, 1998. 51p.

AGARWAL, P. K. et al. Bioengineering for salinity tolerance in plants: state of the art. **Molecular Biotechnology**, v. 54, p. 102–123, 2013.

AKINLOYE, A. K. et al. Lipolytic eff ect of *Calotropis procera* in the skin of wistar rats. **African Journal of Biomedical Ressearch**, v. 4, p. 143-145, 2001.

AKTAR, N. et al. Proceragenin, and antibacterial cardenolide from *Calotropis procera*. **Phytochemistry**, v.31, n.8, p. 2821-2824, 1992.

ALENCAR, N. M. N. et al. Estudo da atividade antiinflamatória do látex de *Calotropis procera*. In. CONGRESSO BRASILEIRO DE FARMACOLOGIA E TERAPÉUTICA EXPERIMENTAL, 34., 2002, Águas de Lindóia. Anais... Águas de Lindóia (SP), 2002. p.204.

ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Biology**, v. 53, p. 1331–1341, 2002.

AMORIM, I.L.; SAMPAIO, E.V.S.B.; ARAÚJO, E.L. Fenologia de espécies lenhosas da caatinga do Seridó, RN. **Revista Árvore**, v. 33, p. 491-499, 2009.

AMTMANN, A.,; BLATT, M. R. Regulation of macronutrient transport. **New Phytologist**, v. 181, p. 35-52, 2009.

ANDRADE, M.V.M. Aspectos fenológicos, produtivo e qualitativo da Flor de Seda. Areia, PB: Universidade Federal da Paraíba – UFPB, 2005. 82p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Centro de Ciências Agrárias/ Universidade Federal da Paraíba, 2005

APG (Angiosperm Phylogeny Group). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, 105-121, 2009.

ARNDT, S. K. et al. Physiological and morphological adaptations of the fruit tree *Ziziphus rotundifolia* in response to progressive drought stress. **Tree Physiology**. v. 21, p. 705–715, 2001.

ARRUDA, E.; MELO-DE-PINNA, G. F.; ALVES, M. Anatomia dos órgãos vegetativos de Cactaceae da caatinga pernambucana**. Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, p. 589-601, 2005.

ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**., v. 50, p. 601–639, 1999.

ASHRAF, M.; FOOLAD, M.R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environment and Experimental Botany**. v. 59, p. 206–216, 2007.

ASHRAF, M. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 84–93, 2009.

BARBOSA, D.C.A.; BARBOSA, M.C.A.; LIMA, L.C.M. Fenologia de espécies lenhosas de caatinga. In: LEAL, I. R., TABARELLI, M., SILVA, J. M. C. (Eds.), **Ecologia e conservação da Caatinga**. Recife: Editora Universitária (UFPE), 2003, p.657-693.

BARBOSA, N. P. U.; ALMEIDA-CORTEZ, J. S.; FERNANDES, G. W. Uma estranha na paisagem. **Ciência Hoje**, v. 41, p. 70-72, 2007.

BARBOSA, N. P. U. et al. *Calotropis procera*: Um levantamento preliminar sobre as suas capacidades de fitoextração no Brasil. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 8, p. 150–155, 2013.

BARBOSA, M. O.; DE ALMEIDA-CORTEZ, J. S.; DA SILVA, S. I.; DE OLIVEIRA, A. F. M. Seed oil content and fatty acid composition from different populations of *Calotropis procera* (Aiton) W. T. Aiton (Apocynaceae). **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, p. 1433-1441, 2014.

BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 24, n. October 2011, p. 23–58, 2005.

BASU, A. et al. Hepatoprotective effects of *Calotropis procera* root extract on experimental liver damage in animals. **Fitoterapia**, v. 63, n. 6, p. 507-514, 1992.

BLUM, A. Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential—are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 56, p. 1159–1168, 2005.

BOTA, J.; FLEXAS, J.; MEDRANO, H. Is photosynthesis limited by decreased Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress? New Phytologist, v. 162, p. 671–681, 2004.

BOUTRAA, T. Growth performance and biomass partitioning of the desert shrub *Calotropis Procera* under water stress conditions. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 6, n. 1, p. 20–26, 2010.

BRANDES, D. 2005. *Calotropis procera* on Fuerteventura. **Technical University Braunschweig**, p. 1-7, 2005.

BRAY, E. Molecular response to water deficit. **Plant Physiology**, v. 103, p. 1035–1040, 1993.

BREUSEGEM, F. V. et al. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v. 161, p. 405-414, 2001.

BURKHARDT, J. et al. Stomatal penetration by aqueous solutions - an update involving leaf surface particles. **New Phytologist**, v. 196, p. 774–787, 2012.

CAB International (2005). **Forestry Compendium**. Wallingford, UK: CAB International.

CHAMEL, A.; PINERI, M.; ESCOURBES, M. Quantitative determination of water sorption by plant cuticles. **Plant, Cell & Environment**, v.14, p. 87- 95, 1991.

CHAVES, M. M. Effects of water stress on carbon assimilation. **Journal of Experimental Botany**, v. 42, p. 1-16, 1991.

CHAVES, M. M. et al. How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. **Annals of Botany**, v. 89, p. 907–916, 2002.

CHAVES, M. M., MAROCO, J. P., PEREIRA, J. S. Understanding plant responses to drought: from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, v. 30, p. 239–264, 2003.

COLOMBO, R. et al. Relaciones hídricas, fotosíntesis, y anatomía foliar de dos especies del género *Calotropis*. **INCI**, v. 32, p. 791-796, 2007.

COSTA, R. G. et al. Perspectivas da utilização da flor-de-seda (*Calotropis procera*) na produção animal. **Revista Caatinga**, v. 22, p. 01-09, 2009.

CROTHERS, M.; NEWBOUND, S. **Rubber bush, Agnote F64, Northern Territory Department of Primary Industries and Fisheries**. Darwin , 1998.

CSURHES, S. **Weed risk assessment: Calotrope, *Clotropis procera*.** Queensland: Queensland Governmnt, 2009. 17 p.

CSURHES, S.; EDWARDS, R. Potential environmental weeds in Australia: Candidate species for preventive control. **Queensland Department of Natural Resources**, p. 147, 1998.

DICHIO, B. et al. Osmotic regulation in leaves and roots of olive trees during a water deficit and rewatering. **Tree Physiology**, v. 26, p. 179-185, 2006.

DOMONKOS, I. et al. Carotenoids, versatile components of oxygenic photosynthesis. **Progress in Lipid Research**, v. 52, p. 539–561, 2013.

DONOHUE, R. J. et al. Impact of CO_2 fertilization on maximum foliage cover across the globe's warm, arid environments. **Geophysical Research Letters**. v. 40, p. 3031-3035, 2013.

DOVE, L. D. Phosphate absorption by air-stressed root systems. **Planta**, v. 86, p. 1-9, 1969.

DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Physiological mechanisms of nitrogen absorption and assimilation in plants under stressful conditions. In: PASSARAKLI, M. (Ed). **Handbook of Plant and Crop Physiology**, Nova York: Marcel Dekker Inc, 2001, 636-655 p.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 1974, 293 p.

ESTEBAN, R. et al. Versatility of carotenoids: an integrated view on diversity, evolution, functional roles and environmental interactions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 119, 63-75, 2015.

EVA, C.; DEAN, D. P. The role of homogentisate phytyltransferase and other tocopherol pathway enzymes in the regulation of tocopherol synthesis during abiotic stress. **Plant Physiology**, v. 133, p. 930–940, 2003.

FAROOQ, M. et al. Plant drought stress: Effects, mechanisms and management. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 29, p. 185-212, 2009.
FARRAR, J. F.; POLLOCK, C.; GALLAGHER, J. Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants. **Plant Science.** v. 154, p. 1-11, 2000.

FERREIRA, M. B.; GOMES, V. *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. uma invasora a ser estudada e controlada no Estado de Minas Gerais. **Oreades**, v. 5, p. 68-75, 1976.

FILEK, M. et al. Characterization of barley beaf tolerance to drought stress by chlorophyll fluorescence and electron paramagnetic resonance studies. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 201, 228-240, 2015.

FLEURENTIN, J.; PELT, J. M. Repertory of drugs and Medicinal plants of Yemen. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 5, p. 85-108, 1982.

FLEXAS, J. et al. Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO_2 concentration. **New Phytolology**, v. 172, p. 73–82, 2006.

FLEXAS, J. et al. Mesophyll conductance to CO_2: current knowledge and future prospects. **Plant Cell & Environment**, v. 31, p. 602– 621, 2008.

FLOWERS, T. J. Improving crop salt tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 307–319, 2004.

FOYER, C. H.; FLETCHER, J. M. Plant antioxidants: colour me healthy. **Biologist**, v. 48, p.115–120, 2001.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. **New Phytology**, v. 146, p. 359-388, 2000.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v. 119, p. 355-364, 2003.

FOYER, C. H.; SHIGEOKA, S. Understanding Oxidative Stress and Antioxidant Functions to Enhance Photosynthesis. **Plant Physiology**, v. 155, p. 93-100, 2011.

FROSI, G. et al. Ecophysiological performance of *Calotropis procera*: an exotic and evergreen species in Caatinga, Brazilian semiarid. **Acta Physiologia Plantarum**, v. 35, p. 335–344, 2013.

FUNKHOUSER, E. A. et al. Cellular and molecular responses to water deficits stress in woody plants. In: Pessaralakli, M. (Ed.). **Handbook of plant and crop stress**. New York: Marcel Dekker Inc, 1994. p. 347-362.

GALLEGOS-OLEA, R. S. et al. Flavonóides de *Calotropis procera* R. Br. (Asclepiadaceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 10, n. 1, p. 29–33, 2008.

GALMÉS, J. et al. Water relations and stomatal characteristics of Mediterranean plants with different growth forms and leaf habits: responses to water stress and recovery. **Plant Soil,** v. 290, p. 139–155, 2007a.

GALMÉS, J. et al. Photoprotection processes under water stress and recovery in Mediterranean plants with different growth forms and leaf habits. **Physiologia Plantarum**, v. 130, n. 4, p. 495–510, 2007b.

GALMÉS, J.; MEDRANO, H.; FLEXAS, J. Photosynthetic limitations in response to water stress and recovery in Mediterranean plants with different growth forms. **New Phytology**, v. 175, p. 81–93, 2007.

GODFRAY, H. C. et al. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. **Science**, v. 327, p. 812–818, 2010.

GRACE, B. S. 'The biology of Australian weeds 45. *Calotropis procera* (Aiton) W.T.Aiton'. **Plant Protection Quarterly,** v. 21, 152–160, 2006.

HANSON, A.D.; HITZ, W.D. Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. **Annual Review Plant Physiology**, v. 33, p. 163-203, 1982.

HARE, P.D.; CRESS, W.A. Metabolic implications of stress induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 21, p. 79–102, 1997.

HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 431- 438, 2001.

HORTON, P.; RUBAN, A. V.; WALTERS, R. G. Regulation of light harvesting in green plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 47, p. 655–84, 1996.

HSIAO, T. C. Plant response to water stress. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 24, p. 519-570, 1973.

HSIAO, T. C. Mensuraments of plant water status. In: STEWART, B. A.; NIELSEN, D. R. (Eds.). **Irrigation of Agricultural Crops**. Medison: American Society of Agronomy, 1990, p. 244-279.

HU, Y.; SCHMIDHALTER, U. Drought and salinity: A comparison of their effects on mineral nutrition of plants. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 168, p. 541-549, 2005.

HURKA, H.; BLEEKER, W.; NEUFFER, B. Evolutionary processes associated with biological invasions in the Brassicaceae. **Biological Invasions**, v. 5, p. 281-292, 2003.

HUSSEIN, H. I. et al. Uscharin, the most potent molluscicidal compound tested against land snails. **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, n.11, p. 135-140, 1994.

ISMAIL, M. A. Physiological growth analysis of the life-history of *Calotropis procera* (Ait.) Ait. F. **Qatar University Science Journal**, v. 12, p. 94-100, 1992.

IPCC (INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE). *Climate change 2013*: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate. Cambridge: University Press, Cambridge 2013, 1535 p.

JAYAKUMAR, K. et al. Soil applied cobalt alters the nodulation, leg-haemoglobin content and antioxidant status of *Glycine max* (L.) Merr. **Colloids Surf B: Biointerfaces**, v. 67, p. 272–275, 2008.

JIN J. et al. Interaction between phosphorus nutrition and drought on grain yield, and assimilation of phosphorus and nitrogen in two soybean cultivars differing in protein concentration in grains. **Journal of Plant Nutrition**, v. 29, p. 1433-1449, 2006.

JOLY, A. B. **Botânica – Introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Ed Nacional, 1997.

JUCÁ T. L. et al. Insights on the phytochemical profile (cyclopeptides) and biological activities of *Calotropis procera* latex organic fractions. **The Scientific World Journal**, v. 18, p. 1-9, 2013.

KERSTIENS, G. Signalling across the divide: a wider perspective of cuticular structure-function relationships. **Trends in Plant Science**, v. 1, n. 4, 1996.

KHAN, R. et al. Biodiversity of the endophytic fungi isolated from *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. **Pakistan Journal of Botany**, v. 39, p. 2233- 2239, 2007.

KHOSRAVIFAR, S. et al. Effect of potassium on drought tolerance in potato cv. Agria. **Journal of Food Agriculture and Environment**, v. 6, p. 236-241, 2008.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF Brasileira. 1992, 399 p.

KRAMER, P. J., BOYER, J. S. Water relations of plants and soils. Londres: Academic Press, 1995.

KOBATA, T.; PALTA, J. A.; TURNER, N. C. Rate of development of postanthesis water deficits and grain filling in spring wheat. **Crop Science**. v. 32, p. 1238-1242, 1992.

KOSMA, D. K. et al. The impact of water deficiency on leaf cuticle lipids of *Arabidopsis*. **Plant Physiology,** v. 151, 1918–1929, 2009.

KOTTAPALLI, K. R. et al. Physiology and proteomics of the water-deficit stress response in three contrasting peanut genotypes. **Plant, Cell and Environment**, v. 32, p. 380–407, 2009.

KUMAR, V. L.; ARYA, S. Medicinal uses and pharmacological properties of *Calotropis procera*. In: GOVIL, J. N. (Ed.) **Recent Progress in Medicinal Plants**, Houston: Studium Press, 2006, p. 373-388.

KUMAR, V. L.; PADHY, B. M. Protective effect of aqueous suspension of dried latex of *Calotropis procera* against oxidative stress and renal damage in diabetic rats. **Biocell**, v. 35, p. 63-69, 2011.

ŁABANOWSKA, M., et al. The mechanism of thermal activated radicalformation in potato starch studied by electron paramagneticresonance and Raman spectroscopies. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 339–347, 2013.

LARHSINI, M. et al. Evaluation of antifungal and molluscicidal properties of extracts of *Calotropis procera*. **Fitoterapia**, v. 68, p. 371-373, 1997.

LAWLOR, D. W., LEACH, J. E., Leaf growth and water deficits: Biochemistry in relation to biophysics. In: BAKER, R. N.; DAVIES, W. J.; ONG, C. K. (Eds.). **Control of Leaf growth**. Cambridge: Cambridge University Press, 1985, p. 267-294.

LINDLEY, J. **Flora medica**. Nova Deli: Ajay Book Services, 1985.

LISITA, F. O. **Dia de campo sobre: "o uso so algodão-de-seda na alimentação dos ruminantes"**. Corumbá: EMBRAPA, 2006.

LITTLE, E. L.; WOODBURY, R. O.; WADSWORTH, F. H. **Trees of Puerto Rico and the Virgin Islands**. Washingtion, DC: Departament of Agriculture, 1974, 1024 p.

LIU, C., et al. Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six woody plant species in karst habitats of southwestern China Changcheng. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, p. 174-183, 2011.

LOGAN, B. A. et al. The role of antioxidant enzymes in photoprotection. **Photosynthesis Research**, v. 88, p. 119–32, 2006.

LÜTGE, U.; SCARANO, R. Ecophysiology. **Revista Brasileira de Botânica,** 27, 1–10, 2004.

MACHADO, I. C.; BARROS, L. M.; SAMPAIO, E. V. S. B. Phenology of Caatinga species at Serra Talhada, PE, Northeastern Brazil. **Biotropica**, v. 29, p. 57-68, 1997.

MACK, R. N. et al. A. Biotic Invasions: Causes, Epidemiology, Global Consequences, and Control. **Ecological Applications**, v. 10, p. 689-710, 2000.

MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: An overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 444, p. 139-158, 2005.

MAHIEU, S. et al. The influence of water stress on biomass and N accumulation, N portioning between above and below ground parts and on N rhizodeposition during reproductive growth of pea (*Pisum sativum* L.). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, p. 380-387, 2009.

MANSFIELD, T. J.; ATKINSON, C. J. Stomatal behaviour in water stressed plants. In: ALSCHER, R. G.; CUMMING J.R. (Eds.). Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms. Nova York: Wiley-Liss, 1990, p. 241–264.

MANSUR, R. J. C. N.; BARBOSA, D. C. A. Physiological behavior in young plants of four trees species of Caatinga submitted the two cycles of water stress. **Phyton**, v. 68, p. 97–106, 2000.

MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of High Plants**. Londres: Academic Press, 1995, 889 p.

MENGEL, K. Potassium. In: Barker, A. V.; Pilbeam, D. J. (Eds). **Handbook of Plant Nutrition**. Nova York: CRC Taylor and Francis, 2007, p. 91-120.

MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. **Principles of Plant Nutrition**. Switzerland: International Potash Institute, 2001, 687 p.

MITTLER, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants, and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, 405-410.

MORGAN, J. M. Osmoregulation and water stress in higher plants. **Annual Review Plant Physiology**, v. 35, p. 299-319, 1984.

MUEEN, K. K. A.; RANA, A. C.; DIXIT, V. K. *Calotropis* species (Ascelpediaceae), a comprehensive review. **Pharmacognosy Magazine**, v. 1, p. 48-52, 2005.

NGUGI, M. R. et al. Leaf water relations of Eucalyptus cloeziana and Eucalyptus argophloia in response to water deficit. **Tree Physiology**. v. 23, p. 335–343, 2003.

NIINEMETS, Ü.; KEENAN, T. Photosynthetic responses to stress in Mediterranean evergreens: Mechanisms and models. **Environmental and Experimental Botany**, v. 103, p. 24–41, 2014.

NIU, X. et al. Ion Homeostasis in NaCl Stress Environments. **Plant Physiology**, v. 109, p. 735-742, 1995.

NOCTOR, G. et al. Drought and oxidative load in the leaves of C-3 plants: a predominant role for photorespiration? **Annals of Botany**, v. 89, p. 841–850, 2002.

NORDBERG, J.; ARNER, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

OLIVEIRA, S. H. F. et al. Seedling growth of the invader *Calotropis procera* in ironstone rupestrian field and seasonally dry forest soils. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 4, p. 69-76, 2009.

OLIVEIRA-BENTO, S. R. S. Biometria de frutos e sementes, germinação e armazenamento de sementes de flor-de-seda [*Calotropis procera* (Aiton) W. T. Aiton]. Mossoró 2012. 144f. Tese (Doutorado em Fitotecnia), Universidade Federal Rural do Semiárido.

PALTA, J.A. et al. Remobilization of carbon and nitrogen in wheat as influenced by postanthesis water deficits. **Crop Science**, v. 34, p. 118-124, 1994.

PARSONS, W. T.; CUTHBERTSON, E. G. **Noxious weeds of Australia**. Melbourne: CSIRO Publishing, 2001. 712 p.

PATAKAS, A. et al. The role of organic solute and ion accumulation in osmotic adjustment in drought-stressed grapevines. **Plant Science**. v. 163, p. 361–367, 2002.
PAUL, M. J.; PELLNY, T. K. Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. **Journal Experimental Botany**. v. 54, p. 539-547, 2003.

POWER, J. F. Role of moisture stress in plant nutritional functions. In: BALIGAR, V. C.; DUNCAN, R. R. (Eds.). **Crops as enhancers of nutrient use**. San Diego: Academic press, 1990, p. 453-474.

POLLE, A.; RENNENBERG, H. Field studies on Norway spruce trees at high altitudes. II. Defense systems against oxidative stress in needles. **New Phytology**. v. 121, p. 635–640, 1992.

PREMACHANDRA, G. S., SANEOKA, H. OGATA, S. Cell membrane stability and leaf water relations as affected by potassium nutrition of water stressed maize. **Journal of Experimental Botany**, v. 42, p. 739-745, 1991.
QUICK, W. P. et al. The effect of water stress on photosynthetic carbon metabolism in four species grown under field conditions. **Plant, Cell & Environment**, v. 15, p. 25-35, 1992.

RAHMAN, M. A.; WILCOCK, C. C. A taxonomic revision of Calotropis (Asclepiadaceae). **Nordic Journal of Botany**, v. 11, n. 3, p. 301–308, 1991.

RAMEL, F. et al. Natural variation reveals relationships between pre-stress carbohydrate nutritional status and subsequent responses to xenobiotic and oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. **Annals of Botany**, v. 104, p. 1323–1337, 2009.

RANGEL, E. D. S.; NASCIMENTO, M. T. Ocorrência de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. (Apocynaceae) como espécie invasora de restinga. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 3, p. 657–663, 2011.

ROLLAND, F.; BAENA-GONZALES, E.; SHEEN, J. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 675-709, 2006.

ROSSIELLO, R. O. P.; FERNANDES, M. S.; FLORES, J. P. O. Efeitos da deficiência hídrica sobre o crescimento e a acumulação de carbohidratos solúveis de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 16, p. 561-566, 1981.

ROY-MACAULEY, H. Effects of drought stress on proteolytic activities in Phaseolus and Vigna leaves from sensitive and resistant plants. **Physiologia Plantarum**, v. 85, p. 90-96, 1992.

SALAH, H. B. H.; TARDIEU, F. Control of leaf expansion rate of droughted maize plants under flutuating evaporative demand. **Plant Physiology**, v. 114, p. 893-900, 1997.

SÁNCHEZ-DÍAZ, M.; TAPIA, C.; ANTOLÍN, M.C. Drought induced oxidative stress in Canarian laurel forest tree species growing under controlled conditions. **Tree Physiology,** v. 27, p. 1415-1422, 2007.

SARDANS, J.; PEÑUELAS, J. Increasing drought decreases phosphorus availability in evergreen Mediterranean forest. **Plant and Soil**, v. 267, p. 367-377, 2004.

SAYED, O. H.; MOHAMED, M. K. Altitudinal changes in photosynthetic pathways of floristic elements in southern Sinai, Egypt. **Photosynthetica**, v. 38, n. 3, p. 367-372, 2001.

SGHERRI, C. L. M.; MAFFEI, M.; NAVARI-IZZO, F. Antioxidative enzymes in wheat subjected to increasing water deficit and rewatering. **Journal of Plant Physiology**, v. 157, p. 273–279, 2000.

SGHERRI, C.; COSI, E.; NAVARI-IZZO, F. Phenols and antioxidative status of *Raphanus sativus* grown in copper excess. **Physiologia Plantarum**, v. 118, p. 21–28, 2003.

SILVA, E. C. et al. Physiological responses to salt stress in young umbu plants. **Environment and Experimental Botany**, v. 63, 147–157, 2008.

SILVA, E. N. et al. Photosynthetic changes and protective mechanisms against oxidative damage subject to isolated and combined drought and heat stress in *jatropha curcas* plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p. 1157-1164, 2010.

SIVACI, A. Seasonal changes of total carbohydrate contents in three varieties of apple (*Malus sylvestris* Miller) stem cuttings. **Scientia Horticulturae**, v. 109, p. 234-327, 2006.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, p. 9-19, 2007.

SOBRINHO, M. et al. Reproductive phenological pattern of *Calotropis procera* (Apocynaceae), an invasive species in Brazil: annual in native areas; continuous in invaded areas of. **Acta Botanica Brasilica**, v. 27, n. 2, p. 456–459, 2013.

SOUTO, P. C. et al. Biometria de frutos e número de sementes de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. No semi-árido da Paraíba. **Revista Verde**, v. 3, p. 108-113, 2008.

SOUZA, B. D. et al. Water relations and chlorophyll fluorescence responses of two leguminous trees from the Caatinga to different watering regimes. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 32, 235-244, 2010.

STAPLES, G. W.; HERBST, D. R. **A Tropical Garden Flora. Plant Cultivated in the Hawaiian Islands and Other Tropical Places**. Honolulu: Bishop Museum Press, 2005. 918 p.

SUBBARAO, G.V. et al. Strategies for improving drought resistance in grain legumes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 14, p. 469-523, 1995.

