

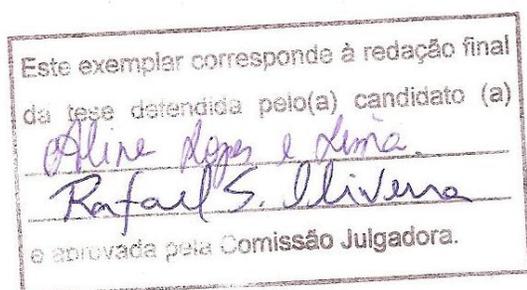
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Aline Lopes e Lima

**“O PAPEL ECOLÓGICO DA NEBLINA E A ABSORÇÃO FOLIAR  
DE ÁGUA EM TRÊS ESPÉCIES LENHOSAS DE MATAS  
NEBULARES, SP – BRASIL”**



Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Silva Oliveira

Campinas, 2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

**L628p**

Lima, Aline Lopes e

O papel ecológico da neblina e a absorção foliar de água em três espécies lenhosas de Matas Nebulares, SP - Brasil / Aline Lopes e Lima. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Rafael Silva Oliveira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Isótopos estáveis. 2. Traçadores apoplásticos. 3. Plantas – Relações hídricas. 4. *Drimys brasiliensis*. 5. *Eremanthus erythropappus*. 6. *Myrsine umbellata*. I. Oliveira, Rafael Silva. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

**Título em inglês:** The ecological role of fog and foliar water uptake in three woody species from Southeastern Brazilian Cloud Forest.

**Palavras-chave em inglês:** Apoplastic routes; Stable isotopes; Plants – Water relations; *Drimys brasiliensis*; *Eremanthus erythropappus*; *Myrsine umbellata*.

**Área de concentração:** Biologia Vegetal.

**Titulação:** Mestre em Biologia Vegetal.

**Banca examinadora:** Rafael Silva Oliveira, Carlos Frederico Widholzer, Eduardo Arcoverde de Mattos.

**Data da defesa:** 27/08/2010.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Vegetal.

Campinas, 27 de agosto de 2010.

**BANCA EXAMINADORA**

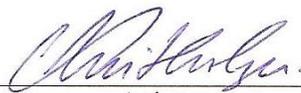
Prof. Dr. Rafael Silva Oliveira (Orientador)

  
Assinatura

Prof. Dr. Eduardo Arcoverde de Mattos

  
Assinatura

Prof. Dr. Carlos Frederico Nalepinski Widholzer

  
Assinatura

Profa. Dra. Sandra Maria Carmello Guerreiro

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. George John Shepherd

\_\_\_\_\_  
Assinatura

## Dedicatória

À Paz às coisas pré-humanas...

Ao repouso da neblina nas folhas

Ao repouso das folhas nos ramos

Ao repouso dos ramos nas árvores

Ao repouso das árvores nas florestas

Ao repouso das florestas nos morros

Ao repouso dos morros no horizonte

Ao repouso do horizonte nos olhos

Ao repouso dos pensamentos.

À minha vó Maria, *ê-enhêm!*

Saudade...

## **Agradecimentos**

Começo agradecendo aos meus pais, Márcia e Reginaldo, aos meus avós, Trajano, Lucila, Maria e João, **pela vida**, pela pedra preciosa da Educação (mais do que a escolar) e pelo **Amor sem fim!** Agradeço aos meus irmãos, Danilo e Bruna (eu já voei com vocês nas artes do quintal) e, seus complementos, Joseane e Marcos-Chabes. A todos meus familiares de Osasco/São Paulo (Tios e Tias, primos e primas, são tantos!) e de Bauru/Duartina (Regina, Luizão, Carol, Ju, as crianças... a lista é grande também!) pelo carinho imutável mesmo quando “sumo nas Campinas”. Um agradecimento especial ao Vinícius por **Tudo** - sou muito feliz ao seu lado.

Ao meu orientador, que me deixou sem graça nos primeiros meses em que eu insistia em chamá-lo “Professor Rafael” e ele não se acostumava... O “Rafa” passou a ser um professor e amigo querido, dando ao mínimo uma dimensão nova e colorida! Obrigada pelos campos juntos, pelas reuniões, pela paciência, pelas dicas de flauta, pelas descobertas gastronômicas (desde lichia até o requinte das comidas dos quatro cantos do mundo!) - **pela amizade e orientação!**

Agradeço muito ao **Projeto Temático Biota Gradiente Funcional do Projeto Biota-FAPESP**, aos coordenadores Prof. Carlos Alfredo Joly e Luiz Martinelli por todas inúmeras contribuições. Ao **CNPq**, agência de fomento da minha bolsa de mestrado. Ao **programa de pós-graduação de Biologia Vegetal**, especialmente a Maria Roseli, e todos os funcionários da Unicamp, também terceirizados, da limpeza, das bibliotecas, da infra-estrutura, da administração, do bandeirão: “ombros de gigantes”!

Ao Laboratório de Anatomia Vegetal, em especial à Prof<sup>ª</sup>. Sandra e Prof<sup>ª</sup>. Marília, sempre dispostas a me ajudar e ceder materiais e conhecimento. À Prof<sup>ª</sup>. Sandra também agradeço a participação na pré-banca e banca do mestrado. Ao Tião, às meninas do laboratório, em especial Poliana Cardoso, Sandra Obando, Priscila, Nazareth, Ana Paula e Rose. Ao Laboratório de Biosistemática, em especial a Iara, sempre disposta a ajudar, até em uma manhã de domingo das férias!