TANG, A.C. et al. Photosynthetic oxygen evolution at low water potential in leaf discs lacking an epidermis. **Annals of Botany,** v. 89, p. 861–870, 2002.

TANIRA, M. O. M. et al. Antimic robial and phytochemical screening of medicinal plants of the United Arab Emirates. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 41, p. 201-205, 1994.

TARDIEU, F. Drought perception by plants. Do cells of droughted plants experienc water stress. **Plant Growth Regulation**, v. 20, p. 93-104, 1996.

TESTER, M.; BACIC, A. Abiotic stress tolerance in grasses. From model plants to crop plants. **Plant Physiology**, v. 137, p. 791–793, 2005.

TESTER, M.; LANGRIDGE, P. Breeding technologies to increase crop production in a changing world. **Science**, v. 327, p. 818–822, 2010.

TIPPLE, B. J. et al. Predicting leaf wax n-alkane 2H/1H ratios: controlled water source and humidity experiments with hydroponically grown trees confirm predictions of Craig-Gordon model. **Plant, Cell and Environment**, v. 38, p. 1035-1047, 2015.

TURNER, N. C. Adaptation to water deficits: a changing perpective. **Australian Journal of Plant Physiology**. v. 43, 175-190, 1986.
TURNER, N. C. Further progress in crop water relations. In: SPARKS, D.L. (Ed.) **Advances in agronomy**. Nova Iorque: Academic Press, 1997, p. 293-337.

TYERMAN, S. D.; NIEMIETZ, C. M.; BRAMLEY, H. Plant aquaporins: Multifunctional water and solute channels with expanding roles. **Plant Cell & Environment**, v. 25, p. 173–194, 2002.

TYREE, M. T.; JARVIS, P. G. Water in tissues and cells. In: LANGE, O. L.; NOBEL, P. S.; OSMOND, C. B.; ZIEGLER, H. (Eds.), **Physiological Plant Ecology II: Water Relations and Carbon Assimilation**. Berlin: Springer Verlag, 1982, p. 35–77.

UZILDAY, B. et al. 2012. Comparison of ROS formation and antioxidant enzymes in *Cleome gynandra* (C_4) and *Cleome spinosa* (C_3) under drought stress. **Plant Science**, v. 182, 59-70.

VASSEY, T. L.; SHARKEY, T. D. 1989. Mild water stress of *Phaseolus vulgaris* plants leads to reduced starch synthesis and extractable sucrose phosphate synthase activity. **Plant Physiology**, v. 89, p. 1066-1070, 1989.

VOGT, K. **A field guide to the identification, propagation and uses of common trees and shrubs of dryland Sudan**. UK: SOS Sahel International, 1995.

VOLAIRE, F.; THOMAS, H.; LELIEVRE, F. Survival and recovery of perennial forage grasses under prolonged Mediterranean drought. I. Growth, death, water relations and solute content in herbage and stubble. **New Phytology**, v. 140, p. 439–449, 1998.
WINGLER, A. et al. The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 391-399, 2006.

WU, Q. S.; XIA, R. X.; ZOU, Y. N. Improved soil structure and citrus growth after inoculation with three arbuscular mycorrhizal fungi under drought stress. **European Journal of Soil Biology**, v. 44, p. 122–128, 2008.

XIONG, L.; SCUMAKER, K. S.; ZHU, J. K. Cell signaling during cold, drought and salt stress. **The plant cell**, v. 14, p. 165- 183, 2002.

YORDANOV, I.; VELIKOVA, V.; TSONEV, T. 2000. Plant response to drought, acclimation, and stress tolerance. **Photosynthetica**, v. 38, p. 171-186, 2000.

ZHU, X. C. et al. Arbuscular mycorrhizae improves photosynthesis and water status of *Zea mays* L. under drought stress. **Plant Soil and Environment**. v. 58, p. 186-191, 2012.

4. MANUSCRITO I - Alta atividade fotossintética sob seca severa e intensidade da luz em condições de campo contrastante em *Calotropis procera* uma espécie sempre verde com metabolismo C_3

A ser submetido ao periódico Plant Biology. As normas da revista através do website: http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1438-8677/homepage/ForAuthors.html (Anexo I)

Alta atividade fotossintética sob seca severa e intensidade da luz em condições de campo contrastante em *Calotropis procera* uma espécie sempre verde com metabolismo C_3

Rebeca Rivas[1], Karla Viviane Figueiredo[1], Hiram Marinho Falcão[1], Gabriella Frosi[1], Mauro Guida Santos[1*]

[1] Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Laboratório de Ecofisiologia Vegetal, Av. Prof. Moraes Rego. s/n, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brasil.

*Autor correspondente. Tel.: +55 81 2126 8844. Fax: +55 81 2126 7803 Endereço de email: mauro.gsantos@ufpe.br (M.G. Santos).

Resumo

O objetivo principal deste estudo é avaliar o metabolismo foliar de *Calotropis procera* sob condições de semiárido e litoral. Dois estudos foram realizados em plantas adultas na estação seca e chuvosa de 2012 e 2013, o primeiro em região semiárida e o segundo em região litorânea na areia da praia. Foram realizadas curvas diárias de trocas gasosas, análise bioquímica de metabolismo primário, nutrientes, estresse oxidativo e análise anatômica foliar. No semiárido, *C. procera* foi exposta a uma estiagem prolongada ao longo dos dois anos de estudo, apresentando balanço hídrico negativo ao longo de todo o período de estudo. No litoral, *C. procera* foi exposta a estação chuvosa compatível com o esperado. *Calotropis procera* mesmo exposta a ambientes contrastantes apresentou alta taxa fotossintética mesmo na estação seca sob déficit de pressão de vapor (DPV) e densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF) elevados. Também foi observado aumento de pigmentos fotossintéticos, acúmulo de açúcares e aumento na atividade de enzimas do ciclo antioxidativo em ambas as localidades no período seco. Contudo, os ajustes anatômicos foram contrastantes, enquanto no semiárido houve aumento na espessura do mesofilo no período seco, no litoral houve aumento na espessura da cutícula e aumento na densidade de tricomas. A alta capacidade fotossintética e a habilidade da parte aérea de *C. procera* sob condições de seca suportam a performance apresentada.

Palavras-chave: invasão biológica, fotossíntese, estresse oxidativo, fotoproteção, anatomia foliar

1 Introdução

Algumas espécies possuem a capacidade de colonizar outros ambientes, além do seu ambiente de ocorrência natural. As invasões biológicas são consideradas a segunda maior causa de perda de biodiversidade no mundo (Lonsdale 1999; Lake & Leishman 2004). Muitas espécies exóticas introduzidas intencional ou acidentalmente nos ecossistemas não apenas sobrevivem, mas adaptam-se e passam a competir com as espécies nativas (Adair & Groves 1998; Kimberling 2004).

Calotropis procera é uma espécie invasora, pertencente a família Apocynaceae e possui uma ampla distribuição geográfica. É nativa desde o noroeste da África (Senegal e Mauritânia) até sudoeste da Ásia passando pela Península Arábica, Afeganistão, Paquistão e Índia (Rahman & Wilcok 1991; Lebrun 1998; Parsons & Cuthbertson 2001). Essa espécie é adaptada a regiões desérticas e áridas, porém é comumente encontrada em pastagens, zonas costeiras, próximo a dunas, rodovias e lotes urbanos degradados (Khan & Malik 1989; Souto *et al.* 2008). Como características de invasoras (Costa *et al.* 2009) possui facilidade em dispersar grande quantidade de sementes pelo vento e rápido crescimento, apresentam flores hermafroditas com valor ornamental (Reichard & Hamilton 1997; Barreto *et al.* 1999; Lake & Leishman 2004; Cox 2004; Lloret *et al*. 2005).

O padrão global de chuva tem mudado, estiagens prolongadas são cada vez mais frequentes em ambientes áridos e semiáridos. Para tolerar tais condições, as espécies vegetais precisam alterar seu metabolismo fisiológico, morfológico e anatômico para minimizar os efeitos deletérios ao aparato fotossintético. As estratégias incluem a redução na condutância estomática para restringir a perda d'água para o ambiente em detrimento da assimilação do CO_2, principalmente no horário em que a intensidade luminosa e o déficit de pressão de vapor são máximos (Ribeiro *et al*. 2009; Lawson *et*

al. 2014); o acúmulo de açúcares, aminoácidos que funcionam como osmoprotetores, antioxidantes e sinalizadores do estresse oxidativo; ativação das enzimas do ciclo antioxidatixo como a superóxido dismutase, catalase e ascorbato peroxidase (Noctor *et al.* 2014); e moléculas antioxidantes não enzimáticas tais como, carotenóides, glutationa, ascorbato, tocoferol, compostos fenólicos (Van den Ende & El-Esawe 2014); desenvolvimento do sistema radicular (Fernández 2014), alteração na orientação foliar para reduzir a luz incidente (Joesting *et al*. 2012), aumento na espessura da cutícula (Tipple *et al*. 2015), aumento na densidade de tricomas (Burkhardt *et al*. 2012).

A maioria dos estudos sobre a *C. procera* abordam as suas propriedades medicinais (Magalhães *et al*. 2010; Kumar & Padhy. 2011; Jucá *et al.* 2013; Neto *et al.* 2013). Em termos ecofisiológicos, englobando parâmetros de performance fotossintética e metabolismo primário, os estudos são escassos. Alguns estudos foram realizados com essa espécie focando a parte ecológica (Khan *et al.* 2007; Oliveira *et al.* 2009; Barbosa *et al*. 2013), outros envolvendo aspectos fisiológicos em condições controladas (Boutraa 2010) e condições de campo (Tezara *et al*. 2011), ou envolvendo essas duas condições (Frosi *et al*. 2013).

Dessa forma, o presente estudo investigou quais atributos fisiológicos e anatômicos permitem *C. procera* apresentar forte tolerância frente a condições ambientais diversificadas. Em ambiente semiárido e litorâneo, o trabalho teve como objetivos (i) avaliar a performance de trocas gasosas, (ii) avaliar o metabolismo primário e sistema antioxidativo, (iii) identificar possíveis alterações na anatomia foliar, (iv) investigar se *C. procera* investe nos mesmos atributos fisiológicos para se desenvolver em ambos os ambientes estudados.

2 Material e métodos

2.1 Delineamento Experimental

Foram selecionadas duas populações de *Calotropis procera* (Aiton) W. T. Aiton em dois ambientes distintos no nordeste brasileiro: um no semiárido, município de Serra Talhada (7°57'8.37"S, 38°17'54.07"O); e outro no litoral na praia de Maria Farinha pertencente ao município de Paulista (7°50'33.35"S, 34°50'20.63"O). Foram feitas quatro visitas em cada área de estudo para avaliar dez indivíduos adultos nas estações seca e chuvosa de 2012 e 2013.

No ambiente semiárido o clima é do tipo BSh segundo classificação de Köppen-Geiger (Alvares *et al.* 2013) com precipitação anual de aproximadamente 700 mm concentrado nos meses de janeiro a abril. As análises na estação chuvosa foram realizadas em abril de 2012 e março de 2013; já na estação seca foram realizadas em novembro de 2012 e 2013. O solo é classificado como podzólico vermelho-amarelo, com pH 6,6 e a composição química de fósforo 40 $mg.dm^{-3}$, potássio 0,45 $cmolc.dm^{-3}$, alumínio 0 $cmolc.dm^{-3}$, cálcio 5,05 $cmolc.dm^{-3}$ e magnésio 0,95 $cmolc.dm^{-3}$.

No mesmo período, o estudo em ambiente litorâneo foi realizado em uma população a 200 m de distância da água do mar. O clima é As, segundo classificação de Köppen-Geiger (Alvares *et al.* 2013) com precipitação anual de aproximadamente 2050 mm. As análises na estação chuvosa foram realizadas em junho de 2012 e maio de 2013; já na estação seca foram realizadas em novembro de 2012 e 2013. O solo é classificado como areia quartzosa marinha, com pH 7,4 e composição química de fósforo 19 $mg.dm^{-3}$, potássio 0,04 $cmolc.dm^{-3}$, alumínio 0 $cmolc.dm^{-3}$, cálcio 1,95 $cmolc.dm^{-3}$ e magnésio 0,9 $cmolc.dm^{-3}$.

2.2 Potencial osmótico foliar e *status* hídrico do solo

Para a determinação do potencial osmótico (Ψ_s) 500 mg do tecido foliar foi mantido congelado, posteriormente macerado e centrifugado por 10 min à 10.000g à

4°C o sobrenadante foi usado para medir a osmolaridade (c) (Silva *et al.* 2010) em osmômetro. O potencial osmótico foi determinado usando a fórmula: $\Psi s\ (MPa) = -c$ x 2,58 x 10^{-3}.

As medidas da umidade do solo (US) foram realizadas através do Medidor Falker HFM 2030 (v/v) os valores foram transformados para dados gravimétricos através Ug = Uv x 100 / Ds, onde Ug (%) é a umidade gravimétrica, Uv (%) é a umidade volumétrica, Ds é a densidade do solo (g/cm^3).

Mediante os dados de temperatura média do ar e precipitação pluviométrica, calculou-se o balanço hídrico climático mensal, pelo método proposto por Thornthwaite & Mather (1955), com o auxílio da planilha elaborado por Rolim et al. (1998), assumindo-se uma capacidade máxima de armazenamento de água no solo (CAD) igual a 75 e 100 mm para o semiárido e litoral, respectivamente.

2.3 Curva diária de trocas gasosas

As trocas gasosas foram medidas com o analisador de gases por infravermelho (IRGA, ADC, model LCi-pro; Hoddesdon, UK) na folha madura mais jovem completamente expandida sem senescência. Foi avaliada a resposta ao longo do dia da condutância estomática (g_s), assimilação líquida de CO_2 (*A*), transpiração (*E*) e a eficiência do uso da água (EUA) foi calculada pela divisão de *A* por *E*. A cada medida, foi realizada medições de temperatura e umidade do ambiente, bem como a radiação luminosa incidente no momento das medições para ajuste da densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF) era ajustado conforme a incidência luminosa no momento da medida. O déficit de pressão de vapor (DPV) foi calculado para cada medida ao longo do dia de acordo com Campbell e Norman (1998).

2.4 Análise bioquímica foliar

Em cada dia de visita ao campo, foram coletadas folhas jovens completamente expandidas, sem sinais de senescência, para análises bioquímicas. As folhas foram congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e mantidas em freezer à -20^{o}C. Foram realizadas quantificações de carboidratos solúveis totais (CST) (Dubois *et al.* 1956), aminoácidos livres totais (ALT) (Moore & Stein 1948), proteínas solúveis totais (PST) (Bradford 1976), prolina (Bates *et al.* 1973), frutose (Handel 1968), sacarose (Foreman *et al*. 1973), açúcares redutores (Nelson 1944; Somogyi 1951), pigmentos fotossintéticos (carotenóides, clorofilas *a* e *b*) (Lichtenthaler & Buschmann 2001), nitrogênio (N) e fósforo (P) (Thomas *et al.* 1967), potássio (K) e sódio (Na) (Silva 1999) e cloro (Cl) (Lacroix *et al.* 1970). A fração insolúvel da extração de carboidratos foi usada para determinar o conteúdo de amido. O *pellet* foi hidrolisado por 1 h com 10 unidades de amiloglucosidase, e os açúcares resultantes foram analisados em um segundo tempo utilizando D(+) glicose como padrão (Dubois *et al.* 1956).

Para análise do estresse oxidativo foram quantificados o aldeído malônico (MDA), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e avaliado as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) segundo metodologias proposta por Cakmak e Horst (1991), Alexieva *et al*. (2001), Giannopolitis e Ries (1977), Havir e McHale (1987) e Nakano e Asada (1981), respectivamente.

2.5 Anatomia foliar

2.5.1 Microscopia Óptica

Para a análise de microscopia óptica (MO) foram coletadas de três indivíduos duas folhas maduras mais jovens completamente expandida sem senescência no período

seco e chuvoso de 2013. As folhas foram fixadas em FAA_{50} (formaldeído, ácido acético e etanol 1:1:18, respectivamente) por 48 horas e em seguida preservadas em etanol 70% (Johansen 1940). Foram feitos cortes transversais de 10 μm de espessura realizados no micrótomo rotativo Zeiss modelo HYRAX M55, para realizar medidas de espessura da cutícula, do mesofilo (parênquima paliçádico e lacunoso), da epiderme adaxial e abaxial, utilizando imagens capturadas em fotomicroscópio com auxílio do software Image Pro Plus versão 4.01, sendo tomadas cerca de 25 medidas/folha.

A dissociação foi realizada pelo método descrito por Strittmatter (1973) para realizar medidas de densidade e índice estomático, densidade e índice de tricomas e densidade de células epidérmicas de ambas as faces da folha.

2.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Fragmentos de 0,5 cm^2 foram recolhidos a partir da região central de folha jovem completamente expandida sem senescência no período seco e chuvoso de 2013. O material coletado foi fixado em glutaraldeído (2,5%) em tampão de cacodilato 0,1 M (pH 7,2) e pós-fixados com tetróxido de ósmio e tampão de cacodilato 0,1 M (1:1). Em seguida, as amostras foram desidratadas através de uma série acetônica (30-100%), submetidas a um ponto crítico (CPD 030 BAL-TEC) e subsequentemente metalizado utilizando ouro (Leica - EM SCD500). A epiderme em vista frontal foi examinada usando um microscópio eletrônico de varredura (QUANTA 200FEG).

2.6 Análise estatística

Os dados foram submetidos à ANOVA fatorial, e quando necessário, as médias foram comparadas pelo teste *Student Newman Keuls* com significância ao nível de 5% de probabilidade. A análise de regressão múltipla foi realizada com as variáveis *A* x DFFF x DPV e g_s x DFFF x DPV, também foi feita análise de regressão simples entre

os parâmetros *A* x DFF, *A* x DPV, g_s x DFFF e g_s x DPV. As análises foram realizadas através do software Statistica 8.0 (StatSoft. Inc., Tulsa, OK 74104, USA).

Também foi realizada análise multivariada de componente principal (PCA) com os dados de potencial osmótico, trocas gasosas, bioquímica do metabolismo primário, estresse oxidativo e nutrientes. Os dados da matriz foram transformados por meio do *ranging* para reduzir o efeito da escala numérica entre as diferentes variáveis, permitindo a padronização dos dados. O método de *broken stick* foi utilizado para determinar o nível de importância de cada eixo. As variáveis que mais contribuíram para a distinção dos tratamentos apresentaram valor de correlação >0,70. A PCA foi realizada com auxílio do *software* Fitopac 2.

3 Resultados

3.1 Condições ambientais, umidade do solo e potencial osmótico foliar

Ao longo das 12h do período diurno (com o nascer do sol às 5:00 e pôr do sol às 17:00), *C. procera* foi exposta à variação de DPV e incidência luminosa (Fig. 1 I-L). No início da manhã o DFFF aumentou até por volta das 8:00 h, se manteve até às 14:00 h e em seguida decaiu progressivamente até ás 17:00 h. Na parte ascendente da curva (6:00 – 8:00 h), é notável que na estação seca apresenta maior DFFF quando comparado à estação chuvosa. Com relação ao DPV, no período seco de 2012 foi observado valores máximos de 3 kPa e 6 kPa para o litoral e semiárido, respectivamente (Fig. 1 I, J).

A precipitação anual foi discrepante no semiárido e no litoral, enquanto no primeiro é esperado 700 mm, no segundo espera-se 2050 mm anual (Fig. 2 A, B). Durante o período de estudo, foi notável que a estação chuvosa no semiárido apresentou-se como estiagem prolongada, acumulando um total de 220 mm e 446 mm em 2012 e 2013, respectivamente o que representa uma redução de 70% e 40% de

acordo com o histórico dos últimos 12 anos (Fig. 2 A). Nos meses de análise no período chuvoso houve redução de 77% (abril de 2012) e 60% (março de 2013) na chuva esperada para aquele período. Em consequência, o balanço hídrico anual foi negativo ao longo dos dois anos de estudo (Fig. 2 C). A umidade do solo não apresentou diferença significativa entre os meses, ficando em torno de 5% de umidade (dados não mostrados).

No litoral, a precipitação acumulada em 2012 (1476 mm) foi 30% menor que o esperado e em 2013 (2166 mm) foi compatível com a média histórica. Em todos os meses de análise apresentaram precipitação compatível com a média histórica, com exceção do período seco de 2012 que apresentou 90% menos chuva do que o esperado (Fig. 2 B). Isso refletiu no balanço hídrico que apresentou valores positivos nos meses chuvosos e negativos nos meses de seca (Fig. 2 D). Além disso, o balanço hídrico na seca de 2012 foi 50% mais negativo do que na seca de 2013. Entretanto, não houve diferença ($p>0,05$) quanto a umidade do solo entre a estação seca de 2012 e 2013 (dados não mostrados). Na estação chuvosa houve aumento na umidade do solo em relação à estação seca em 76% e 80% para 2012 e 2013, respectivamente (dados não mostrados).

O potencial osmótico foliar no semiárido apresentou redução de 15% na estação seca (2013) em relação à estação chuvosa de 2013 (dados não mostrados). No litoral, não apresentou diferença significativa entre as estações em ambos os anos (dados não mostrados).

3.2 Curva diária de trocas gasosas

Em ambas as localidades, apresentaram comportamento das taxas de trocas gasosas semelhantes. De um modo geral, as trocas gasosas (g_s, A e E) avaliadas ao longo do dia apresentaram aumento progressivo conforme o aumento da incidência

luminosa até às 08:00 h (Fig. 1 A-F). Um pico nas trocas gasosas foi observado às 14:00 h na estação seca e chuvosa de 2012 em ambas as localidades. A redução nas taxas das trocas gasosas foi observada conforme a incidência luminosa era reduzida até o pôr-do-sol. Além disso, *C. procera* manteve uma alta EUA ao longo do dia, com valores superiores para o ano de 2012 em relação ao ano de 2013 (Fig. 1 G,H).

Mesmo *C. procera* tendo experimentado uma estiagem prolongada nos anos de 2012 e 2013 no semiárido, os indivíduos no período seco apresentaram valores mais altos de trocas gasosas (*A*, g_s e *E*) em relação ao período chuvoso na maior parte do dia. No início da manhã (06:00-08:00 h), o aumento na *A* foi de 80% e 90% para os anos de 2012 e 2013, respectivamente; e entre 11:00 h e 14:00 h houve aumento de 40% para ambos os anos (Fig. 1 C). Na seca de 2012, no início da manhã (06:30 – 08:00 h) a *E* aumentou 50-70% e entre 12:00 h às 14:00 h houve aumento de 60% (Fig. 1 E). Já na seca de 2013, o aumento na *E* foi de 60% (07:00-12:00 h) e de 40% entre 13:00 h e 14:00 h. Quanto a g_s, entre 07:00 h e 08:00 h houve aumento de 40%, e de 40-60 % entre 11:00 h e 13:00 h na seca de 2012 (Fig. 1 A). Já na seca de 2013, a g_s apresentou aumento de 45-55% entre 07:30 h e 13:00 h.

Em ambiente litorâneo, no início da manhã (6:30-8:30 h) a *A* foi aumentada em 50% e 20% para 2012 e 2013, respectivamente; por volta das 10:00 – 13:00 h houve aumento de 25% para o ano de 2012 e de 20% para o ano de 2013, sendo às 14:00 com um pico de 40% (Fig. 1 D). A transpiração se manteve em níveis semelhantes ao longo do dia nos períodos de seca (2012 e 2013) e chuva (2013) (Fig. 1 F). Quanto a g_s, o aumento no início da manhã (6:30 – 9:00 h) foi de 60-70% e 15-35% para 2012 e 2013 respectivamente; entre 10:00 h às 13:00 h houve aumento de 25% em 2012, porém ao meio dia o aumento foi de 4% e 20% para 2012 e 2013, respectivamente (Fig. 1 B).

Com base na regressão múltipla entre *A* x DFFF x DPV apresentou relação substancial (R^2 = 0,60) e alta (R^2 = 0,85) para o semiárido e litoral, respectivamente. O aumento da taxa fotossintética está relacionado principalmente com a incidência luminosa (*A* x DFFF R^2 = 0,60 e R^2 = 0,85 para semiárido e litoral, respectivamente) do que com o DPV (*A* x DPV R^2 = 0,28; R^2 = 0,36 para semiárido e litoral, respectivamente). Além disso, a regressão múltipla entre g_s x DFFF x DPV demonstrou uma relação moderada (R^2 = 0,35) e substancial (R^2 = 0,68) para o semiárido e litoral, respectivamente, indicando que a g_s está mais relacionada com o DFFF (g_s x DFFF R^2 = 0,35 e R^2 = 0,63 para semiárido e litoral, respectivamente) do que com o DPV (g_s x DPV R^2 = 0,14 e R^2 = 0,11 para semiárido e litoral, respectivamente).

3.3 Análise Bioquímica foliar

Apesar da seca prolongada no semiárido houve a manutenção do conteúdo de CST, ALT e prolina, não apresentando diferença entre os meses de coleta (Fig. 3 e 4). Entretanto, foi observado aumento ($p<0,05$) no conteúdo da frutose em 50% (2012) e em 30% (2013), na sacarose em 60% (2012) e em 50% (2013), e nos açúcares redutores em 66% (2012) e em 82% (2013) no período seco em relação ao chuvoso (Fig. 3 C,E,G). Também foi observado redução ($p<0,05$) no teor das PST em 73% no período seco de 2013 em relação ao chuvoso de 2013 (Fig. 4 E); e redução no teor do amido em 86% (2012) e em 52% (2013) no período seco em relação ao chuvoso (Fig. 3 I).

Já no litoral, alterações no acúmulo de solutos foliar foram observadas principalmente no período seco de 2013. Na seca de 2012, frutose (Fig. 3 D) e prolina (Fig. 4 B) aumentaram seus conteúdos em 45% e 32%, respectivamente em relação ao período chuvoso de 2012. Na seca de 2013 houve aumento ($p<0,05$) em 39%, 24% e 64% no conteúdo de CST, amido e PST, respectivamente em relação ao período

chuvoso de 2013; e redução ($p<0,05$) em 37%, 23%, 28% e 20% no conteúdo de ALT, açúcares redutores, sacarose e prolina, respectivamente em relação ao período chuvoso de 2013.

Mesmo no período seco, foi observado aumento ($p<0,05$) nos pigmentos fotossintéticos em relação ao chuvoso em ambas as localidades (Fig. 5). No semiárido, houve aumento, na seca em relação ao período chuvoso, em todos os pigmentos de aproximadamente 74% e 65% para 2012 e 2013, respectivamente (Fig. 5 A,C,E). No litoral, o aumento foi de 25% na seca de 2012 para todos os pigmentos, e na seca de 2013 o aumento observado foi de 22% e 16% para clorofila *b* e carotenóides, respectivamente (Fig. 5 B,D,F).

No semiárido, foi observado aumento no conteúdo do MDA e manutenção no conteúdo de H_2O_2 na seca de 2012 em relação ao período chuvoso de 2012 (Fig. 6 A,C). No litoral, diferentemente, houve redução no conteúdo do MDA e aumento no conteúdo do H_2O_2 em 15% na seca de 2012 em relação ao período chuvoso de 2012 (Fig. 6 B,D). Ainda na seca 2012, houve aumento de 35% e 77% na atividade da SOD e CAT, respectivamente em relação ao período chuvoso de 2012 no semiárido (Fig. 6 E,G); já no litoral houve aumento de 53% da SOD e redução de 96% na atividade da APX na seca de 2012 em relação ao período chuvoso de 2012 (Fig. 6 F,J).

Na seca de 2013 houve redução no conteúdo do H_2O_2 em 43% e 14% no semiárido e no litoral, respectivamente; e manutenção do conteúdo de MDA em relação ao período chuvoso em ambas as localidades (Fig. 6 A-D). No semiárido, houve aumento de 53% na atividade da SOD e redução de 71% na APX na seca de 2013 em relação ao período chuvoso de 2013 (Fig. 6 E,I). No litoral, houve aumento de 37% e 73% na atividade da SOD e APX, respectivamente na seca de 2013 em relação ao período chuvoso de 2013 (Fig. 6 F,J).

Com relação aos nutrientes no semiárido foi observado menor conteúdo de K no período seco em 54% (2012) e 27% (2013) em relação ao período chuvoso (Fig. 7 E). Aumento de 27% foi observado no P na seca de 2012 em comparação ao período chuvoso de 2012 (Fig. 7 C). No litoral, houve aumento do K em 46% (2012) e 30% (2013) na seca em relação ao período chuvoso; e do N em 6% (2012) e 20% (2013) (Fig. 7 B,F); de forma oposta, o conteúdo de P apresentou redução no seu conteúdo em 6% (2012) e 20% (2013) (Fig. 7 D); quanto ao Cl houve aumento (19%) em 2012 e redução (58%) em 2013 (Fig. 7 J).

3.4 Anatomia

O período seco provocou alteração nos atributos anatômicos foliares. No semiárido, houve aumento ($p<0,05$) na espessura da folha, do mesofilo, do parênquima paliçádico, do parênquima lacunoso (Tabela 1). Houve redução ($p<0,05$) na espessura da cutícula em ambas as faces da estação seca em relação à chuvosa no semiárido (Tabela 1). Também houve redução ($p<0,05$) na densidade estomática, tricoma e células epidérmicas da face abaxial no período seco em relação à face abaxial do período chuvoso (Tabela 1). Já no litoral, a espessura do parênquima paliçádico, do mesofilo, da folha total sofreu redução no período seco (Tabela 1). Porém, houve aumento na densidade e no índice de tricomas e espessura da cutícula em ambas as faces no período seco (Tabela 1).

3.5 Análise multivariada através do componente principal

A PCA realizada com todos os parâmetros analisados com exceção dos atributos anatômicos revelou a distinção de quatro grupos, formando um gradiente hídrico para ambas as localidades (Fig. 8). No semiárido, a PCA foi responsável por 71,7% da

variância total do conjunto de dados, sendo 45,7% no primeiro componente principal (PC1) e 25,98% no segundo componente principal (PC2) (Fig. 8 A). Para o PC1 as variáveis que mais contribuíram para a separação dos grupos (autovetor > 0,7) por ordem de importância foram: *A* às 6h, *A* às 12h, sacarose, carotenóides, *E* às 12h, clorofila *a*, *E* às 4h, EUA às 6h, frutose, clorofila *b*, *A* às14h, g_s às 12h, P, K, PRT e Na. Para o PC2 que mais contribuíram para a separação dos grupos (autovetor > 0,7) por ordem de importância foram: EUA às 8h, MDA, g_s às 6h, EUA às 14h, *E* às 16h, EUA às 12h, g_s às 8h, *A* ás 16h e CAT. O PC1 gerou um gradiente hídrico formado pelos períodos de seca 2012 (1 mm), seca 2013 (5 mm), chuva 2013 (38 mm) e o PC2 separou o período chuvoso de 2012 (20 mm) dos demais grupos (Fig. 8 A).

No litoral, a PCA foi responsável por 76,8% da variância total do conjunto de dados, sendo 46,29% no PC1 e 30,54% no PC2 (Fig. 8 B). Para o PC1 as variáveis, por ordem de importância (autovetor > 0,7), que mais contribuíram para a separação foram: *E* às 8h, g_s às 16h, *A* às 8h, *E* às 14h, *E* às 10h, SOD, g_s às 8h, *A* às 16h, *E* às 16h, *A* às 14h, K, frutose, clorofila *a*, g_s às 10h, APX e g_s às 14h. Para o PC2 as variáveis mais correlacionadas foram amido, CST, açúcares redutores, PST, ALT, N, clorofila *b*, Cl, P, carotenóides e prolina. O PC1 gerou um gradiente hídrico formado pelos meses de seca 2012 (5 mm), chuva 2013 (375 mm), chuva 2012 (550 mm) e o PC2 separou a seca 2013 (75 mm) dos demais grupos (Fig. 8 B).

4 Discussão

A escassez de chuva, que proporciona déficit hídrico no solo do Nordeste brasileiro, é acompanhada por outros fatores limitantes para produção vegetal, como alta incidência luminosa, alta temperatura e baixa umidade. *Calotropis procera*, apesar

de apresentar metabolismo C_3, é nativa de ambiente árido, dessa forma, sendo capaz de apresentar tolerância à seca, salinidade, alto DPV e alta incidência luminosa (Khan *et al.* 2007; Tezara *et al*. 2011; Frosi *et al*. 2013). Entretanto, ainda é pouco compreendido o sucesso por trás de sua distribuição em ambientes contrastantes. Assim, o nosso objetivo foi avançar no conhecimento sobre os mecanismos pelos quais *C. procera* torna-se tolerante à seca mesmo em ambientes discrepantes, como o semiárido e litorâneo.

No ambiente semiárido e litorâneo, *C. procera* experimentou alta variação de luz e DPV ao longo do dia, com regimes hídricos diferenciados entre as localidades, que proporcionaram a manutenção do balanço hídrico do solo negativo na estação seca no ambiente litorâneo e no semiárido ao longo dos dois anos de estudo (Fig. 2). Apesar desse cenário desfavorável para a maioria das plantas C_3, *C. procera* apresentou tolerância a essas condições ambientais, mantendo altas taxas de trocas gasosas, alterando o metabolismo bioquímico e ajustando as estruturas anatômicas em ambos os ambientes, de forma diferente, o que é um indicativo da plasticidade da espécie.

Independente da estação do ano e do local de estudo, a curva diária de trocas gasosas em *C. procera* apresentou comportamento semelhante, com a estação seca apresentando as maiores taxas fotossintéticas em relação a estação chuvosa (Fig. 1). Através da regressão feita (*A* x DFFF x DPV) foi possível observar que independente da precipitação, a fotossíntese em *C. procera* responde mais fortemente à luz do que ao DPV. Resultados semelhantes foram encontrados por Frosi *et al.* (2013), que avaliaram o comportamento das trocas gasosas ao longo do dia em *C. procera*, verificando maiores taxas de trocas gasosas no período seco. Diferentemente, outra Apocynaceae com metabolismo C_3, sempre verde de ambiente árido, a *Rhazya stricta*, apresentou redução na g_s, *A* e *E* quando os valores de DFFF e DPV foram máximos (Lawson *et al.*

2014). Gatti e Rossi (2010) também verificaram redução na fotossíntese nas horas mais quente do dia em *Pistacia lentiscus*. Esses resultados indicam que *C. procera* apresenta uma alta eficiência fotossintética e a alta eficiência do uso da luz (Schulten *et al.* 2014).

A condutância estomática apresentou curso diário semelhante ao da fotossíntese, mantendo valores baixos ao longo do dia, tendo como valor máximo na seca de 2012 0,2 e 0,1 $mol.m^2.s^{-1}$ para o semiárido e litoral, respectivamente (Fig. 1 A,B). Esse comportamento indica que a g_s não foi limitante para a fotossíntese. Por outro lado, como a maioria das plantas C_3, *R. stricta* apresentou valor alto de g_s 0,45 $mol.m^2.s^{-1}$ às 8:00 h e em seguida o valor decresce (0,05 $mol.m^2.s^{-1}$) até às 14:00 h quando o DFFF e DPV foram máximos (Lawson *et al.* 2014). É comum observar plantas de metabolismo C_3 em ambientes áridos com baixa g_s, mas consequentemente acarretando na limitação da assimilação de CO_2 (Niinemets & Keenan 2014; Kropp & Ogle 2015). A baixa taxa na condutância estomática associada a altas taxas de fotossíntese em *C. procera* pode ter sido garantida pela manutenção da condutância mesofílica, como foi observado em plantas jovens de *C. procera* submetidos ao déficit hídrico (dados não publicados).

No presente estudo a *C. procera* foi exposta a ciclos recorrentes de seca, uma vez que presente sob sazonalidade em ambiente semiárido e litorâneo. Contudo, no período de estudo, 2012 e 2013 no semiárido, houve redução na precipitação nas estações chuvosas, proporcionando uma maior intensidade do estresse no período seco o que resultou em respostas diferentes de um ano para o outro. Na seca de 2012 no semiárido a tolerância foi observada principalmente pela alta EUA (7:00 – 14:00 h), mesmo apresentando maior g_s, o que pode ter sido proporcionada pela maior incidência luminosa e maior DPV nesse período (evidenciada pela regressão g_s x DFFF e g_s x DPV) (Fig. 1 A,G,I,K). Já na seca de 2013 no semiárido, *C. procera* manteve a g_s baixa (6:00 – 15:00 h), porém com altos valores de fotossíntese (6:15 – 10:00 h) e redução do

potencial osmótico. Sob condições estressantes, as plantas podem manter a homeostase, porém a resposta dependerá do tempo, da intensidade e do número de eventos ao estresse (Chaves *et al*. 2009). Estudos recentes demonstram que quando a planta passa por um evento de estresse e esse evento é recorrente a planta tende a apresentar maior tolerância, evento conhecido como *hardening* (Walter *et al.* 2011; Rivas *et al.* 2013).

A variação sazonal proporcionou alteração no metabolismo primário de *C. procera*. No semiárido, o acúmulo dos açúcares (frutose, sacarose e açúcares redutores) e a manutenção dos aminoácidos pode ter sido garantido pela alta taxa fotossintética ao longo do dia. Para prevenir o estresse oxidativo as plantas têm desenvolvido mecanismo de síntese e acúmulo de açúcares e aminoácidos (Liu *et al.* 2011). Em *C. procera* houve o acúmulo de sacarose, frutose e açúcares redutores que podem atuar como sinalizadores, dreno de elétrons e atuam como sequestradores de ERO, evitando o estresse oxidativo (Ramel *et al*. 2009; Labanowska *et al.* 2013; Filek *et al.* 2015). No litoral, *C. procera* apresentou ajuste no metabolismo bioquímico nos dois anos de estudo, entretanto esse ajuste foi maior em 2013. Na seca de 2012, as plantas apresentaram aumento apenas na frutose e prolina, que pode ter auxiliado na prevenção do estresse oxidativo (Liu *et al.* 2011). A prolina tem papel no sequestro de radical hidroxila (Smirnoff & Cumbes 1989) e na estabilidade de membrana (Rudolph 1986) o que foi comprovado pelo menor conteúdo do MDA. Na seca de 2013, o acúmulo de proteína, amido e CST pode ser um indicativo de crescimento das plantas, pode ter sido exposta a um balanço hídrico menos negativo em relação à seca de 2012. Além disso, é na estação seca que há uma exigência energética maior por causa do pico de florescimento e frutificação naquele período (Sobrinho *et al.* 2013).

O aumento dos pigmentos fotossintéticos na estação seca em ambas as localidades (Fig. 5), pode ter garantido a manutenção de uma alta taxa fotossintética

naquele período, além de funcionar como dreno de elétrons (Lawlor e Cornic 2002). O sucesso da fotossíntese também depende da capacidade de fotoproteção. Os carotenóides são moléculas com papel fundamental na dissipação do excesso de energia como forma de calor, tal como o ciclo das xantofilas, evitando dano ao aparato fotossintético (Domonkos *et al*. 2013; Esteban *et al*. 2015). Além disso, os carotenoides são precursores de biomoléculas com papel importante na sinalização do estresse oxidativo (Ramel *et al*. 2012; Esteban *et al.* 2015), e também funcionam como antioxidante, atuando na eliminação do oxigênio singleto (Cazzaniga *et al*. 2012), bem como na memória ao estresse luminoso a curto e longo prazo (García-Plazola *et al.* 2012; Esteban *et al.* 2015).

A estiagem prolongada ao longo dos dois anos de estudo no semiárido proporcionou dano oxidativo no período seco de 2012 e no período chuvoso e seco de 2013. O dano na membrana plasmática foi evidenciado pelo aumento no conteúdo do MDA, causado por ERO capazes de realizar a peroxidação lipídica da membrana, como oxigênio singleto e radical hidroxila. O aumento na atividade da CAT pode estar relacionado ao aumento da fotorrespiração, pois o produto H_2O_2 é degradado pela CAT no peroxissomo (Hagemann *et al*. 2013). Já no ambiente litorâneo, não foi observado aumento de dano nas membranas no período seco, uma vez que o aumento na atividade da SOD minimizaria o efeito deletério do superóxido ($O^{\cdot -}$) que apresenta toxicidade mais elevada que o H_2O_2 (Filek *et al.* 2015). Além da SOD, na seca de 2013 houve um aumento na atividade da APX como forma de reduzir o conteúdo de H_2O_2 presente no cloroplasto (Asada 1999).

A manutenção do conteúdo elevado de nitrogênio foliar (semiárido e litoral) pode está relacionada a altas taxas fotossintéticas (Oliveira *et al.* 2014), onde a alocação de nitrogênio para a fotossíntese é evidenciada pela manutenção dos ALT, prolina e

PST. Em estudo realizado por Oguchi *et al.* (2003) foi demonstrado que a taxa fotossintética aumenta com o incremento do conteúdo de nitrogênio em *Chenopodium album*. As altas taxas fotossintéticas também podem ter sido garantidas pela manutenção no conteúdo de fósforo foliar (semiárido, seca 2012), no qual o suprimento de fósforo garante a capacidade da Rubisco em fixar CO_2, pois o P é constituinte do NADPH e ATP, necessários para a fixação do CO_2, e na capacidade de regeneração da ribulose 1,5-bifosfato (RuBP) (Warren 2011; Singh *et al*. 2013). O aumento no conteúdo de potássio no semiárido no período seco, pode auxiliar na manutenção das taxas fotossintéticas (Marschner & Marschner 2012), pois está relacionado com a ativação de várias enzimas, com a osmoregulação, controle do movimento estomático e manutenção da pressão de turgor (Pervez *et al.* 2004). Estudo realizado por Wang *et al.* (2015) demonstraram que plantas de soja sem deficiência de potássio apresentou aumento da fotossíntese com o aumento da incidência luminosa. Além disso, é importante destacar que a maior concentração de potássio no período seco no litoral pode ter sido proporcionada pelo período de menor lixiviação, entretanto no semiárido a maior concentração do K no período chuvoso pode ter sido favorecido pelo fluxo de massa (Oliveira *et al*. 2004).

As condições ambientais também interferiram nos atributos anatômicos de *C. procera* diferentemente no semiárido e litoral. No semiárido, houve aumento na espessura do mesofilo, onde está localizado o maquinário fotossintético, sendo importante para a organização dos cloroplastos na superfície celular do mesofilo, favorecendo a assimilação do CO_2 (Oguchi *et al.* 2003). Já no litoral, houve aumento da espessura da cutícula que proporciona uma barreira hidrofóbica a fim de minimizar a perda d'água para o ambiente (Kerstiens 1996; Kosma *et al*. 2009; Tipple *et al.* 2015). O aumento na densidade de tricomas contribui para a reflexão de luz incidente (Galmés

et al. 2007) e manutenção da camada limítrofe, minimizando a perda d'água (Burkhardt *et al.* 2012). Em concordância, foi constatado aumento na densidade de tricomas em *C. procera* em ambiente costeiro considerado como semi-desértico na Venezuela (Tezara *et al.* 2011). Desta forma, a cutícula e os tricomas exercem um papel fundamental no ambiente litorâneo sob alta incidência de vento e luz para manutenção da camada limítrofe e fotoproteção de *C. procera* (Tezara *et al.* 2011), minimizando os efeitos deletérios do excesso de energia e fazendo uso eficiente da luz incidente para fotossíntese. Além disso, em ambas as localidades a MEV revelou que os estômatos estão inseridos dentro de uma câmera (Fig. 9), que proporciona um microclima favorável com a manutenção da camada limítrofe que evita maiores perdas d'água pela transpiração, proporcionando o aumento da EUA.

O resultado da PCA nos permite entender como o conjunto de dados fisiológicos influencia na interpretação das respostas das plantas às condições ambientais. O gradiente hídrico formado no semiárido constituído pela seca de 2012 (1,6 mm), seca de 2013 (3,9 mm) e chuva de 2013 (38 mm), indica que quanto menos chuva maior os *scores* das trocas gasosas no período entre 12:00 e 14:00 h, bem como o maior acúmulo de frutose, sacarose e pigmentos fotossintéticos. Isso nos leva a crer que, a função antioxidante dos açúcares e dos carotenóides favoreceram a proteção ao aparato fotossintético para manutenção das trocas gasosas. Um gradiente hídrico também foi observado por Gatti e Rossi (2010) entre os meses de maio-setembro de 2004, porém com as taxas fotossintéticas aumentando conforme o aumento da precipitação em *P. lentiscus*. Diferentemente ao presente trabalho, Palacio et al. (2007) observaram que o conteúdo do CST aumenta conforme a precipitação aumenta em *Linum suffruticosum*. Além disso, com a análise multivariada, foi possível observar que há uma separação da estação chuvosa de 2012 em relação aos demais grupos, provavelmente pelo fato desse

período ter sido mais ameno que os demais, proporcionando maior EUA, menor dano oxidativo na membrana plasmática, bem como redução na atividade da CAT e SOD.

No litoral, pela análise multivariada PCA, também foi verificado um gradiente hídrico formado pela seca de 2012 (5 mm), chuva de 2013 (375 mm) e chuva de 2012 (550 mm), indicando que quanto menos chuva maior as trocas gasosas no período de 08:00 – 16:00, bem como maior concentração de frutose e atividade da SOD que apresenta papel antioxidante fundamental ao aparato fotossintético. Diferentemente, Huang e Zhang (2016) observaram que a transpiração em *Caragana korshinskii* e *Artemisia ordosica* aumentava conforme aumentava a quantidade de chuva entre 2008 e 2010. Além disso, na seca de 2013 mesmo apresentando altas taxas de trocas gasosas não fez parte desse gradiente hídrico, pois apresentou uma atividade metabólica mais ativa do que nos demais meses. Sugere-se que as condições sofridas por *C. procera* na seca 2013, sobretudo pela precipitação esperada de 75 mm, para aquele período, tenha favorecido um maior ajuste no metabolismo primário.

Os dados apresentados sob ambas as condições estudadas mostraram que *C. procera* apresentou múltiplos ajustes para tolerar as condições ambientais em ambas as localidades. Alguns dos ajustes podem ser notados nos dois ambientes, embora o regime hídrico seja completamente diferente entre o semiárido e o litoral. A fotossíntese se manteve elevada no período seco mesmo no ponto máximo de DPV e DFFF em ambas as localidades. *C. procera* utiliza os açúcares e os carotenóides como moléculas antioxidantes e sinalizadoras do estresse oxidativo. Além disso, a SOD e a CAT são as principais enzimas utilizadas para combater o estresse oxidativo na seca. A atuação da APX é mais destacada em momentos diferentes no semiárido (seca 2012) e litoral (seca 2013). Sob ambientes diferentes, *C. procera* apresentou atributos anatômicos discrepantes. Nas plantas do litoral apresentou aumento na espessura da cutícula e

densidade dos tricomas que proporciona maior fotoproteção e manutenção da camada limítrofe, já no semiárido apresentou aumento na espessura do mesofilo relacionada a alta capacidade fotossintética de *C. procera*. Nossos resultados colaboram para o avanço do entendimento de como uma espécie C_3 e sempre verde apresenta um metabolismo fotossintético intenso sob condições estressantes, divergindo de outras espécies com o mesmo tipo de metabolismo.

7 Agradecimentos

Rebeca Rivas agradece pela bolsa de doutorado concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

8 Referências

Adair, R.J., Groves, R.H. (1998) *Impact of environmental weeds on biodiversity: a review and development of a methodology*. National Weeds Program, Environment Australia Special Publication, Canberra: 51 pp.

Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., Karanov, E. (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell and Environment*, **24**, 1337–1344.

Alvares, C.A., Stape, J.L., Sentelhas, P.C., Gonçalves, J. L. M., Sparovek, G. (2013) Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, **22**, 711–728.

Asada, K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **50**, 601–39.

Barbosa, N.P.U., Fernandes, G.W., Uemura, G., Menezes, M.A.B.C., Matos, L.V.S., Silva, M.A., Menezes, R.S.C., Almeida-Cortez, J.S. (2013) *Calotropis procera*: Um levantamento preliminar sobre as suas capacidades de fitoextração no Brasil. *Neotropical Biology and Conservation*, **8**, 150–155.

Barreto, R.W., Evans, H.C., Pomella, A.W.V. (1999) Fungal pathogens of *Calotropis procera* (rubber bush), with two new records from Brazil. *Australasian Plant Pathology*, **28**, 126-130.

Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, **39**, 205–207.

Boutraa, T. (2010) Growth performance and biomass partitioning of the desert shrub *Calotropis procera* under water stress conditions. *Research Journal of Agriculture And Biological Sciences*, **6**, 20–26.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248–254.

Burkhardt, J., Basi, S., Pariyar, S., Hunsche, M. (2012) Stomatal penetration by aqueous solutions - an update involving leaf surface particles. *New Phytologist*, **196**, 774–787.

Cakmak, I., Horst, W. (1991) Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum*, **83**, 463–468.

Campbell, G.S., Norman, J.M. (1998) An introduction to environmental biophysics. Springer-Verlag, New York.

Cazzaniga, S., Li, Z., Niyogi, K.K., Bassi, R., Dall'Osto, L. (2012) The *Arabidopsis* szl1 mutant reveals a critical role of b-carotene in photosystem I photoprotection. *Plant Physiology*, **159**, 1745–1758.

Chaves, M.M., Flexas, J., Pinheiro, C. (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, **103,** 551-560.

Costa, R.G., Medeiros, A.N., Alves, A.R., Medeiros, G.R. (2009) Perspectivas da utilização da flor-de-seda (*Calotropis procera*) na produção animal. *Revista Caatinga*, **22**, 01-09.

Cox, G.W. (2004) Adaptation of alien species for dispersal and establishment. In: Cox, G.W. (Edt.). *Alien species and evolution – The evolutionary ecology of exotic plants, animals, microbes, and interacting native species*. Island Press, Washington, D.C.: 17-31.

Domonkos, I., Kis, K., Gombos, Z., Ughy, B. (2013). Carotenoids, versatile components of oxygenic photosynthesis. *Progress in Lipid Research*, **52**, 539–561.

DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J. K., Rebers, P.A., Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, **28**, 350–356.

Esteban, R., Moran, J.F., Becerril, J.M., García-Plazaola, J.I. (2015) Versatility of carotenoids: an integrated view on diversity, evolution, functional roles and environmental interactions. *Environmental and Experimental Botany*, **119**, 63-75.

Fernández, J.E. (2014) Understanding olive adaptation to abiotic stresses as a tool to increase crop performance. *Environmental and Experimental Botany,* **103**, 158–179.

Filek, M., Łabanowska, M., Kocielniak, J., Biesaga-Koscielniak, J., Kurdziel, M., Szarejko I., Hartikainen, H. (2015) Characterization of Barley Leaf Tolerance to Drought Stress by Chlorophyll Fluorescence and Electron Paramagnetic Resonance Studies. *Journal of Agronomy and Crop Science*, **201**, 228-240.

Foreman, D., Gaylor, L., Evans, E., Trella, C. (1973) A modification of the Roe procedure for determination of fructose in tissues with increased specificity. *Analytical Biochemistry*, **56**, 584–590.

Frosi, G., Oliveira, M.T., Almeida-Cortez, J., Santos, M.G. (2012) Ecophysiological performance of *Calotropis procera*: an exotic and evergreen species in Caatinga, Brazilian semiarid. *Acta Physiologia Plantarum*, **35**, 335–344.

Galmés, J., Abadía, A., Cifre, J., Medrano, H., Flexas, J. (2007) Photoprotection processes under water stress and recovery in Mediterranean plants with different growth forms and leaf habits. *Physiologia Plantarum*, **130**, 495–510.

García-Plazaola, J.I., Esteban, R., Fernández-Marín, B., Kranner, I., Porcar-Castell, A. (2012) Thermal Energy dissipation and xanthophyll cycles beyond the *Arabidopsis* model. *Photosynthesis Research*, **113**, 89–103.

Gatti, E., Rossi, F. (2010) Daily and seasonal trends of gas exchange in *Pistacia lentiscus* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, **32**, 809-813.

Giannopolitis, C.N., Ries, S.K. (1977) Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, **59**, 309–14.

Hagemann, M., Fernie, A.R., Espie, G.S., Kern, R., Eisenhut, M., Reumann, S., Bauwe, H., Weber, A.P.M. (2013) Evolution of the biochemistry of the photorespiratory C_2 cycle. *Plant Biology*, **15**, 639-647.

Handel, E.V. (1968) Direct microdetermination of sucrose. *Analytical Biochemistry*, **22**, 280–283.

Havir, E.A., McHale, N.A. (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology*, **84**, 450–455.

Huang, L., Zhang, Z. (2016) Effect of rainfall pulses on plant growth and transpiration of two xerophytic shrubs in a revegetated desert area: Tengger Desert, China. *Catena*, **137**, 269-276.

Joesting, H.M., Sprague, M.O., Smith, W.K. (2012) Seasonal and diurnal leaf orientation, bifacial sunlight incidence, and leaf structure in the sand dune herb *Hydrocotyle bonariensis*. *Environmental and Experimental Botany*, **75**, 195–203.

Johansen, D.A. (1940). *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill Book Company Inc., New York: 523 pp.

Jucá, T.L., Ramos, M.V., Moreno, F.B., Matos, M.P.V., Marinho-Filho, J.D., Moreira, R.A., Monteiro-Moreira, A.C.O. (2013) Insights on the phytochemical profile (cyclopeptides) and biological activities of *Calotropis procera* latex organic fractions. *The Scientific World Journal,* **18**, 1-9.

Kerstiens, G. (1996) Signalling across the divide: a wider perspective of cuticular structure-function relationships. *Trends in Plant Science,* **1**, 125-129.

Khan, A.Q., Malik, A. (1989) Asteroids from *Calotropis procera*. *Phytochemuisty*, **28**, 2859-2861.

Khan, R., Shahzad, S., Choudhary, M.I., Khan, S.A., Ahmad, A. (2007) Biodiversity of the endophytic fungi isolated from *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. *Pakistan* Journal of *Botany*, **39**, 2233–2239.

Kimberling, D.N. (2004) Lessons from history: predicting successes and risks of intentional introductions for arthropod biological control. *Biological Invasions*, **6**, 301-318.

Kosma, D.K., Bourdenx, B., Bernard, A., Parsons, E.P., Lu, S., Joubes, J., Jenks, M.A. (2009) The impact of water deficiency on leaf cuticle lipids of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **151**, 1918–1929.

Kropp, H., Ogle, K. (2015) Seasonal stomatal behavior of a common desert shrub and the influence of plant neighbors. *Oecologia,* **177**, 345-355.

Kumar, V.L., Padhy, B.M. (2011) Protective effect of aqueous suspension of dried latex of *Calotropis procera* against oxidative stress and renal damage in diabetic rats. *Biocell*, **35**, 63-69.

Lacroix, R.L., Keeney, D.R., Walsh, L.M. (1970) Potentiometric titration of chloride in plant tissue extracts using the chloride ion electrode. *Commun Soil Sci Plant* **1**, 1–6.

Lake, J.C.; Leishman, M.R. (2004) Invasion success of exotic plants in natural ecosystems: The role of disturbance, plant attributes and freedom from herbivores. *Biological Conservation*, **117**, 215-226.

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

Lawson, T., Davey, P.A., Yates, S.A., Bechtold, M., Baeshen, M., Baeshen, N., Mutwakil, M.Z., Sabir, J., Baker, N.R., Mullineaux, P.M. (2014) C_3 photosynthesis in the desert plant Rhazya stricta is fully functional at high temperatures and light intensities. *New Phytologist*, **201**, 862–873.

Lebrun, J.P. (1998) Catalogue des plantes vasculaires de la Mauretanie et du Sahara occidental. Genève: Conservatoire et Jardin Bontaniques.

Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C. (2001) Chlorophylls and Carotenoids : Measurement and Characterization by UV-VIS. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, *F4.3.1-F4.*(Supplement 1), 1–8.

Liu, C., Liu, Y., Guo, K., Fan, D., Li, G., Zheng, Y., Yu, L., Yang, R. (2011) Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six woody plant species in karst habitats of southwestern China Changcheng. *Environmental and Experimental Botany,* **71**, 174-183.

Lloret, F., Médail, F., Brundu, G., Camarda, I., Moragues, E., Ritas, J., Lambdon, P., Hulme, P.E. (2005) Species attributes and invasion success by alien plants on Mediterranean islands. *Journal of Ecology*, **93**: 512-520.

Lonsdale, W.N. (1999) Global patterns of plant invasions and the concept of invasibility. *Ecology*, **80**, 1522-1536.

Magalhães, H.I.F., Ferreira, P.M.P., Moura, E.S., Torres, M.R., Alves, A.P.N.N., Pessoa, O.D.L., Costa-Lotufo, L.V., Moraes, M.O., Pessoa, C. (2010) *In vitro* and *in vivo* antiproliferative activity of *Calotropis procera* stem extracts. *Anais da Academia Brasileira de Ciência*, **82**, 407–416.

Marschner, H., Marschner, P. (2012) *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. Elsevier, London, UK: 672 pp.

Moore, B.Y.S., Stein, H. (1948) Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *The Journal of Biological Chemistry*, **176**, 367–388.

Nakano, Y., Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbato specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, **22**, 867–880.

Nelson, N. (1944) A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. *The Journal of Biological Chemistry*, **3**, 375–380.

Neto, M.C.L, Vasconcelos, C.F.B., Thijan, V.N., Caldas, G.F.R., Araújo, A.V., Costa-Silva, J.H., Amorim, E.L.C., Ferreira, F., Oliveira, A.F.M., Wanderley, A.G. (2013) Evaluation of antihyperglycaemic activity of *Calotropis procera* leaves extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **23**, 913-919.

Niinemets, Ü., Keenan, T. (2014) Photosynthetic responses to stress in Mediterranean evergreens: Mechanisms and models. *Environmental and Experimental Botany*, **103**, 24–41.

Noctor, G., Mhamdi, A., Foyer, C.H. (2014) The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. *Plant Physiology*, **164**, 1636–1648.

Oguchi, R., Hikosaka, K., Hirose, T., (2003) Does the photosynthetic light-acclimation need change in leaf anatomy? *Plant, Cell and Environment,* **26**, *505-512*.

Oliveira, R.H., Rosolem, C.A. Trigueiro, R.M. (2004) Importância do fluxo de massa e difusão no suprimento de potássio ao algodoeiro como variável de água e potássio no solo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, **28**, 439-445.

Oliveira, M., Matzek, V., Medeiros, C.D., Rivas, R., Falcão, H.M., Santos, M.G. (2014) Stress tolerance and ecophysiological ability of an invader and a native species in a seasonally dry tropical forest. *PloS one*, **9**, e105514.

Oliveira, S., Negreiros, D., Fernandes, G.W., Barbosa, N.P.U., Rocha, R., Almeida-Cortez, J.S. (2009) Seedling growth of the invader Calotropis procera in ironstone rupestrian field and seasonally dry forest soils. *Neotropical Biology and Conservation*, **4**, 69–76.

Palacio, S., Maestro, M., Montserrat-Martí, G. (2007) Seasonal dynamics of non-structural carbohydrates in two species of mediterranean sub-shrubs with different leaf phenology. *Environmental and Experimental Botany*, **59**, 34-42.

Parsons, W.T., Cuthbertson, E.G. (2001) *Noxious weeds of Australia*. CSIRO Publishing, Melbourne: 712 pp.

Pervez, H., Ashraf, M., Makhdum, M.I. (2004) Influence of potassium nutrition on gas exchange characteristics and water relations in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Photosynthetica*, **42**, 251–255.

Rahman, M.A., Wilcock, C.C.A. (1991) Taxonomic revision of *Calotropis procera* (*Asclepiadaceae*). *Nordic Journal of Botany*, **11**, 301-308.

Ramel, F., Sulmon, C., Gouesbet, G., Couee, I. (2009). Natural variation reveals relationships between pre-stress carbohydrate nutritional status and subsequent responses to xenobiotic and oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany*, **104**, 1323–1337.

Ramel, F., Birtic, S., Ginies, C., Soubigou-Taconnat, L., Triantaphylidès, C., Havaux, M. (2012) Carotenoid Oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, 5535–5540.

Reichard, S.H., Hamilton, C.W. (1997) Predicting invasions of woody plants introduced into North America. *Conservation Biology*, **11**, 193-203.

Ribeiro, R.V., Machado, E.C., Santos, M.G., Oliveira, R.F. (2009). Photosynthesis and water relations of well-watered orange plants as affected by winter and summer conditions. *Photosynthetica*, **47**, 215-222.

Rivas, R., Oliveira, M.T., Santos, M.G. (2013) Three cycles of water deficit from seed to young plants of *Moringa oleifera* woody species improves stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, **63**, 200–208.

Rolim, G.S., Sentelhas, P.C., Barbieri, V. (1998) Planilhas no ambiente EXCEL ™ para os cálculos de balanços hídricos: normal, sequencial, de cultura e de produtividade real e potencial. *Revista Brasileira de Agrometeorologia*, 6, 133-137.

Rudolph, A.S., Crowe, J.H., Crowe, L.M. (1986) Effects of three stabilizing agents—proline, betaine and trehalose—on membrane phospholipids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **245**, 134-143.

Schulten, J.R., Cole, T.C., Cordell, S., Publico, K.M., Ostertag R., Enoka, J.E., Michaud, J.D. (2014) Persistence of Native Trees in an Invaded Hawaiian Lowland Wet Forest: Experimental Evaluation of Light and Water Constraints. *Pacific Science*, **68**, 267–285.

Silva F.C. (1999) Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Embrapa Informacão Tecnológica, Brasília.

Silva, E.N., Ferreira-Silva, S.L., Viégas, R.A., Silveira, J.A.G. (2010) The role of organic and inorganic solutes in the osmotic adjustment of drought-stressed *Jatropha curcas* plants. *Environmental and Experimental Botany*, **69**, 279–285.

Singh, S.K., Badgujar, Reddy, G.V.R., Fleisher, D.H., Bunce, J.A. (2013) Carbon dioxide diffusion across stomata and mesophyll and photo-biochemical processes as affected by growth CO_2 and phosphorus nutrition in cotton. *Journal of Plant Physiology*, **170**, 801-8013.

Smirnoff, N., Cumbes, Q.J. (1989) Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, **28**, 1057-1060.

Sobrinho, M., Tabatinga, G. Machado, I.C., Lopes, A.V. (2013) Reproductive phenological pattern of *Calotropis procera* (Apocynaceae), an invasive species in Brazil: annual in native areas; continuous in invaded areas of. *Acta Botanica Brasilica,* **27**, 456–459.

Somogyi, M. (1951). Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry*, **195**, 19–23.

Souto, P. C.; Sales, F. C. V.; Souto, J. S.; Santos, R. V.; Sousa, A. A. (2008) Biometria de frutos e número de sementes de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. no semi-árido da Paraíba. *Revista Verde,* **3**, 108-113.

Strittmatter, C.G.D. (1973) Nueva técnica de diafanización. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botânica*, **15**, 126-129.

Tezara, W., Colombo, R., Coronel, I., Marín, O. (2011) Water relations and photosynthetic capacity of two species of *Calotropis* in a tropical semi-arid ecosystem. *Annals of Botany*, **107**, 397–405.

Thomas R.L., Sheard R.W., Moyer J.R. (1967) Comparison of conventional and automated procedure for nitrogen, phosphorus and potassium analysis of plant material using single digest. *Agronomy Journal,* **59**, 240–243.

Thornthwaite, C.W., Mather, J.R. **The water balance**. Publications in Climatology. New Jersey: Drexel Institute of Technology, 104p. 1955.

Tipple, B.J., Berke, M.A., Hambach, B., Roden, J.S., Ehleringer, J.R. (2015) Predicting leaf was *n* -alkane $^{2}H/^{1}H$ ratios: controlled water source and humidity experiments with hydroponically grown trees confirm predictions of Craig-Gordon model. *Plant, Cell and Environment*, **38**, 1035-1047.

Van den Ende, W., El-Esawe, S.K. (2014) Sucrose signaling pathways leading to fructan and anthocyanin accumulation: A dual function in abiotic and biotic stress responses? *Environmental and Experimental Botany*, **108**, 4–13.

Wang, X., Zhao, X., Jiang, C., Li, C., Cong, S., Wu, D., Chen, Y., Yu H., Wang, C. (2015) Effects of potassium deficiency on photosynthesis and photoprotection mechanisms in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Journal of Integrative Agriculture*, **14**, 856–863.

Walter, J., Nagy, L., Hein, R., Rascher, U., Beierkuhnlein, C., Willner, E., Jentsch, A. (2011) Do plants remember drought? Hints towards a drought-memory in grasses. *Environmental and Experimental Botany*, **71**, 34–40.

Warren, C.R. (2011). How does P affect photosynthesis and metabolite profiles of *Eucalyptus globulus*? *Tree Physiology*, **31**, 727–739.

Tabela

Tabela 1. Atributos anatômicos de *Calotropis procera* nas estações chuva e seca de 2013 no ambiente semiárido e litorâneo no Nordeste brasileiro. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de *Student Newman Keuls* ($p<0,05$).

Atributo	Semiárido				Litoral			
	Seca		Chuva		Seca		Chuva	
	Adaxial	Abaxial	Adaxial	Abaxial	Adaxial	Abaxial	Adaxial	Abaxial
Densidade estomática (0,02mm^2)	12,65^{A}	10,15^{B}	11,65^{A}	12,45^{A}	11,05^{NS}	11,20	10,40	11,30
Índice estomático (%)	9,93^{NS}	8,77	7,36	7,33	10,36^{NS}	8,33	8,24	9,14
Densidade de tricoma (0,02mm^2)	12,30^{B}	10,60^{B}	12,05^{B}	17,95^{A}	8,75^{B}	14,00^{A}	5,75^{D}	8,25^{C}
Índice de tricoma (%)	9,73^{NS}	9,37	7,49	9,96	8,13^{A}	10,09^{A}	4,69^{B}	6,31^{B}
Densidade célula epidérmica (0,02mm^2)	137,75^{BC}	125,05^{C}	146,05^{AB}	158,75^{A}	115,70^{NS}	123,20	116,15	113,85
Cutícula (µm)	3,16^{B}	3,08^{B}	3,30^{A}	3,62^{A}	3,95^{A}	3,38^{B}	2,97^{C}	2,92^{C}
Espessura da epiderme (µm)	13,11^{AB}	12,47^{BC}	14,00^{A}	11,89^{C}	13,71^{A}	10,36^{B}	14,85^{A}	10,44^{B}
Espessura parênquima paliçádico (µm)	142,48^{A}		105,72^{B}		113,39^{B}		140,45^{A}	
Espessura parênquima lacunoso (µm)	323,48^{A}		246,23^{B}		286,84^{NS}		301,06^{NS}	
Espessura total do mesofilo (µm)	465,97^{A}		351,95^{B}		400,23^{B}		441,50^{A}	
Espessura da folha (µm)	491,67^{A}		391,33^{B}		458,15^{B}		486,44^{A}	

FIGURAS

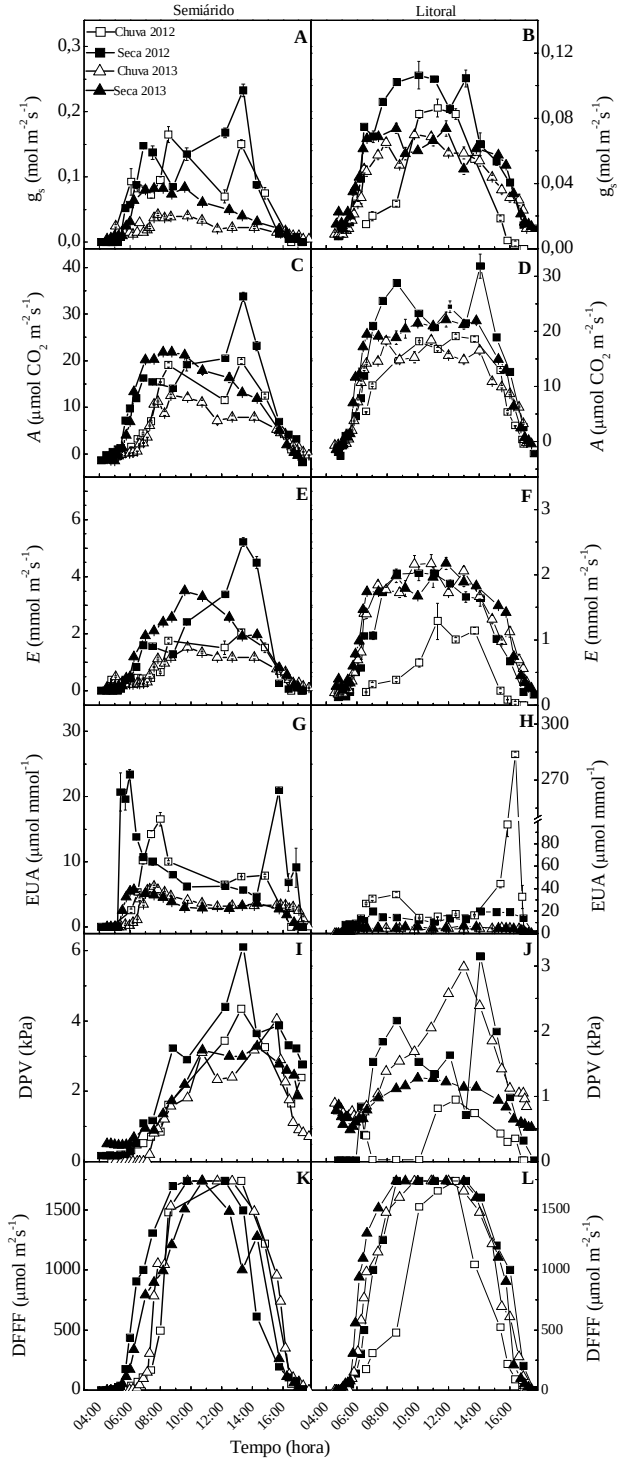

Fig. 1 Curva diária em plantas de *Calotropis procera* nas estações chuva e seca de 2012 e 2013 no ambiente semiárido e litorâneo no Nordeste brasileiro. (A, B) Condutância estomática (g_s), (C, D) assimilação líquida de CO_2 (*A*), (E, F) transpiração (*E*), (G, H) eficiência do uso da água (EUA), (I, J) déficit de pressão de vapor (DPV) e (K, L) densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF) (n=4±E.P).

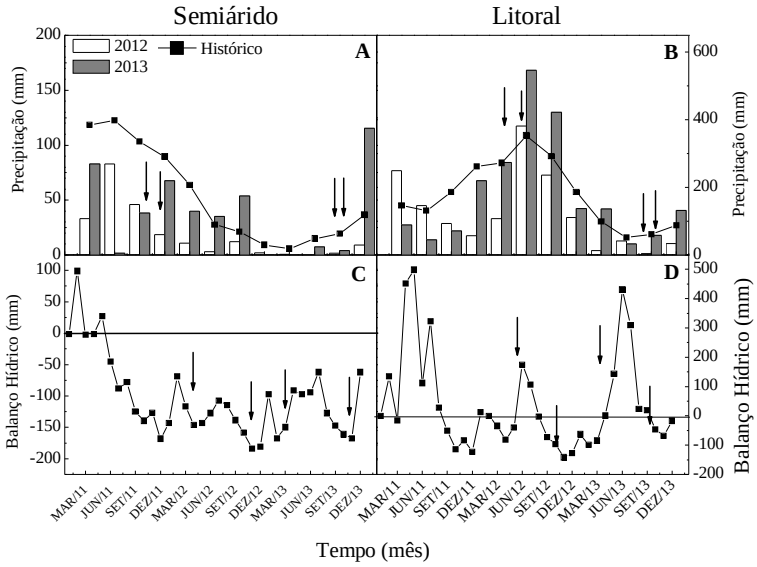

Fig. 2 Precipitação acumulada mensal e média histórica dos últimos 12 anos (2004 - 2015 no semiárido (A) e litoral (B); balanço hídrico no semiárido (C) e litoral (D). Seta indica os meses de medidas e coletas.

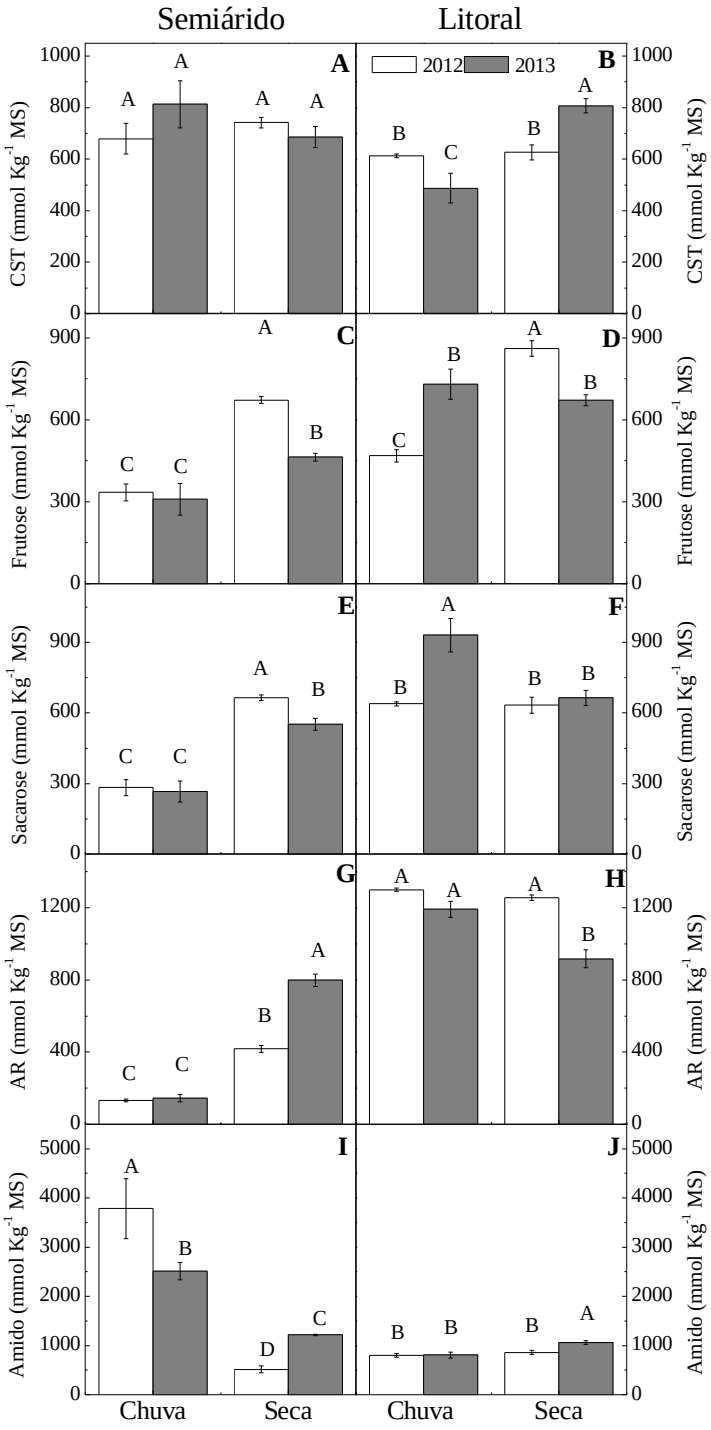

Fig. 3 (A,B) Carboidratos solúveis totais (CST), (C,D) frutose, (E,F) sacarose, (G,H) açúcares redutores (AR) e (I,J) amido) em plantas adultas de *Calotropis procera* sob condições de semiárido e litoral no Nordeste brasileiro, nas estações chuvosa e seca de 2012 e 2013 (n=4±E.P). Valores seguidos por letras diferentes diferem entre si pelo teste de *Student Newman Keuls* ($p<0,05$).

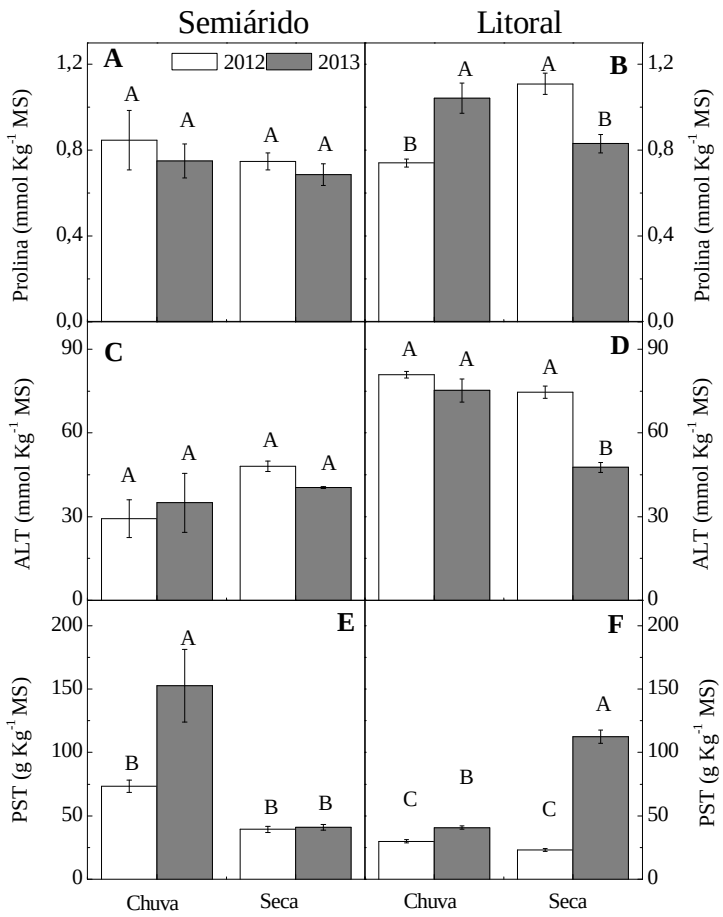

Fig. 4 (A,B) prolina, (C,D) aminoácidos livres totais (ALT), (E,F) proteínas solúveis totais (PST) em plantas adultas de *Calotropis procera* sob condições de semiárido e litoral no Nordeste brasileiro, nas estações chuvosa e seca de 2012 e 2013 (n=4±E.P). Valores seguidos por letras diferentes diferem entre si pelo teste de *Student Newman Keuls* ($p<0,05$).

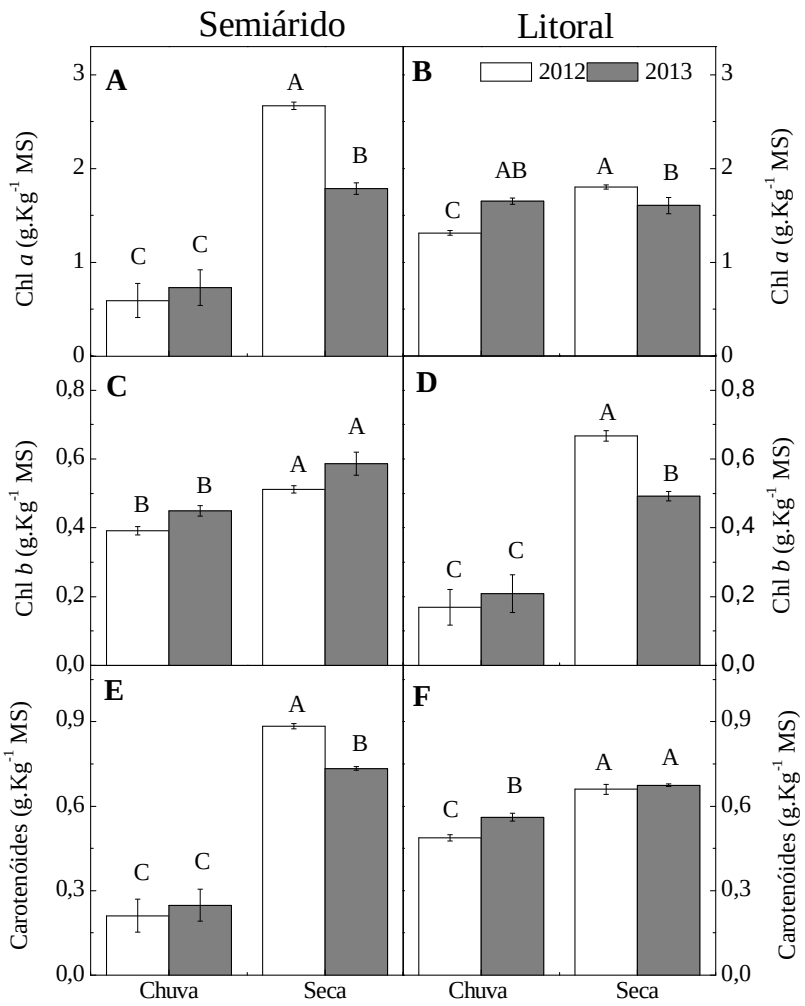

Fig. 5 (A,B) Clorofila *a* (Chl *a*), (C,D) Clorofila *b* (Chl *b*) e (E,F) carotenóides em plantas adultas de *Calotropis procera* sob condições de semiárido e litoral no nordeste brasileiro, nas estações chuvosa e seca de 2012 e 2013 (n=4±E.P). Valores seguidos por letras diferentes diferem entre si pelo teste de *Student Newman Keuls* ($p<0,05$).

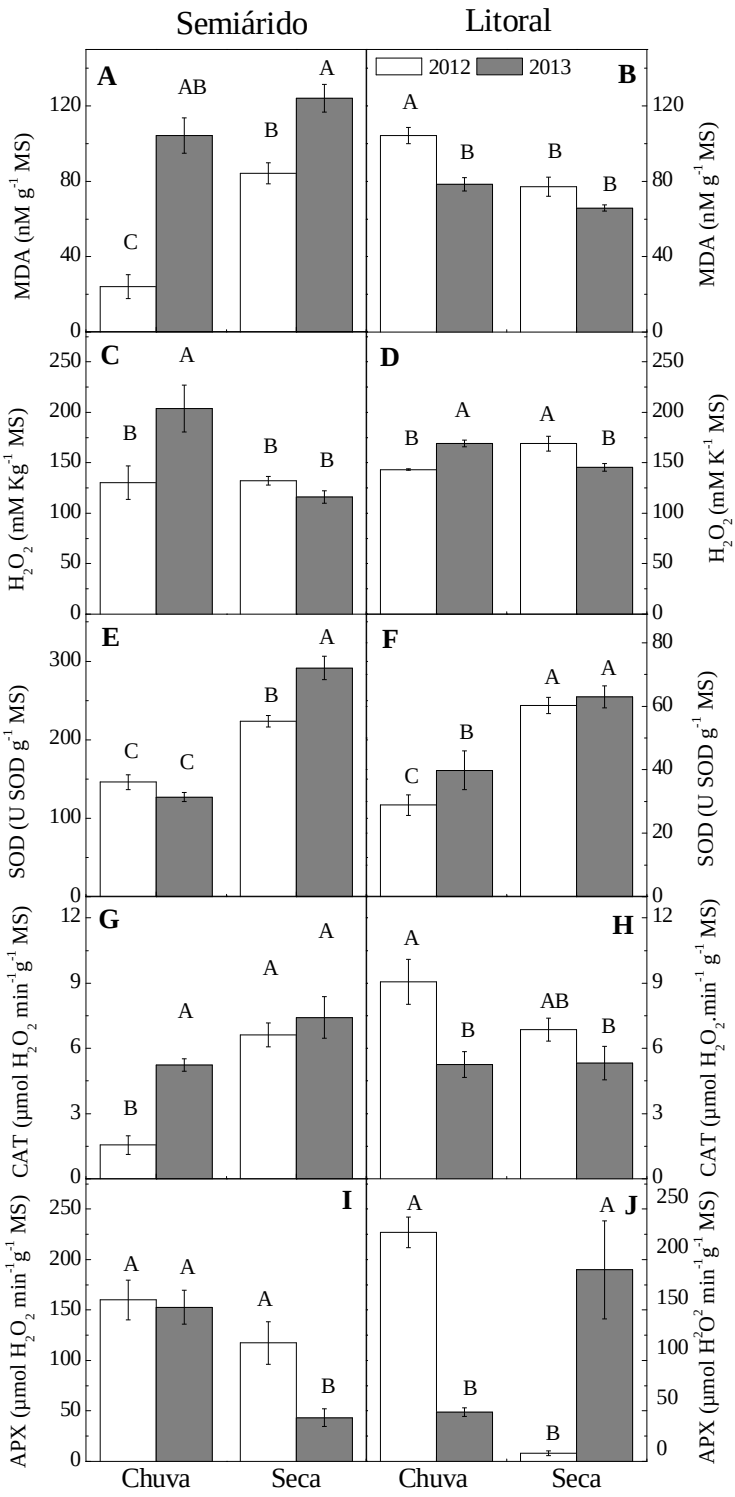

Fig. 6 (A,B) Aldeído malônico (MDA), (C,D) peróxido de hidrogênio (H_2O_2), (E,F) superóxido dismutase (SOD), (G,H) catalase (CAT) e (I,J) ascorbato peroxidase (APX) e em plantas adultas de *Calotropis procera* sob condições de semiárido e litoral no Nordeste brasileiro, nas estações chuvosa e seca de 2012 e 2013 (n=4±E.P). Valores seguidos por letras diferentes diferem entre si pelo teste de *Student Newman Keuls* ($p<0,05$).

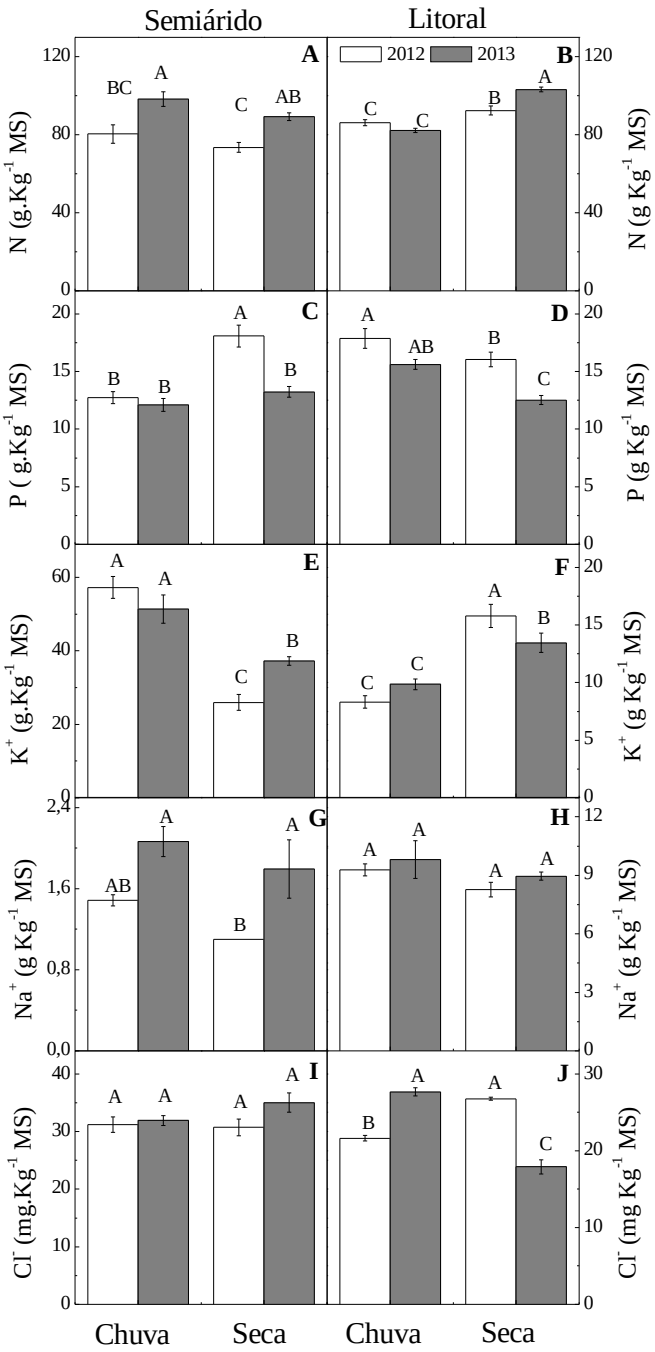

Fig. 7 (A,B) Nitrogênio (N), (C,D) fósforo (P), (E,F) potássio (K), (G,H) sódio (Na), (IJ) cloro (Cl) em plantas adultas de *Calotropis procera* sob condições de semiárido e litoral no Nordeste brasileiro, nas estações chuvosa e seca de 2012 e 2013 (n=4±E.P). Valores seguidos por letras diferentes diferem entre si pelo teste de *Student Newman Keuls* ($p<0,05$).

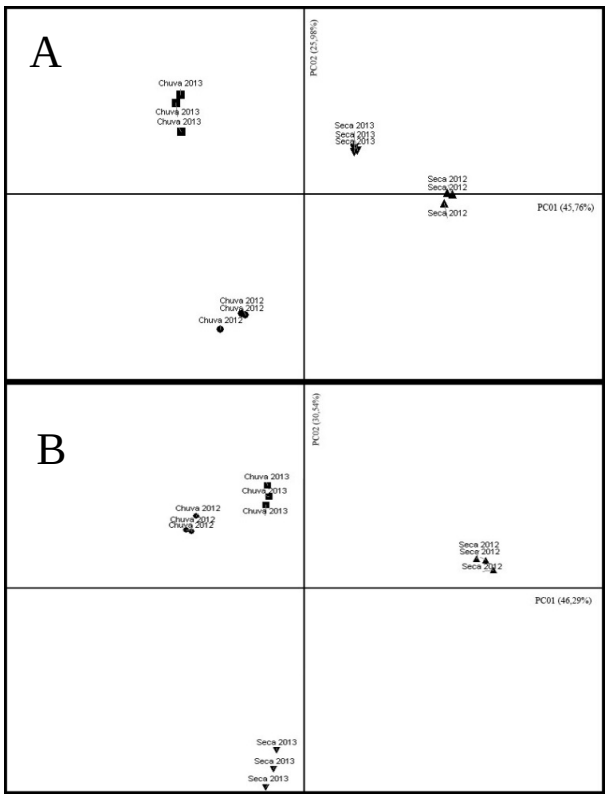

Fig. 8 Análise multivariada de componente principal (PCA) com os dados de potencial osmótico, trocas gasosas (Fig. 1), bioquímica do metabolismo primário (Fig. 3 e 4) pigmentos fotossintéticos (Fig. 5), estresse oxidativo (Fig. 6) e nutrientes (Fig. 7) de *Calotropis procera* sob condições de semiárido (A) e litoral (B) no Nordeste brasileiro, nas estações chuvosa e seca de 2012 e 2013 (n=3).

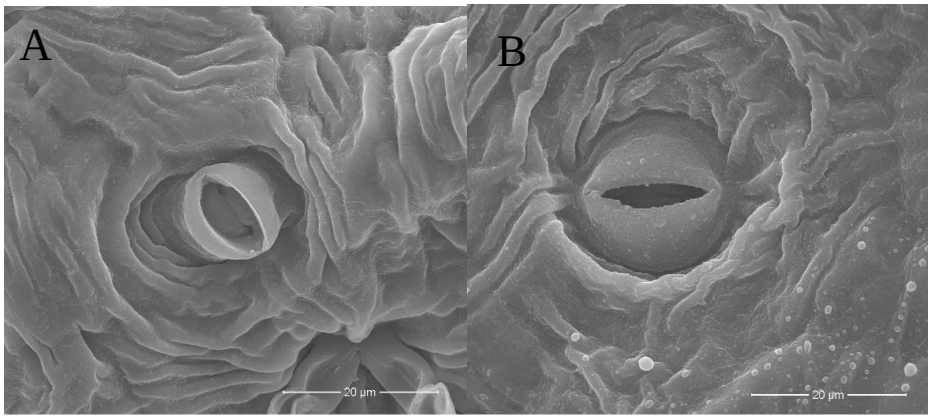

Fig. 9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) na face abaxial de *Calotropis procera* proveniente da seca de 2013 sob condições de semiárido (A) e litoral (B) no Nordeste brasileiro.

5. MANUSCRITO II - Condutância mesofílica e mecanismos fotoprotetores suportam a performance fotossintética sob déficit hídrico e reidratação de *Calotropis procera* uma C_3 nativa de região desértica

A ser submetido ao periódico Environmental and Experimental Botany. As normas da revista através do website: http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/267?generatepdf=true (Anexo II)

Condutância mesofílica e mecanismos fotoprotetores suportam a performance fotossintética sob déficit hídrico e reidratação de *Calotropis procera* uma C_3 nativa de região desértica

Rebeca Rivas[a], Gabriella Frosi[a], Silvia Pereira[a], Diego Gomes Ramos[a], Ana Maria Benko-Iseppon[b], Mauro Guida Santos[a*]

[a]Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Laboratório de Ecofisiologia Vegetal, Av. Prof. Moraes Rego. s/n, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brasil.

[b]Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética, Laboratório Genética e Biotecnologia Vegetal, Av. Prof. Moraes Rego. s/n, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brasil.

*Autor correspondente. Tel.: +55 81 2126 8844. Fax: +55 81 2126 7803 Endereço de email: mauro.gsantos@ufpe.br (M.G. Santos).

Resumo

Calotropis procera tem metabolismo fotossintético C_3 é um excelente modelo para se estudar tolerância do maquinário fotossintético à seca. Um experimento em casa de vegetação, com plantas jovens de *C. procera*, foi conduzido sob dois regimes hídricos, controle (irrigado) e seca (suspensão de rega). Foram avaliadas as trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, quantificação de solutos do metabolismo primário, atividade de enzimas do sistema antioxidativo, anatomia foliar e também foram realizadas curva A/C_i e curva diária de trocas gasosas. *Calotropis procera* alcançou o estresse máximo após 10 dias de suspensão de rega, com redução da condutância estomática (g_s), assimilação de CO_2 (*A*), *quenching* fotoquímico (qP), taxa de transporte de elétrons (ETR), rendimento quântico do PSII (Fq/Fm'); e com o aumento da eficiência do uso da água (EUA), *quenching* não-fotoquímico (NPQ), fotorrespiração, carboidratos solúveis totais (CST), aminoácidos livres totais (ALT), prolina, carotenóides, bem como na atividade da superóxido dismutase (SOD), aumento na espessura da cutícula e na densidade de tricomas. Após 48h de reidratação, *C. procera* apresentou recuperação nas taxas de trocas gasosas e atividade fotoquímica que foi garantida pelo aumento da condutância mesofílica (g_m), redução na fotorrespiração, aumento do CST, ALT, proteína solúveis totais (PST), prolina, dos pigmentos fotossintéticos, SOD e ascorbato peroxidase (APX). Nossos resultados, mostraram que sob um CHR de 50% *C. procera* consegue aumentar os mecanismos de proteção do maquinário fotossintético e manter próximo ao controle os parâmetros diretamente relacionados a assimilação de CO_2 foliar.

Palavras-chave: curva A/C_i, seca, fotorrespiração, estresse oxidativo, fotoproteção

1. Introdução

O déficit hídrico é considerado um dos fatores abióticos mais limitante para o crescimento, desenvolvimento e produtividade das plantas, particularmente nas regiões tropicais (Zhu et al., 2012, Donohue et al., 2013). Se as previsões de mudanças climáticas globais se confirmarem, a irregularidade pluviométrica e longos períodos de seca serão mais comuns (IPCC, 2013).

A restrição hídrica leva a planta ao fechamento estomático através da sinalização enviada da raiz à parte aérea, levando a redução nas trocas gasosas devido ao aumento na resistência do CO_2 causada pelo aumento da limitação estomática e mesofílica (Lawlor e Cornic 2002; Santos et al., 2004; Flexas et al., 2007; Chaves et al. 2009). Sob deficiência hídrica progressiva, o grau de limitação da fotossíntese pela condutância estomática é reduzido gradativamente, entretanto, a limitação não estomática aumenta, entre esses fatores está a condutância mesofílica que pode responder à restrição hídrica e subsequente reidratação com velocidades diferenciadas comparativamente a condutância estomática (Flexas et al., 2009; Galle et al., 2009; Hu et al., 2010; Warren et al., 2011). A aclimatação da condutância mesofílica durante uma seca prolongada e reidratação representa um caminho efetivo para otimizar a difusão do CO_2 diante de uma oferta limitada, aumentando a atividade fotossintética e eficiência do uso da água durante e após o estresse (Flexas et al., 2012).

Respostas fotoquímica e bioquímica da fotossíntese são também alteradas em condição de déficit hídrico, no qual geralmente há uma redução do *quenching* fotoquímico e aumento do *quenching* não fotoquímico (Baker, 2008).

O maquinário fotossintético de plantas C_3 pode ser melhor avaliado, através da curva da fotossíntese em função da concentração interna de CO_2 (A/C_i). A curva A/C_i fornece dados *in vivo* sobre a limitação da carboxilação da Rubisco principalmente em

duas fases através (1) cinética da Rubisco, quando a concentração de CO_2 é baixa e (2) com relação a taxa máxima de transporte de elétrons usada na regeneração da RuBP, quando a concentração de CO_2 é elevada (Long e Bernacchi 2003; Sharkey et al., 2007).

Plantas de metabolismo fotossintético C_3 podem ser limitadas pela baixa disponibilidade de CO_2, pouco toleram temperaturas elevadas (Yin e Struik, 2009) e apresentam alta fotorrespiração em relação a taxa fotossintética, principalmente sob restrição hídrica (Ehleringer et al. 1991). A fotorrespiração é um parâmetro importante, pois funciona como um dreno forte de elétrons, proporcionando fotoproteção ao aparato fotossintético (Lawlor e Cornic 2002, Voss et al., 2013). Devido a essa limitação, essas plantas geralmente apresentam maiores condutâncias estomáticas para a captação do CO_2, e consequentemente, maiores taxas transpiratórias e uma menor eficiência do uso da água. Entretanto, *Calotropis procera*, uma espécie sempre verde originária da África e Ásia em regiões desérticas de metabolismo fotossintético C_3 (Sayed e Mohamed, 2000), apresenta picos de floração e frutificação na estação seca, como observado por Sobrinho et al. (2013) no semiárido, o que exige muito do metabolismo de carbono. Estudos realizados por Frosi et al. (2013) também no semiárido mostrou um comportamento inverso ao característico para esse tipo de metabolismo, no qual as plantas de *C. procera* apresentaram uma baixa condutância estomática, com taxas elevadas de assimilação, sendo superior na estação seca.

Calotropis procera é um bom modelo para identificar quais atributos fisiológicos permitem a alta performance do metabolismo fotossintético em ambientes com severa restrição hídrica. Nossa hipótese é que a habilidade do metabolismo fotossintético de *C. procera* sob restrição hídrica é devido a eficiência da condutância mesofílica em se manter ou até mesmo se tornar maior em relação as plantas bem hidratadas. Para isso, o estudo teve como objetivos (i) avaliar a performance fotossintética, (ii) avaliar o

metabolismo bioquímico primário e sistema antioxidativo, (iii) identificar possíveis alterações na anatomia foliar de plantas jovens de *C. procera* sob deficiência hídrica controlada em potes.

2. Metodologia

2.1 Material vegetal e condições de crescimento

Sementes de *Calotropis procera* (Aiton) W.T. Aiton (Apocynaceae) foram coletadas no município de Serra Talhada, Pernambuco, Brasil (7°57'8.37"S, 38°17'54.07"O). O clima é do tipo BSh, segundo classificação de Köppen (Alvares et al., 2013), com precipitação anual de aproximadamente 700 mm concentradas entre janeiro a maio. Após a germinação, as plântulas foram transferidas para potes contendo 10 kg de solo franco arenoso proveniente da área onde foram coletadas as sementes e mantidas hidratadas em casa de vegetação.

Após três meses, foram diferenciados dois tratamentos: controle (irrigado diariamente com 100% capacidade do pote, 400mL) e seca (suspensão de rega). O estresse máximo foi determinado quando a condutância estomática atingiu valor igual a zero (10º dia após a suspensão de rega). Em seguida as plantas foram reidratadas por cinco dias consecutivos.

2.2 Conteúdo hídrico relativo foliar (CHR), *Status* hídrico do solo e Potencial osmótico foliar (Ψ_s)

Foram realizadas medidas de conteúdo hídrico relativo (CHR) foliar seguindo metodologia proposta por Barrs e Weatherley (1962). As medidas da umidade do solo (US) foram realizadas através do Medidor Falker HFM 2030 (v/v) os valores foram transformados para dados gravimétricos através Ug = Uv x 100 / Ds, onde Ug (%) é a umidade gravimétrica, Uv (%) é a umidade volumétrica, Ds é a densidade do solo

(g/cm^3). Para a determinação do potencial osmótico (Ψ_s) 500 mg folha mantida congelada foi macerada e em seguida centrifugada por 10 min à 10.000g à 4^oC o sobrenadante foi usado para medir a osmolaridade (c) (Silva et al. 2010) em osmômetro. O potencial osmótico foi determinado usando a fórmula: $\Psi s\ (MPa) = -c$ x 2,58 x 10^{-3}.

2.3 Trocas gasosas e Fluorescência da clorofila *a*

Os valores para as trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* foram obtidas com um analisador de gás por infravermelho (IRGA, LI-COR, modelo LI-6400XT, Lincoln, NE, EUA) com uma câmara de fluorescência (6400-40) acoplada com uma área de 2 cm^2 e um fluxo de gás de 400 $mmol.s^{-1}$. Para avaliar a variável fluorescência da clorofila *a*, as folhas foram adaptadas ao escuro durante 30 minutos para determinar a fluorescência mínima da clorofila (Fo). Em seguida a fluorescência máxima da clorofila (Fm) foi obtida por um pulso de saturação a ~ 7800 $mmol.m^{-2}.s^{-1}$. A emissão de fluorescência a um estado de equilíbrio (Ft) e a emissão máxima de fluorescência (Fm') foram determinados para folhas adaptadas a luz submetidas a fotossíntese estável. As medidas foram realizadas entre 8:00 e 9:00, em folha completamente expandida com densidade de fluxo de fótons fotossintético (DFFF) de 900 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$. Foram obtidos valores de assimilação líquida de CO_2 (*A*), condutância estomática (g_s), eficiência do uso da água foi calculada pela razão da assimilação líquida de CO_2 e taxa de transpiração (*E*) (EUA=*A*/*E*). Por meio da fluorescência da clorofila *a* foi calculado segundo Baker (2008) a eficiência quântica máxima do PSII (Fv/Fm), eficiência máxima do PSII (Fv'/Fm'), rendimento quântico do PSII (Fq/Fm'), *quenching* fotoquímico (qP), *quenching* não fotoquímico (NPQ), excesso de energia relativa ao nível do PSII [EXC= (Fv/Fm) – (Fq/Fm')/(Fv/Fm)] e taxa de transporte de elétrons [ETR= (ΔF − Fm'× DFFF × 0,5 × 0,84)]. Para calcular a ETR, 0,5 foi usado como a

fração de energia de excitação distribuído para PSII e 0,84 foi usado como a fração de luz incidente absorvida pelas folhas. O déficit de pressão de vapor (DPV) foi calculado às 8:00, 14:00 e 17:00 em todos os dias de medida (Fig. 1 D) de acordo com Campbell e Norman (1998).

Após nove dias de suspensão de rega, foi realizada uma curva diária de trocas gasosas dentro da casa de vegetação em ambos os tratamentos. A curva foi realizada desde às 5:10 até às 17:10 resultando em 14 pontos de medidas. Para cada medida o DFFF foi ajustado de acordo com o DFFF incidente.

2.4. Curva A/C_i

A resposta de *A* a uma concentração crescente de CO_2 intercelular (C_i), realizadas de acordo com (Sharkey et al., 2007), foram realizadas nas mesmas folhas que foram avaliados para a troca gasosas e fluorescência fluorescência da clorofila *a*. Os valores de C_i foram obtidos a partir de mudanças na pressão parcial de CO_2 externo (Ca) fornecidas em 16 etapas, decréscimos de 400 a 125 $\mu mol.mol^{-1}$, e posteriormente o incremento de 400 a 1500 $\mu mol.mol^{-1}$, com o DFFF mantido constante a 800 $\mu mol.m^2.s^{-1}$, 25 ± 1°C de temperatura e 1 ± 0,1 kPa de DPV. Foram calculados, segundo Long e Bernacchi (2003), a velocidade máxima de carboxilação ($V_{c,max}$), velocidade máxima de oxigenação ($V_{o,max}$) a taxa máxima de transporte de elétrons (J_{max}), respiração mitocondrial do dia (R_d), assimilação máxima (A_{max}), condutância mesofilica (g_m), concentração de CO_2 no cloroplasto (C_c). Fluxo de elétrons usado para a carboxilação da RuBP (Jc), fluxo de elétrons usado para a oxigenação da RuBP (Jo) e fotorrespiração (Pr), foram estimadas de acordo com as seguintes fórmulas (Valentini et al., 1995; Bagard et al., 2008):

$Jc = 1/3[ETR + 8(A + R_d)]$

$Jo = 2/3[ETR - 4(A + R_d)]$

$Pr = 1/12[ETR - 4(A + R_d)]$

A limitação estomática (LE) de *A* foi estimada considerando a relação entre a taxa fotossintética real (*A*') a 400 $mol.mol^{-1}$ de C_a e a taxa fotossintética hipotética (*A*") obtido quando $C_i = C_a$: LE = (*A*"-*A*') / *A*". Além disso, a limitação não-estomática (LNE = 1-LE) também foi calculada (Long e Bernacchi, 2003). As medidas da curva A/C_i foram realizadas em três plantas por tratamento e em dois momentos: após 7 dias da suspensão de rega; e após 4 dias da reidratação (14º dia de experimento).

2.3. Bioquímica e Estresse oxidativo

Foram coletadas folhas para a análise bioquímica no dia do estresse máximo (10º dia) e no último dia de reidratação (15º dia). Folhas maduras e sadias foram coletas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -20°C. Foram quantificados os Carboidratos solúveis totais (CST) (Dubois et al., 1956), aminoácidos livres totais (ALT) (Moore e Stein, 1948), proteínas solúveis totais (PST) (Bradford, 1976) prolina (Bates et al., 1973), sacarose (Handel, 1968), frutose (Foreman et al., 1973), açúcares redutores (Nelson, 1944; Somogyi, 1951), clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*), carotenóides (Lichtenthaler e Buschmann, 2001), aldeído malônico (MDA) (Cakmak e Horst, 1991) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Alexieva et al., 2001). A fração insolúvel da extração dos CST foi usado para determinar a quantificação do amido. O sedimento foi hidrolisado durante 1 hora com 10 unidades de amiloglucosidase, e os açúcares resultantes foram quantificados segundo metodologia proposta por Dubois et al. (1956).

Todas as quantificações foram determinadas com espectrofotômetro (Thermo Scientific/Modelo Genesys 10S UVVIS) de duplo feixe ajustado ao comprimento de onda específico para cada composto orgânico. Também foram avaliadas as atividades

das enzimas do sistema antioxidativo como Superóxido Dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1), a Catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6), e o Ascorbato Peroxidase (APX, E.C.1.11.1.11), seguindo as metodologias propostas por Giannopolitis e Ries (1977), Havir e McHale (1987) e Nakano e Asada (1981).

2.4. Análise anatômica

Para a análise anatômica foram coletadas folhas maduras de ambos os tratamentos no dia do estresse máximo (10º dia) para medidas de microscopia óptica. As folhas foram fixadas em FAA_{50} (formaldeído, ácido acético e etanol 1:1:18, respectivamente) por 48 horas e em seguida preservadas em etanol 70% (Johansen 1940). Foram feitos cortes transversais de 10 μm de espessura realizados no micrótomo rotativo Zeiss modelo HYRAX M55, posteriormente fixados nas lâminas com auxílio do banho maria. Os cortes obtidos foram desparafinizados e corados em dupla coloração composta por azul de Alcian e safranina (Bukatsch, 1972) e montados em lâminas permanentes com bálsamo do Canadá.

Para a caracterização anatômica geral da folha de *C. procera*, foram realizadas medidas de espessura da epiderme e da cutícula em 20 campos microscópicos escolhidos aleatoriamente com ampliação de 40 ×. A espessura da folha, do mesofilo e dos parênquimas paliçádico e lacunoso foi medida em 20 campos aleatoriamente utilizando ampliação de 10×.

A dissociação foi realizada pelo método descrito por Strittmatter (1973). Essas amostras foram então coradas com safranina e montadas em lâminas semi-permanentes com glicerina 50% (Kraus et al. 1998). A densidade de estômatos, densidade de células epidérmicas e densidade de tricomas foram determinadas em 20 campos microscópicos escolhidos aleatoriamente usando uma ampliação de 40×. O índice estomático foi

estimada como (número de estômatos / (número de estômatos + número de células epidérmicas)) × 100 por unidade de área (Salisbury 1928).

As estruturas foram registradas utilizando um sistema de imagens digitais da Leica (LAS EZ Versão 2.0.0 ICC 50) que foi acoplado a um fotomicroscópio Leica (modelo DM500), e as imagens foram analisadas utilizando o software ImageJ Versão 1.47r.

2.5. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos ao test T, com significância ao nível de 5% de probabilidade. Para os parâmetros anatômicos espessura da epiderme e cutícula; densidade de tricomas, estômatos e células epidérmicas; índice de tricomas e estômatos foram submetidos à ANOVA fatorial, e quando necessário, as médias foram comparadas pelo teste *Student Newman Keuls* com significância ao nível de 5% de probabilidade. Utilizando o *software* Statistica 8.0 (StatSoft. Inc., Tulsa, OK 74104, USA).

3. Resultados

3.1. *Status* hídrico

No máximo estresse (10º dia) foi observado redução ($p<0,05$) de aproximadamente 45% e 76% para CHR e US, respectivamente (Fig. 1A-B). O potencial osmótico mostrou uma redução de 78% no tratamento de seca ($p<0,05$) (Tabela 1), com recuperação após a reidratação (15º dia) não diferindo do tratamento controle ($p>0,05$).

3.2. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*

A partir do 4º dia de suspensão de rega, foi observado uma redução ($p<0,05$) de aproximadamente 40% na g_s (Fig. 2A) nas plantas sob seca quando comparado ao

controle. Porém só foi observado redução ($p<0,05$) de aproximadamente 25% na *A* no 6º dia após a suspensão de rega (Fig. 2B). O 10º dia foi considerado o máximo estresse devido a g_s ter atingido valor próximo a zero com redução de 95% para g_s e *A* (Fig. 2 A,B). A EUA foi maior ($p<0,05$) 12% e 47% no 4º e 6º dia, respectivamente, após a suspensão de rega em relação ao controle (Fig. 2 C). Dois dias após a reidratação as plantas sob déficit hídrico recuperaram seus valores de g_s, *A*, EUA (Fig. 2 A-C).

Assim como as trocas gasosas, os parâmetros qP, ETR, e Fq/Fm' apresentaram redução desde o 6º dia após a suspensão de rega, porém no máximo estresse apresentou redução de 40%, 50% e 60% para qP, ETR e Fq/Fm', respectivamente (Fig. 3 C,D,F). No dia do máximo estresse, observou-se redução de 16% na Fv'/Fm', contudo durante todo o experimento ambos os tratamentos apresentaram valores de Fv/Fm maiores que 0,80 (Fig. 3 A,B). Entretanto, no máximo estresse foi observado aumento ($p<0,05$) de 67%, 1270% e 18% para o NPQ, ETR/A e EXC, respectivamente (Fig. 3 C,G,H). Dois dias após a reidratação os valores de qP, ETR, Fq/Fm', Fv'/Fm' e ETR/A foram recuperados, já para o Fv/Fm, NPQ e ERT/*A* foi necessário apenas 24h para igualar seu valor ao controle ($p>0,05$).

No 9º dia após a suspensão de rega, *C. procera* mostrou alteração nas suas trocas gasosas em resposta a mudança de luz e DPV ao longo do dia. No início da manhã (05:00 – 06:00 h) e ao pôr do sol (17:00 h) quando o DFFF era menor que 40 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, não foi observado diferença ($p>0,05$) em relação ao controle para *A* e g_s (Fig. 4 A-B). Porém, entre às 07:00 – 16:30 h os valores de *A* e g_s foram menores nas plantas sob seca em relação as controles (Fig. 4 A-B). O pico de DPV e DFFF foi registrado entre 10:00 às 12:00 h (Fig. 4 D), quando *C. procera* apresentou os maiores valores de *A*. Nesse mesmo período, *A* e g_s apresentaram redução de 80% e 90% nas plantas sob

déficit hídrico, e a EUA foi aumentada em aproximadamente 30% nas plantas sob seca em relação as controles (Fig. 4 A-C).

3.3. Curvas *A*/C_i

Com base nos dados fotossintéticos obtidos a partir da curva *A*/C_i, foi observado que mesmo sob seca, as plantas jovens de *C. procera* não apresentaram diferença significativa para $V_{c,max}$, $V_{o,max}$, J_{max}, C_c, g_m, Jc, Jc/Jo, Pr/*A*, ETR/*A*, LE e LNE. Além disso, houve aumento ($p<0,05$) de 35%, 55%, 44% e 44% para os parâmetros A_{max}, R_d, J_o e Pr, respectivamente nas plantas sob seca em relação ao controle após 7 dias de suspensão de rega (Tabela 2).

Quando comparado as plantas reidratadas com a controles foi observado que todos os parâmetros fotossintéticos avaliados apresentaram diferença significativa, com exceção do R_d (Tabela 2). O aumento foi observado nos parâmetros $V_{c,max}$ (23%), $V_{o,max}$ (23%), J_{max} (18%), A_{max} (25%), C_c (24%), g_m (37%), Jc (33%), Jc/Jo (67%) e LNE (33%) nas plantas reidratadas. E nos parâmetros Jo, Pr, Pr/*A*, ETR/*A*, LE e LNE foi observado redução em 45%, 45%, 61%, 23%, 57% e 33%, respectivamente nas plantas sob seca em relação ao controle após 7 dias de suspensão de rega (Tabela 2)

3.4. Bioquímica e Estresse Oxidativo

No máximo estresse foi observado redução ($p<0,05$) de 46% no amido e 20% nas PST (Fig. 5 G,F). Também foi observado aumento ($p<0,05$) de 33% nos CST, de 525% nos ALT e de 1500% na prolina nas plantas sob seca em relação ao controle (Fig. 5 A,B,D). Já nas plantas reidratadas foi observado aumento ($p>0,05$) de 37% nos CST, de 85% nos ALT, 145% na prolina e de 77% nas PST, em relação ao tratamento controle (Fig. 5 A,B,D,F). Ainda na reidratação foi observado redução ($p<0,05$) dos açúcares redutores em 48% quando comparadas ao controle (Fig. 5 H).

Para os pigmentos fotossintéticos, houve aumento ($p>0,05$) apenas dos carotenóides no estresse máximo (Fig. 6 C). Após a reidratação, todos os pigmentos apresentaram aumento de 40%, 40% e 27% para clorofila *a*, *b* e carotenóides, respectivamente (Fig. 6 A-C).

Na avaliação do estresse oxidativo, foi observado, no máximo estresse, aumento ($p<0,05$) de 160% e 115% da peroxidação lipídica da membrana plasmática (MDA) e na atividade da SOD, respectivamente (Fig. 7 C,E). Além disso, as plantas sob seca apresentaram redução ($p<0,05$) de 31% no H_2O_2 e de 53% na CAT em relação as plantas controle (Fig. 7 C,D). Na reidratação foi observado aumento da atividade enzimática em 260% e 438% para SOD e APX, respectivamente (Fig. 7 E,B). Entretanto, foi observado redução ($p<0,05$) em 42% no MDA, 36% no H_2O_2 e 66% na CAT (Fig. 7 A,C,D).

3.5. Análise anatômica

Não houve diferença ($p>0,05$) na espessura da folha, mesofilo, parênquima lacunoso e paliçádico do tratamento de seca em relação ao controle (Tabela 3). Para a espessura da epiderme houve aumento ($p<0,05$) na face adaxial em relação à face abaxial, independente do tratamento (Tabela 3). Com relação à cutícula houve aumento ($p<0,05$) na sua espessura no tratamento de seca em relação ao controle, porém não houve diferença ($p>0,05$) entre as faces adaxial e abaxial (Tabela 3).

Nas plantas sob seca apresentaram uma menor ($p<0,05$) densidade de células epidérmicas e densidade estomática na face abaxial do tratamento seca em relação à face abaxial controle (Tabela 3). Com relação à densidade de tricomas foi observado aumento na face adaxial do tratamento seca com relação ao seu respectivo controle (Tabela 3). Já para o índice estomático, houve diferença ($p<0,05$) em ambas as faces, aumento na face adaxial e redução na face abaxial em relação aos seus respectivos

controles (Tabela 3). Além disso, dentro do tratamento de seca houve aumento no índice de tricomas na face adaxial em relação a face abaxial (Tabela 3).

4. Discussão

A suspensão de rega foi mantida por 10 dias, quando a *C. procera* atingiu o máximo estresse. Neste momento, foi observado uma redução no CHR foliar alcançando o valor de 50%. Embora para a maioria das plantas arbustivas e com metabolismo C_3 este valor seria letal, em *C. procera* foi possível recuperar a turgescência celular. Estudo prévio encontrou CHR próximo a 60% (Frosi et al. 2013). Segundo Lawlor e Cornic (2002) na maioria das espécies vegetais vascularizadas com CHR foliar em 50% entram em ponto de murcha permanente e não se recuperam após a reidratação. Entretanto, após a reidratação a *C. procera* apresentou recuperação do CHR e Ψ_s, evidenciando a manutenção do funcionamento do metabolismo celular. No estresse máximo, o acúmulo de solutos orgânicos pode ter auxiliado na redução do Ψ_s. A redução do potencial osmótico é uma estratégia de tolerância à seca pelo fato da água tender a entrar na célula e manter a pressão de turgescência (Pérez-Pérez et al. 2009).

No estresse máximo, *C. procera* apresentou dano ao fotossistema como observado através do Fv'/Fm'. Porém o dano não foi crônico, uma vez que sob condições de escuro os centros de reações foram recuperados, o que evidencia a passagem pelo estresse sem danos permanentes aos fotossistemas, como observado através do Fv/Fm com valores acima de 0,80 (Tezara et al. 2011).

Ao longo do 9º dia de suspensão de rega, quando foi realizada a curva diária, as plantas sob estresse apresentaram alterações expressivas nas trocas gasosas. Mas mesmo com cenário desfavorável para a maioria das plantas C_3, plantas jovens de *C. procera* apresentaram aumento nas taxas fotossintéticas quando o DPV e o DFFF foram

máximos. O que garantiu maior EUA quando comparado com o controle isso indica alta eficiência fotossintética por parte da *C. procera* mesmo sob condições de seca severa. Em curva diária de trocas gasosas realizada em plantas jovens de *C. procera* por Frosi et al. (2013), foi observado também a manutenção de uma baixa g_s sob condições de seca ao longo do dia, porém a *A* apresentou aumento até às 6:00 h sem diferir das plantas controle. E em seguida a *A* reduziu suas taxas em relação ao controle e se manteve praticamente constante ao longo do dia em plantas sob estresse severo, sem irrigação, entretanto, 50% de irrigação não alteraram a *A* somente reduziram g_s em relação às plantas controle bem hidratadas. Os dados do presente estudo e trabalhos concluídos sugerem alta performance dos fatores não estomáticos, tal como a condutância mesofílica (Tezara et al. 2011; Frosi et al. 2013).

Diferentemente dos estudos anteriores, avaliamos sob condições controladas de DPV, luz e variação na concentração de CO_2 através das curvas A/C_i durante o 7º dia de seca, foi possível avançar no conhecimento sobre a performance fotossintética de *C. procera* sob seca. Em plantas sob déficit hídrico não houve limitação bioquímica da Rubisco uma vez que a capacidade de carboxilação da Rubisco foi mantida ($V_{c,max}$). Não foi observado limitação no transporte de elétrons para a regeneração da RuBP (J_{max}) e além da manutenção do J_c. Não houve limitação mesofílica, pois a concentração de CO_2 no cloroplasto foi garantida Cc devido a manutenção da g_m (Table 2). Geralmente é observado redução na g_m em decorrência da seca em plantas C_3, como é o caso da *J. curcas* (Silva et al., 2015), *Lysimachia minoricensis* (Galmés et al., 2007). Porém, algumas poucas plantas se apresentam com valores inalterados de g_m diante ao déficit hídrico, assim como foi com a *C. procera*, e como é o caso da *Capsicum annuum* (Delfine et al., 2001,2002) e da *Beta vulgaris* (Monti et al., 2006). Um dos fatores que interfere no aumento da g_m é a alteração na expressão de aquaporinas como foi

observado em *Oryza sativa* (Hanba et al., 2004) e da *Nicotiana tabacum* (Flexas et al., 2006). Além disso, o aumento na atividade da anidrase carbônica, que catalisa a reação reversível do CO_2 em HCO_3^-, pode manter a concentração do CO_2 no estroma pelo fato de alterar a natureza de difusão do carbono (Flexas et al., 2012; Tholen e Zhu, 2011).

A transferência de elétrons para o O_2 aumenta quando a fotossíntese é reduzida sob baixo CHR, formando EROs. Alternativas para dissipar o excesso de elétrons é crucial para evitar danos oxidativos ao aparato fotossintético, Em plantas C_3, a fotorrespiração é o segundo mecanismo mais importante na dissipação do excesso de energia do aparato fotossintético (Lawlor e Cornic 2002), evidenciado pela taxa de ETR/*A* (Fig. 3 G). Desta forma, a fotorrespiração funciona como uma via de fotoproteção ao maquinário fotossintético principalmente quando a planta é exposta à alta incidência luminosa e seca (Bai et al., 2008; Silva et al., 2015). Em *C. procera* houve aumento na P_r em plantas sob déficit hídrico, a fotorrespiração também foi evidenciada pelo aumento na J_o (Table 2). A relação P_r/*A* em geral sob condições de ar livre (350 ppm CO_2, 21% O_2) fica em torno de 0.1 a 10 ^oC, podendo chegar a 0.3 a 40 ^oC, entretanto, sob baixa disponibilidade de CO_2, como poderia ocorrer sob déficit hídrico, pode ocorrer maiores valores (Ehleringer et al. 1991), tal como em nossas plantas sob o CHR de 60% Pr/A foi 0,50 quase duas vezes mais que as plantas bem hidratatas (Table 2). Apesar de proporcionar a redução da fotossíntese a Pr poderia manter a concentração de CO_2 no estroma do cloroplasto pelo fluxo de CO_2 proveniente da mitocôndria (Tholen e Zhu, 2011; Flexas et al., 2012). Além disso, a via fotorrespiratória pode sofrer desvios que podem aumentar a C_c, bem como a assimilação de carbono (Xin et al., 2015).

Além da fotorrespiração, a R_d também é responsável em eliminar elétrons pelo fluxo na cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria (Lawlor e Cornic, 2002). Em

C. procera sob seca o valor de R_d dobrou, indicando mais uma forma de fotoproteção e de diminuir danos oxidativos. Valores semelhantes de R_d foram encontrados por Tezara et al. (2011) em duas espécies de *Calotropis* sob condições de campo na América do Sul. Também como forma de fotoproteção foi observada dissipação de energia através do NPQ (Fig. 3 E), bem como o aumento no conteúdo dos carotenóides (Fig. 6 C) que auxilia a dissipação do excesso de energia através do ciclo das xantofilas (Esteban et al. 2015).

O déficit hídrico também proporcionou alterações no metabolismo primário de plantas jovens de *C. procera*. O aumento dos CST (Fig. 5 A) sem o aumento no conteúdo do amido sugere que a seca prejudicou o aumento de estoque dos carboidratos na forma de amido, bem como o transporte dos açúcares das folhas para os drenos. O acúmulo de solutos durante a seca também pode atuar como consumidores de elétrons (Lawlor e Cornic, 2002). Os açúcares solúveis podem funcionar como osmoprotetor (estabilizando membranas e proteínas) e antioxidante, bem como atuar como moléculas sinalizadoras de genes responsáveis pela síntese de osmoprotetores (antocianinas) (Van den Ende e El-Esawe 2013) e de genes relacionados com a defesa ao estresse oxidativo (SOD) (Koch, 1996). O aumento dos açúcares solúveis também pode servir como precursor para síntese de carotenóides e ascorbato além de servir como esqueleto carbônico para síntese de aminoácidos. A redução das proteínas e consequentemente aumento dos aminoácidos incluindo a prolina podem funcionar também como osmoprotetores pela estabilização de membranas, proteínas e enzimas (Ashraf e Foolad 2007), além disso, a prolina pode auxiliar na eliminação de ROS (Signorelli et al. 2014).

Atributos anatômicos também auxiliaram na fotoproteção de *C. procera* sob déficit hídrico. A redução (60%) na quantidade de folhas (dados não mostrados) associado ao aumento da espessura da cutícula, formando uma barreira hidrofóbica que

minimiza a perda d'água para o ambiente (Kerstiens, 1996; Kosma et al., 2009; Tipple et al., 2015); e ao aumento na densidade de tricomas, criando um microclima favorável à folha com a reflexão de luz incidente (Galmés et al., 2007) e manutenção da camada limítrofe, proporcionando manutenção da temperatura foliar (Fig. 1 C) e minimizando a perda d'água (Burkhardt et al., 2012). Além disso, Tezara et al. (2011) sugerem que em *C. procera* o aumento dos tricomas estão relacionados com a fotoproteção ao aparato fotoquímico.

Mesmo com todo o processo de fotoproteção e fotooxidação houve aumento no EXC que pode ter aumentado o conteúdo de EROs responsáveis pela peroxidação da membrana, evidenciado através da quantificação do MDA (Fig. 7 A). O sistema enzimático antioxidativo auxiliou na eliminação do superóxido e do H_2O_2 pelo aumento na atividade da SOD e pela manutenção da atividade da APX, respectivamente.

A *Calotropis procera* apresentou resiliência sob seca e a rápida recuperação foi garantida devido a diferentes processos. Após a reidratação das plantas sob seca, a rápida recuperação em até 48 h dos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência foi suportada pelos altos valores de $V_{c,max}$, J_{max}, $g_{m,}$ A_{max} e redução da Pr quando comparadas ao controle. A nossa hipótese se confirmou parcialmente, uma vez que a g_m se manteve entre os tratamentos (Table 2), após sete dias de seca, com CHR foliar de 60% e g_s 60% menor do que as plantas controle. Todavia, após quatro dias de reidratação a g_s, g_m e *A* foram maiores que as plantas controle sob o mesmo CHR para ambos os tratamentos. Alteração no maquinário bioquímico também contribuiu para a rápida recuperação, com o aumento do teor dos pigmentos fotossintéticos, da atividade enzimática (APX e SOD) e dos solutos orgânicos CST, PST, ALT e prolina. Também foi observado aumento de PST, e pigmentos fotossintéticos em plantas reidratadas sob seca severa em plantas jovens de *C. procera* (Frosi et al. 2013).

Com base no que foi discutido, *C. procera* apresentou estratégias para minimizar a perda d'água pela redução na condutância estomática, redução do número de folhas, aumento na espessura da cutícula e na densidade estomática. A P_r, R_d, NPQ, carotenóides e aumento nos solutos orgânicos (CST, ALT e prolina) garantiram a fotoproteção ao aparato fotoquímico. Todo esse conjunto de dados nos faz avançar no entendimento de como uma espécie de metabolismo C_3 consegue se manter suas folhas metabolicamente ativa mesmo sob seca severa.

5. Referências

Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., Karanov, E., 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. Plant Cell Environ. 24, 1337–1344.

Alvares, C.A., Stape, J.L., Sentelhas, P.C., Gonçalves, J.L.M., Sparovek, G., 2013. Köppen's climate classification map for Brazil. Metreorol. Z. 22, 711–728.

Ashraf, M., Foolad, M.R., 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environ. Exp. Bot. 59, 206–216.

Bai, J., Xu, D.H., Kang, H.M., Chen, K., Wang, G., 2008. Photoprotective function of photorespiration in Reaumuria soongorica during different levels of drought stress in natural high irradiance. Photosynthetica. 46, 232-237.

Bagard, M., Le Thiec, D., Delacote, E., Hasenfratz-Sauder, M.P., Banvoy, J., Gérard, J., Dizengremel, P., Jolivet, Y., 2008. Ozone-induced changes in photosynthesis and photorespiration and photorespiration of hybrid poplar in relation to the developmental stage of the leaves. Physiol. Plant. 134, 559–574.

Baker, N.R., 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. Annu. Rev. Plant Biol., 59, 89–113.

Barrs, H.D., Weatherley, P.E., 1962. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. Aust. J. Biol. Sci. 15, 413-428.

Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant Soil, 39, 205–207.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254.

Bukatsch, F., 1972. Bemerkungen zur Doppelfarbung: Astrablau-Safranin. Mikrokosmos. 61, 255.

Burkhardt, J., Basi, S., Pariyar, S., Hunsche, M., 2012. Stomatal penetration by aqueous solutions - an update involving leaf surface particles. New Phytol. 196, 774–787.

Cakmak, I., Horst, W., 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). Physiol. Plant. 83, 463–468.

Campbell, G.S., Norman, J.M., 1998. An introduction to environmental biophysics. Springer-Verlag, New York.

Chaves, M.M.; Flexas, J.; Pinheiro, C., 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. Ann. Bot. 103, 551-560.

Delfine, S., Loreto, F., Alvino, A., 2001. Drought-stress effects on physiology, growth and biomass production of rainfed and irrigated bell pepper plants in the Mediterranean region. J. Am. Soc. Hort. Sci. 126, 297–304.

Delfine S., Tognetti R., Loreto F., Alvino A., 2002. Physiological and growth responses to water stress in field-grown bell pepper (*Capsicum annuum* L.). J. Hort. Sci. Biotech. 77, 697–704

Donohue, R.J., Roderick, M.L., McVicar, T.R., Farquhar, G.D., 2013. Impact of CO_2 fertilization on maximum foliage cover across the globe's warm, arid environments. Geophys Res. Lett. 40, 3031-3035.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J. K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28, 350–356.

Ehleringer, J.R., Sage, R.F., Flanagan, L.B., Pearcy, R.W., 1991. Climate change and the evolution of C_4 photosynthesis. Trends Ecol. Evol. 6, 95-99.

Esteban, R., Moran, J.F., Becerril, J.M., García-Plazaola, J.I., 2015. Versatility of carotenoids: an integrated view on diversity, evolution, functional roles and environmental interactions. Environ. Exp. Bot. 119, 63-75.

Flexas, J., Ribas-Carbó, M., Hanson, D.T., Bota, J., Otto, B., Cifre, J., McDowell, N., Medrano, H., Kaldenhoff, R., 2006. Tobacco aquaporin NtAQP1 is involved in mesophyll conductance to CO_2 *in vivo*. Plant J. 48, 427–439.

Flexas, J., Diaz-Espejo, A., Galmés, J., Kaldenhoff, R., Medrano, H., Ribas-Carbo, M., 2007. Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO_2 concentration around leaves. Plant Cell Environ. 30, 1284–1298.

Flexas, J., Baron, M., Bota, J., Ducruet, J.M., Galle, A., Galmes, J., Jimenez, M., Pou, A., Ribas-Carbo, M., Sajnani, C., Tomas, M., Medrano, H., 2009. Photosynthesis limitations during water stress acclimation and recovery in the drought-adapted Vitis hybrid Richter-110 (*V. berlandieri* × *V. rupestris*). J. Exp. Bot. 60, 2361–2377.

Flexas, J., Barbourb, M.M., Brendel, O., Cabrera, H.M., Carriquía, M., Díaz-Espejof, A., Douthe, C., Dreyer, E., Ferriog, J.P., Gagoa, J., Galléa, A., Galmésa, J., Kodamah, N., Medranoa, H., Niinemetsi, Ü., Peguero-Pinaa, J.J., Poua, A., Ribas-Carbóa, M., Tomás, M., Tosensi, T., Warren, C.R., 2012. Mesophyll diffusion conductance to CO_2: An unappreciated central player in photosynthesis. Plant Sci. 193-194, 70–84.

Foreman, D., Gaylor, L., Evans, E., Trella, C., 1973. A modification of the Roe procedure for determination of fructose in tissues with increased specificity. Anal. Biochem. 56, 584–590.

Frosi, G., Oliveira, M.T., Almeida-Cortez, J., Santos, M.G., 2013. Ecophysiological performance of *Calotropis procera*: An exotic and evergreen species in Caatinga, Brazilian semi-arid. Acta Physiol Plant. 35, 335–344.

Galle, A., Florez-Sarasa, I., Tomas, M., Pou, A., Medrano, H., Ribas-Carbo, M., Flexas, J., 2009. The role of mesophyll conductance during water stress and recovery in tobacco (*Nicotiana sylvestris*): Acclimation or limitation? J. Exp. Bot. 60, 2379–2390.

Galmés, J., Abadía, A., Cifre, J., Medrano, H. Flexas, J., 2007. Photoprotection processes under water stress and recovery in Mediterranean plants with different growth forms and leaf habits. Physiol. Plant. 130, 495–510.

Giannopolitis, C.N., Ries, S.K., 1977. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. Plant Physiol. 59, 309–14.

Hanba, Y.T., Shibasaka, M., Hayashi, Y., Hayakawa, T., Kasamo, K., Terashima, I., Katsuhara, M., 2004. Overexpression of the barley aquaporin HvPIP2;1 increases internal CO_2 conductance and CO_2 assimilation in the leaves of transgenic rice plants. Plant Cell Physiol. 45, 521–529.

Handel, E.V., 1968. Direct microdetermination of sucrose. Anal. Biochem. 22, 280–283.

Havir, E.A., McHale, N.A., 1987. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. Plant Physiol. 84, 450–455.

Hu, L.X., Wang, Z.L., Huang, B.R., 2010. Diffusion limitations and metabolic factors associated with inhibition and recovery of photosynthesis from drought stress in a C_3 perennial grass species. Physiol. Plant. 139, 93–106.

IPCC, 2013. *Climate change 2013*: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate. Cambridge: University Press, Cambridge, 1535 p.

Johansen, D.A., 1940. Plant Microtechnique. McGraw-Hill Book Company Inc., New York: 523pp.

Kerstiens, G., 1996. Signalling across the divide: a wider perspective of cuticular structure-function relationships. Trends Plant Sci. 1, 125-129.

Koch, K.E., 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. Ann. Ver. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47, 509–540.

Kosma, D.K., Bourdenx, B., Bernard, A., Parsons, E.P., Lu, S., Joubes, J., Jenks, M.A., 2009. The impact of water deficiency on leaf cuticle lipids of *Arabidopsis*. Plant Physiol., 151, 1918–1929.

Kraus, J. E., de Sousa, H. C., Rezende, M. H., Castro, N. M., Vecchi, C., Luque, R., 1998. Astra blue and basic fuchsin double staining of plant materials. Biotech Histochem. 73, 235–243.

Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C., 2001. Chlorophylls and Carotenoids : Measurement and Characterization by UV-VIS. Curr. Protoc. Food Anal. Chem. *F4.3.1-F4.*(Supplement 1), 1–8.

Long, S.P., Bernacchi, C.J., 2003. Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. J. Exp. Bot. 54, 2393–2401.

Lawlor, D.W., Cornic, G., 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. Plant Cell Environ. 25, 275–294.

Monti, A., Brugnoli, E., Scartazza, A., Amaducci, M.T., 2006. The effect of transient and continuous drought on yield, photosynthesis and carbon isotope discrimination in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). J. Exp. Bot. 57, 1253–1262.

Moore, B.Y.S., Stein, H., 1948. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. J. Biol. Chem., 176, 367–388.

Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbato specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol. 22, 867–880.

Nelson, N., 1944. A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 3, 375–380.

Pérez-Pérez, J.G., Robles, J.M., Tovar, J.C., Botía, P., 2009. Response to drought and salt stress of lemon “Fino 49” under field conditions: Water relations, osmotic adjustment and gas exchange. Sci. Hort. 122, 83–90.

Salisbury, E.J., 1928. On the causes and ecological significance of stomatal frequency with special reference to woodland flora. Phil. Trans. Royal Soc. 216, 1-65.

Santos, M.G., Ribeiro, R.V., Oliveira, R.F., Pimentel, C., 2004. Gas exchange and yield response to foliar phosphorus application in *Phaseolus vulgaris* L. under drought. Braz. J. Plant Physiol. 16, 171-179.

Sayed, O.H., Mohamed, M.K., 2000. Altitudinal changes in photosynthetic pathways of floristic elements in southern Sinai, Egypt. Photosynthetica. 38, 367–372.

Sharkey, T.D., Bernarcchi, C.J., Farquhar, G.D., Singaas., E.L., 2007. Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C_3 leaves. Plant Cell Environ. 30, 1035–1040.

Signorelli, S., Coitiño, E.L., Borsani, O., Monza, J., 2014. Molecular mechanisms for the reaction between • OH Radicals and Proline: Insights on the role as reactive oxygen species scavenger in plant stress. J. Phys. Chem. 118, 37-47.

Silva, E.N., Ferreira-Silva, S.L., Viégas, R.A., Silveira, J.A.G., 2010. The role of organic and inorganic solutes in the osmotic adjustment of drought-stressed *Jatropha curcas* plants. Environ. Exp. Bot. 69, 279–285.

Silva, E.N., Silveira, J.A.G., Ribeiro., R.V., Vieira, S.A., 2015. Photoprotective function of energy dissipation by thermal processes and photorespiratory mechanisms in *Jatropha curcas* plants during different intensities of drought and after recovery. Environ. Exp. Bot. 110, 36–45.

Sobrinho, M., Tabatinga, G., Machado, I.C., Lopes, A.V., 2013. Reproductive phenological pattern of *Calotropis procera* (Apocynaceae), an invasive species in Brazil: annual in native areas; continuous in invaded areas of Caatinga. Acta Bot. Bras. 27, 456–459.

Somogyi, M., 1951. Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. 195, 19–23.

Strittmatter, C.G.D., 1973. Nueva técnica de diafanización. Bol. Soc. Argent. Bot. 15, 126-129.

Tezara, W., Colombo, R., Coronel, I., Marín, O., 2011. Water relations and photosynthetic capacity of two species of *Calotropis* in a tropical semi-arid ecosystem. Ann. Bot. 107, 397–405.

Tholen, D., Zhu, X.G., 2011. The mechanistic basis of internal conductance: a theoretical analysis of mesophyll cell photosynthesis and CO_2 diffusion. Plant Phisiol. 105, 90-105.

Tipple, B.J., Berke, M.A., Hambach, B., Roden, J.S., Ehleringer, J.R., 2015. Predicting leaf was *n* -alkane ^{2}H/ ^{1}H ratios: controlled water source and humidity experiments with hydroponically grown trees confirm predictions of Craig-Gordon model. Plant Cell and Environ. 38, 1035-1047.

Van den Ende, W., El-Esawe, S.K., 2013. Sucrose signaling pathways leading to fructan and anthocyanin accumulation: A dual function in abiotic and biotic stress responses? Environ. Exp. Bot. 108, 4–13.

Valentini, R., Epron, D., de Angelis, P., Matteucci, G., Dreyer, E., 1995. In situ estimation of net CO_2 assimilation, photosynthetic electron flow and photorespiration in Turkey oak (Q. cerris L.) leaves: diurnal cycles under different levels of water supply. Plant Cell Environ. 18, 631–640.

Voss I., Sunil, B., Scheiber R., Raghavengra A.S., 2013. Emerging concept for the role of photorespiration as an important part of abiotic stress response. Plant Biol. 15, 713-722.

Warren, C.R., 2011. How does P affect photosynthesis and metabolite profiles of *Eucalyptus globulus*? Tree Physiol. 31, 727–739.

Xin, C.P., Tholen, D., Devloo, V., Zhu, X.G., 2015. The Benefits of Photorespiratory Bypasses: How Can They Work? Plant Physiol. 167, 574–585.

Yin, X., Struik, P.C., 2009. Theoretical reconsiderations when estimating the mesophyll conductance to CO_2 diffusion in leaves of C_3 plants by analysis of combined gas exchange and chlorophyll fluorescence measurements. Plant Cell Environ. 32, 1513–1524.

Zhu, X.C., Song, F.B., Liu, S.Q., Liu, T.D., Zhou, X., 2012. Arbuscular mycorrhizae improves photosynthesis and water status of *Zea mays* L. under drought stress. Plant Soil Environ. 58, 186-191.

TABELAS

Tabela 1. Potencial osmótico (Ψs) em folha de plantas jovens de *Calotropis procera* submetidas ao déficit hídrico em casa de vegetação no máximo estresse (10º dia) e reidratação (15º dia) (n=3±E.P). Valores seguidos por * diferem entre si pelo test T ($p<0,05$).

Tempo	Tratamento	Ψ_s (MPa)
Estresse máximo	Controle	-0,94 ± 0,02
	Seca	-1,68 ± 0,08 *
Reidratação	Controle	-1,05 ± 0,01
	Seca	-1,04 ± 0,04 ns

Tabela 2. Parâmetros fotossintéticos em plantas jovens de *Calotropis procera* submetidas ao déficit hídrico em casa de vegetação no 7º dia e reidratação (14º dia) (n=3±E.P).Valores seguidos por * diferem entre si pelo test T (p<0,05).

	Seca		**Reidratação**	
Parâmetro	**Controle**	**Seca**	**Controle**	**Seca**
$V_{c,max}$ (μmol.m^{-2}.s^{-1})	65,30 ± 6,29	86,71 ± 8,02	71,88 ± 3,85 *	92,91 ± 4,17
$V_{o,max}$ (μmol.m^{-2}.s^{-1})	18,07 ± 1,74	23,99 ± 2,22	19,89 ± 1,06 *	25,71 ± 1,16
J_{max} (μmol .m^{-2}.s^{-1})	112,73 ± 1,08	139,70 ± 15,82	172,77 ± 11,18 *	210,35 ± 5,18
A_{max} (μmol.m^{-2}.s^{-1})	14,88 ± 1,38 *	22,79 ± 2,07	22,99 ± 0,77 *	30,73 ± 0,21
R_d (μmol.m^{-2}.s^{-1})	2,08 ± 0,15 *	4,60 ± 0,16	2,08 ± 0,00	2,32 ± 0,10
C_c (Pa)	90,33 ± 4,93	63,70 ± 12,29	102,01 ± 4,66 *	134,76 ± 7,24
g_m (mol.m^{-2}.s^{-1})	0,11 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,10 ± 0,01 *	0,16 ± 0,01
Jc (μmol.m^{-2}.s^{-1})	40,79 ± 2,45	37,80 ± 8,46	59,98 ± 1,05 *	90,01 ± 1,73
Jo (μmol.m^{-2}.s^{-1})	20,38 ± 1,94 *	36,21 ± 4,72	12,29 ± 0,93 *	6,72 ± 1,17
Jc/Jo	2,03 ± 0,20	1,14 ± 0,35	4,97 ± 0,29 *	14,94 ± 2,64
Pr (μmol.m^{-2}.s^{-1})	2,55 ± 0,24 *	4,53 ± 0,59	1,54 ± 0,12 *	0,84 ± 0,14
Pr/*A*	0,26 ± 0,03	0,50 ± 0,17	0,13 ± 0,01 *	0,05 ± 0,01
ETR/*A*	6,31 ± 0,30	7,54 ± 0,13	6,35 ± 0,09 *	4,86 ± 0,21
LE	0,38 ± 0,05	0,22 ± 0,10	0,47 ± 0,02 *	0,20 ± 0,05
LNE	0,62 ± 0,05	0,78 ± 0,10	0,53 ± 0,02 *	0,80 ± 0,05

$V_{c,max}$, velocidade máxima de carboxilação; $V_{o,max}$, velocidade máxima de oxigenação; J_{max}, taxa máxima de transporte de elétrons; A_{max}, assimilação máxima de CO_2; R_d, respiração mitocondrial do dia; C_c, concentração de CO_2 no cloroplasto; g_m, condutância mesofilica; Jc, fluxo de elétrons usado para a carboxilação da RuBP; Jo, fluxo de elétrons usado para a oxigenação da RuBP; Pr, fotorrespiração; ETR, taxa de transporte de elétrons; A, assimilação líquida de CO_2; LE, limitação estomática; LNE, limitação não-estomática.

Tabela 3. Atributos anatômicos foliares em plantas jovens de *Calotropis procera* submetidas ao déficit hídrico em casa de vegetação no máximo estresse (10º dia) (n=3±E.P). Valores seguidos de letras diferentes diferem entre si pelo teste de *Student Newman Keul's* ($p<0,05$).

	Controle		Seca	
	Adaxial	Abaxial	Adaxial	Abaxial
Densidade estomática (0,02mm^2)	$8,50^{B}$	$10,80^{A}$	$8,35^{B}$	$9,55^{B}$
Índice estomático (%)	$10,64^{NS}$	9,23	9,43	9,60
Densidade de tricoma (0,02mm^2)	$0,75^{B}$	$2,95^{A}$	$2,25^{A}$	$2,35^{A}$
Índice de tricoma (%)	$0,97^{B}$	$2,56^{A}$	$2,79^{A}$	$2,62^{B}$
Densidade célula epidérmica (0,02mm^2)	$71,75^{C}$	$115,50^{A}$	$79,95^{BC}$	$90,65^{B}$
Cutícula (μm)	$1,39^{B}$	$1,38^{B}$	$1,78^{A}$	$1,89^{A}$
Espessura da epiderme (μm)	$14,68^{A}$	$12,89^{B}$	$15,05^{A}$	$12,67^{B}$
Espessura parênquima paliçádico (μm)	$63,76^{NS}$		66,07	
Espessura parênquima lacunoso (μm)	$141,71^{NS}$		155,49	
Espessura total do mesofilo (μm)	$205,46^{NS}$		221,56	
Espessura da folha (μm)	$231,45^{NS}$		252,63	

FIGURAS

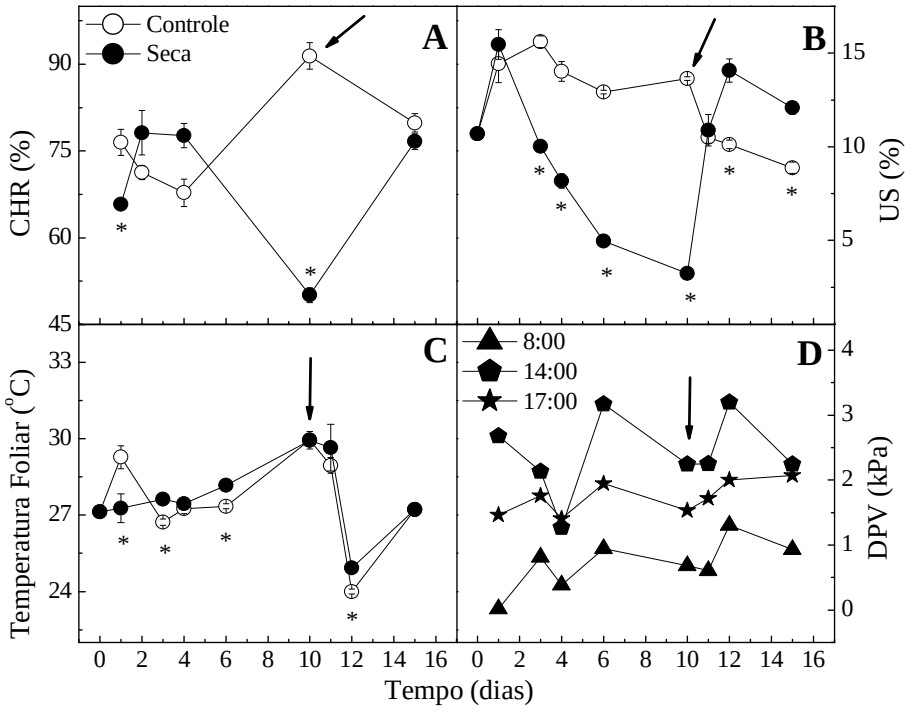

Fig. 1. (A) Conteúdo hídrico relativo foliar (CHR), (B) umidade do solo (US), (C) temperatura foliar e (D) déficit de pressão de vapor (DPV) ambiente em plantas jovens de *Calotropis procera* submetidas ao déficit hídrico em casa de vegetação. Seta indica o dia do máximo estresse (10º dia) e a reidratação ocorreu nos 5 dias subsequentes (15º dia) (n=4±E.P). Valores seguidos por * diferem entre si pelo teste T ($p<0,05$).

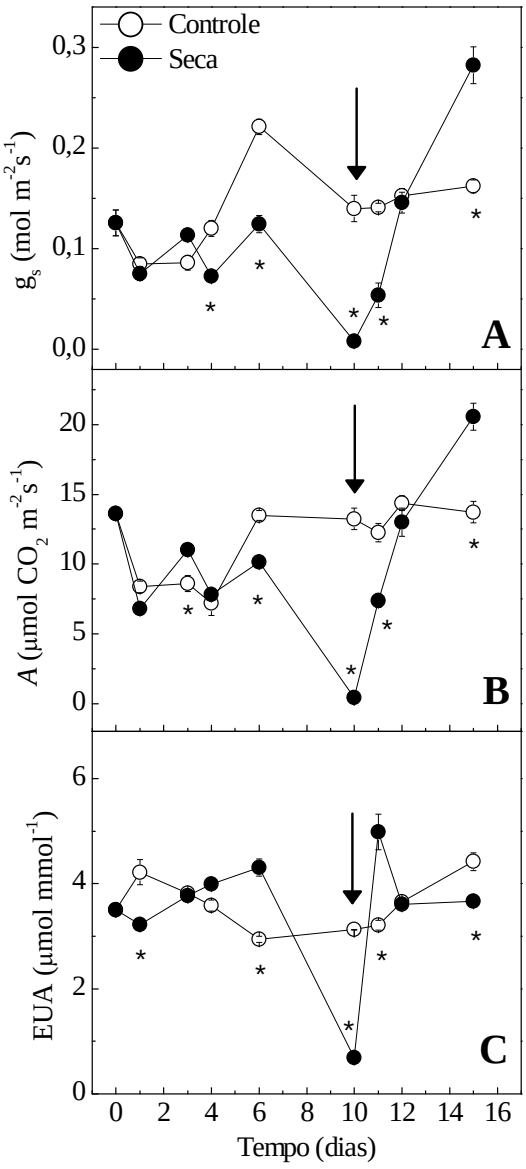

Fig. 2. (A) Condutância estomática (g_s), (B) assimilação líquida de CO_2 (*A*) e (C) eficiência do uso da água (EUA) em plantas jovens de *Calotropis procera* submetidas ao déficit hídrico em casa de vegetação. Seta indica o dia do máximo estresse (10º dia) e a reidratação ocorreu nos 5 dias subsequentes (15º dia) (n=4±E.P). Valores seguidos por * diferem entre si pelo teste T ($p<0,05$).

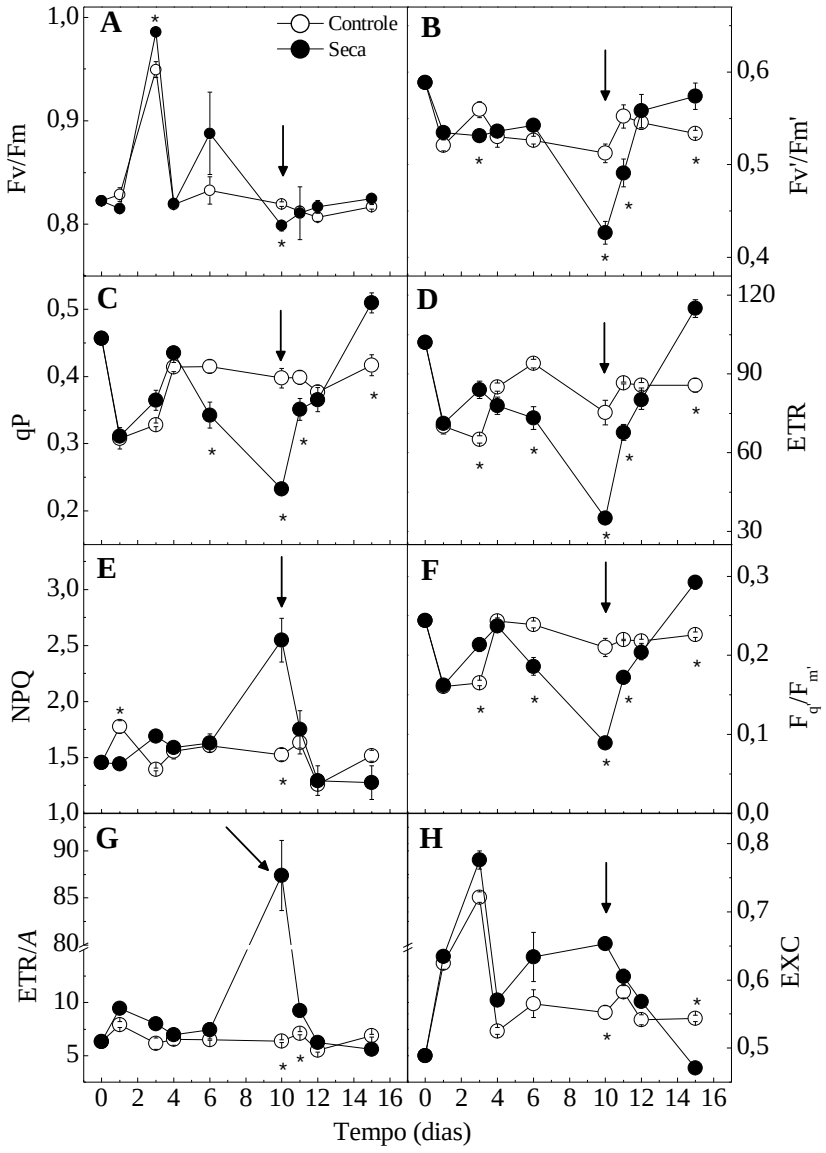

Fig. 3. (A) Eficiência quântica máxima fotoquímica do PSII (Fv/Fm), (B) eficiência máxima do PSII (Fv'/Fm'), (C) *quenching* fotoquímico (qP), (D) taxa de transporte de elétrons (ETR), (E) *quenching* não fotoquímico (NPQ), (F) eficiência operacional do PSII (Fq/Fm'), (G) ETR/*A*, e (H) excesso de energia relativa ao nível do PSII (EXC) em plantas jovens de *Calotropis procera* submetidas ao déficit hídrico em casa de vegetação. Seta indica o dia do máximo estresse (10º dia) e a reidratação ocorreu nos 5 dias subsequentes (15º dia) (n=4±E.P). Valores seguidos por * diferem entre si pelo teste T ($p<0,05$).

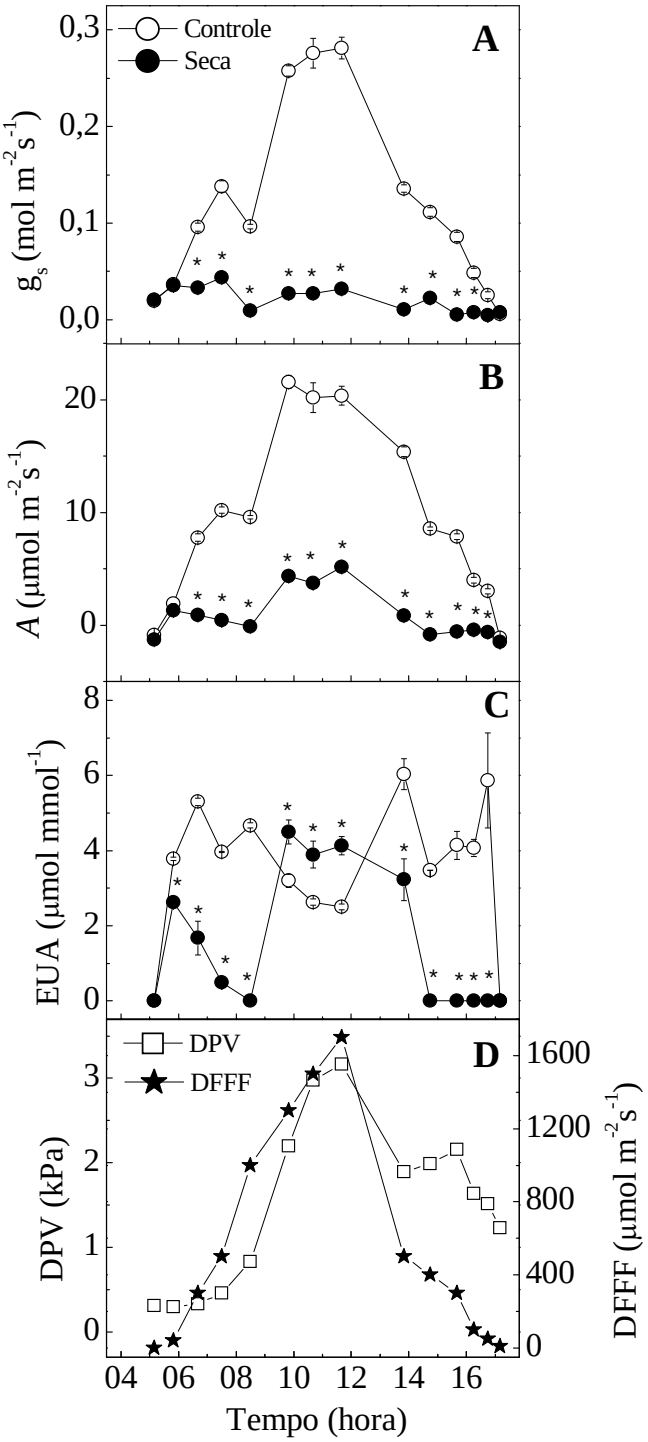

Fig. 4. Curva diária em *Calotropis procera* sob seca (9º dia) (n=3±E.P). (A) Condutância estomática (g_s), (B) assimilação líquida de CO_2 (*A*), (C) eficiência do uso da água (EUA), (D) déficit de pressão de vapor (DPV) e densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF). Valores seguidos por * diferem entre si pelo teste T ($p<0,05$).

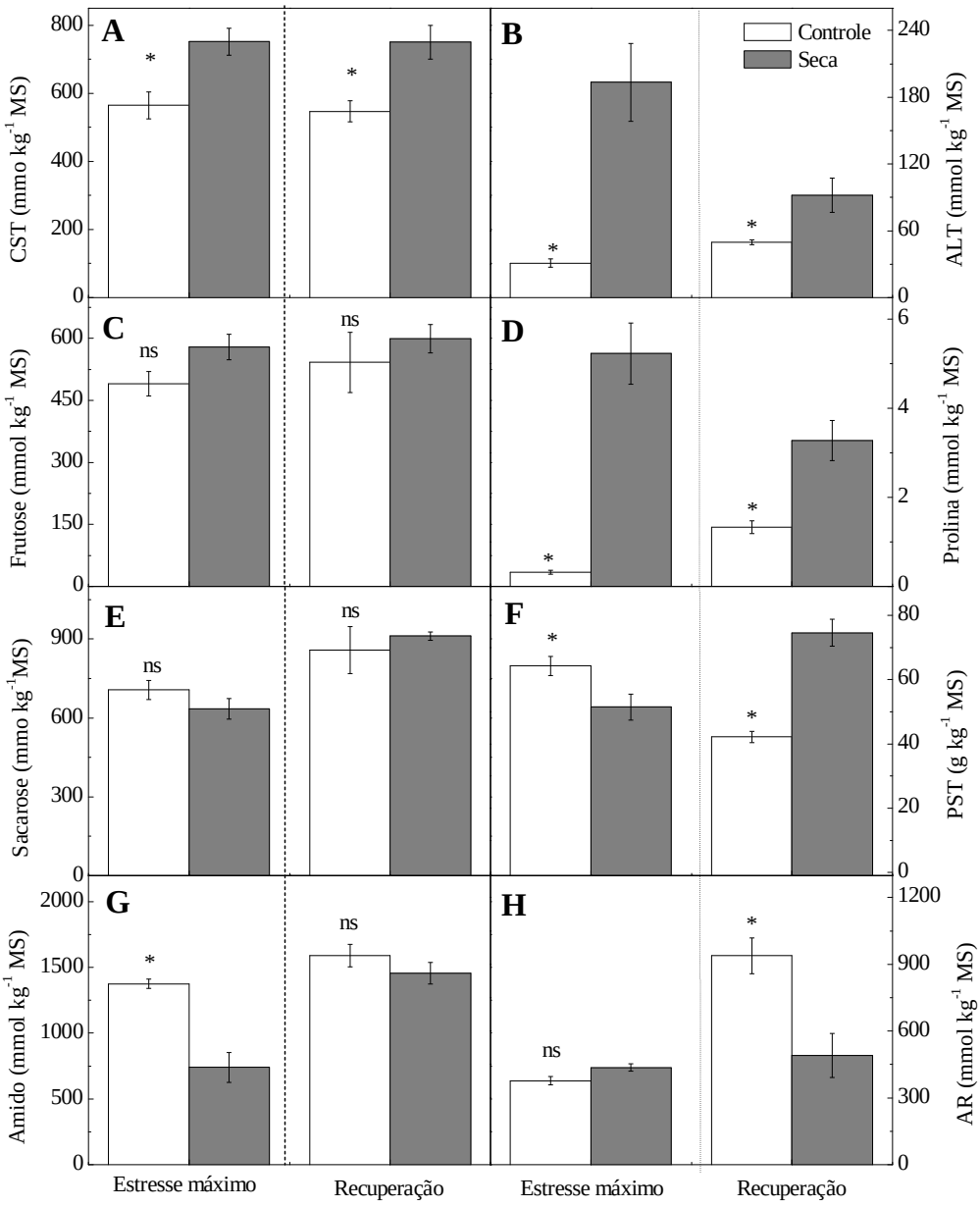

Fig. 5. (A) Carboidratos solúveis totais (CST), (B) aminoácidos livres totais (ALT), (C) frutose, (D) prolina, (E) sacarose, (F) proteínas solúveis totais (PST), (G) amido e (H) açúcares redutores (AR) em plantas jovens de *Calotropis procera* submetidas ao déficit hídrico em casa de vegetação no estresse máximo (10º dia) e na reidratação (15º dia) (n=4±E.P). Valores seguidos por * diferem entre si pelo test T ($p<0,05$).

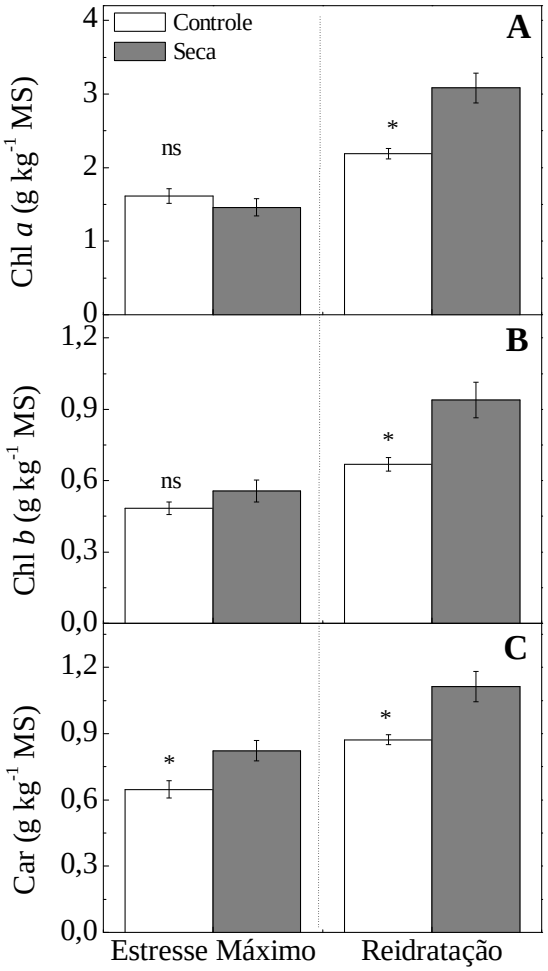

Fig. 6. (A) Clorofila *a*, (B) Clorofila *b* e (C) carotenóides em plantas jovens de *Calotropis procera* submetidas ao déficit hídrico em casa de vegetação no estresse máximo (10º dia) e na reidratação (15º dia) (n=4±E.P). Valores seguidos por * diferem entre si pelo test T ($p<0,05$).

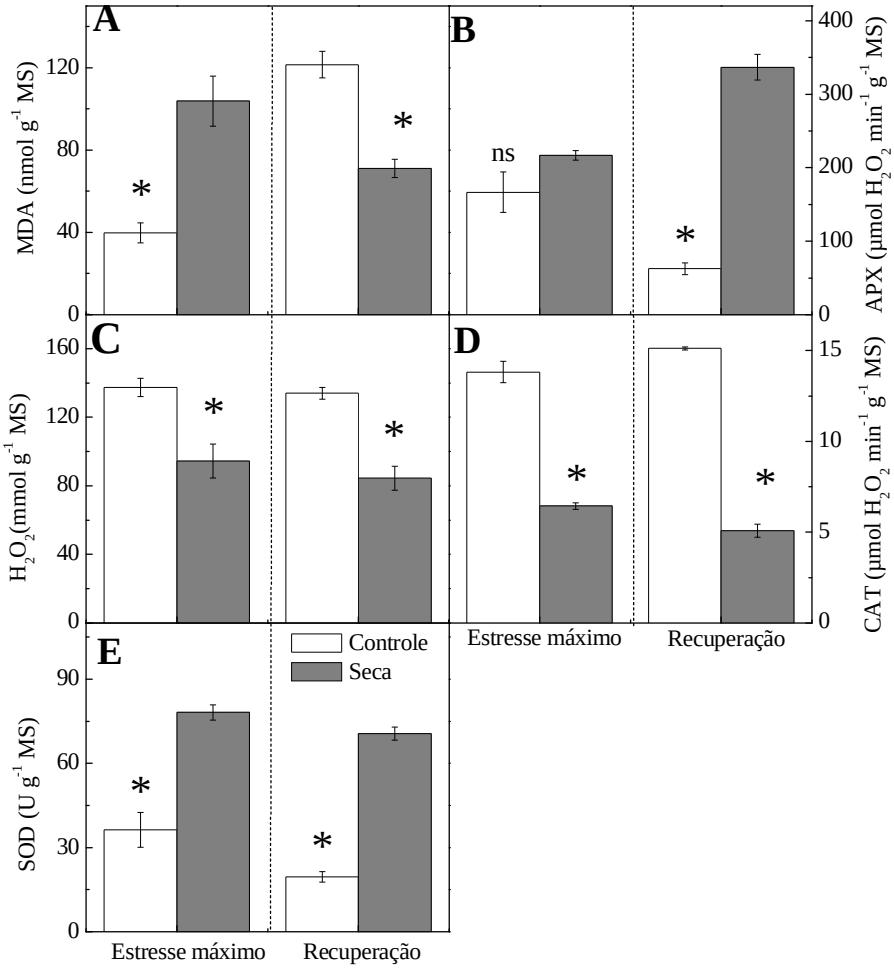

Fig. 7. (A) Aldeído malônico (MDA), (B) ascorbato proxidase (APX), (C) peróxido de hidrogêncio H_2O_2, (D) catalase (CAT) e (E) superóxido dismutase (SOD) em plantas jovens de *Calotropis procera* submetidas ao déficit hídrico em casa de vegetação no estresse máximo (10º dia) e na reidratação (15º dia) (n=4±E.P). Valores seguidos por * diferem entre si pelo test T ($p<0,05$).

6. CONCLUSÃO

Com base nos três estudos realizados com plantas adultas (semiárido e litoral) e jovens (casa de vegetação) foi possível concluir que *Calotropis procera* apresenta alta performance fotossintética em condiçoes de seca. Quando o DFFF e o DPV são máximos, *C. procera* apresenta pico nas taxas fotossintéticas nas plantas adultas e jovens. A baixa condutância estomática, observada nos três estudos realizados, garantiram a alta EUA. A alta exigência energética de *C. procera* sob condições de seca proporciona alteração no acúmulo de solutos orgânicos no meio celular, nos três estudos realizados esse acúmulo se deu de forma discrepante: no semiárido houve acúmulo de sacarose e frutose; no litoral CST, frutose, amido, prolina e PST; e em casa de vegetação houve acúmulo de CST, ALT e prolina. Além disso, o acúmulo de clorofilas em plantas adultas pode facilitar essa alta taxa fotossintética sob seca, bem como garantir a rápida recuperação da fotossíntese em plantas jovens após a reidratação. O acúmulo de carotenóides e aumento na atividade da SOD nos três estudos realizados garantiram proteção ao aparato fotossintético. *C. procera* no litoral e em casa de vegetação sob seca apresentaram estratégias semelhantes quanto ao ajuste anatômico com aumento da espessura de cutícula e densidade de tricomas. Diferentemente, *C. procera* no semiárido investiu no aumento da espessura do mesofilo e parênquimas paliçádico e lacunoso. Desta forma, o presente trabalho demonstra que *C. procera* apresenta metabolismo fotossintético divergente da maioria das plantas de metabolismo C_3.

ANEXO I

Plant Biology

© German Botanical Society and the Royal Botanical Society of the Netherlands

Edited By: Heinz Rennenberg and J.T.M. Elzenga

Impact Factor: 2.633

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2014: 48/200 (Plant Sciences)

Online ISSN: 1438-8677

Author Guidelines

Downloads: Page Charge Form (PLB_Page_Charge_Form.pdf).

Supporting Information: Authors are encouraged to provide additional materials as Supporting Information that will be accessible online. Please identify the Supporting Information as such and include appropriate figure and table captions at the end of the manuscript.

Editorial Policy
Plant Biology publishes research results from all fields of plant science. Manuscripts must be of general interest, not only addressed to a specialized readership. The journal encourages publications with an interdisciplinary approach.

Plant Biology accepts

1. Problem-oriented original research papers (maximum 9000 words)
2. Problem-oriented short research papers (maximum five typeset pages)
3. Concise review articles

ANEXO II

ENVIRONMENTAL AND EXPERIMENTAL BOTANY

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

- **Description** p.1
- **Audience** p.2
- **Impact Factor** p.2
- **Abstracting and Indexing** p.2
- **Editorial Board** p.2
- **Guide for Authors** p.4

ISSN: 0098-8472

DESCRIPTION

Aims and Scope of the Journal *Environmental and Experimental Botany*:

Environmental and Experimental Botany (EEB) publishes research papers on the physical, chemical, biological, molecular **mechanisms** and **processes** involved in the **responses** of **plants** to their **environment**.

In addition to research papers, the journal includes review articles. Submission is in agreement with the Editors-in-Chief.

The Journal also publishes special issues which are built by invited guest editors and are related to the main themes of *EEB*.

The areas covered by the Journal include:

(1) Responses of plants to heavy metals and pollutants

(2) Plant/water interactions (salinity, drought, flooding)

(3) Responses of plants to radiations ranging from UV-B to infrared

(4) Plant/atmosphere relations (ozone, CO2 , temperature)

(5) Ecophysiology of Northern plants under global change and environmental stress

(6) Biotic interactions involving environmental factors.

Each submitted manuscript related to these areas should be preferably based on an explicitly elaborated mechanistic hypothesis.The following types of manuscripts are not suitable for *EEB*: field monitoring surveys, pure mathematical modeling without experimentations, pure correlative works, applied papers on agriculture and phytopathology, studies of plant biology, gene expression and molecular works without considering environmental aspects.