Ao Laboratório de Ecologia Vegetal, em especial aos técnicos Roseli Costa e Diego. E aos amigos: Mauro, Cleiton, Gabriel, Larissinha, Ileana, Bruno Menezes, Máira, Bruno Rosado (valeu toda a ajuda, em especial no R), Pedro Cavalin, as duas Chris, Helô, Remédio, Anna Abraão, Caio Migueli, Grazi, Gabi, Viviane Camila, Valéria, Julia, Pedro Eisenlohr, Arildo, Pequeno, Kleber Andolfato, Larissona e toda a galera pela disposição, ajudas, idéias, conversas na execução da pesquisa da “bebedeira foliar”. Esse mestrado tem um pedaço de cada um de vocês! Agradeço especialmente àqueles que me ajudaram nas medições e nas coletas.

Ao professores Carlos Frederico Widholzer, Jorge Mariath, Alexandra Mastroberti, por terem me oferecido mais que do que a técnica com os traçadores apoplásticos, mas amizade e conforto naquela ocasião. Ao Prof. Frédi agradeço também a participação na pré-banca e banca. A todos do laboratório de Anatomia Vegetal da UFRGS, em especial Denise e Juliana. Agradeço infinitamente à Prof<sup>a</sup>. Marisa Azzolini e sua família por toda a atenção, carinho e hospitalidade no período que estive na UFRGS.

Ao laboratório de Ecologia Isotópica do CENA - USP, em especial ao Geraldo Arruda, a Toninha e ao Prof. Marcelo M. Moreira. Ao Centro de Pesquisas Geocronológicas (CPGEO)- IGC/ USP, em especial a técnica Alyne Barros e ao Pesquisador Luis, por toda a prontidão, ajuda nas análises de deutério.

À Prof<sup>a</sup>. Mary Anne Heidi Dolder e suas alunas, especialmente Juliana Castro Monteiro, pela atenção dedicada durante o uso do ultra-micrótomo - pena que não deu certo o método! Agradeço também a Márcia Duarte, pelo interesse em conhecer a estrutura foliar das espécies desse trabalho durante a disciplina de Microscopia de Varredura, e assim agradeço, também, ao Laboratório de Microscopia Eletrônica/IB – UNICAMP.

A todos os professores e colegas do departamento que ajudaram de forma direta e indireta. Em especial, Prof. Carlos Joly, aqui novamente, por toda a estrutura concedida pelo programa Biota, empréstimo de equipamentos e pela oportunidade de inclusão do nosso projeto ao Gradiente Funcional; Prof. Paulo Mazzafera, pelo empréstimo dos equipamentos e prontidão em nos ajudar sempre que o procuramos; Prof<sup>a</sup>. Marlies Sazima por todo o carinho e atenção; Prof. George pelas aulas e campos durante minha formação em Biologia Vegetal, pelas contribuições ao nosso projeto e por ter aceitado ser suplente da banca examinadora; Prof. João Semir pela alegria e interesse no nosso trabalho; Prof. Fernando Martins pelos “puxões de orelha” sempre bem-vindos e pela participação na qualificação desse trabalho; Prof. Flavião pela receptividade e orientação na I.C.; Prof. Tamashiro, por todo o carinho, “mundrugagem” e empréstimo de materiais (Viva ao Cerrado na Praça!); Prof<sup>a</sup>. Eliana Martins, Prof. Jorge Vega, Prof<sup>a</sup>. Claudia Haddad, seus comentários me alegravam o trabalho árduo! Prof<sup>a</sup>. Maria do Carmo Amaral, que sempre tinha uma pergunta engraçada sobre os equipamentos: “Vai fazer suco?, Vai mergulhar?, Vai entrevistar quem?”. Aos funcionários: Pézão pelo transporte das mudas, Luciano pelos auxílios e conversas durante O experimento! Ao Seu Domingos, Dulcenéia e Lívia.

Ao Luiz Bernacci (IAC), Léo Meireles (IB/ UNICAMP) pela identificação das espécies e conversas de incentivo à pesquisa; aos pesquisadores Todd Dawson, Stefania Mambelli, Kevin Simonin, Emylin Limm (U.C.Berkeley), Eduardo Arcoverde (UFRJ) e Ewerton Manarin (IBT) pelos conselhos e interesse em

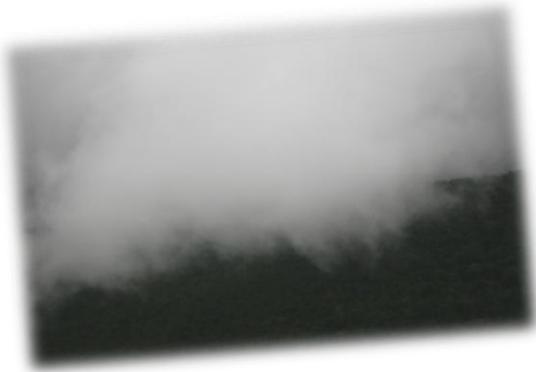
contribuir com nosso projeto. Ao Prof. Eduardo agradeço também a participação na minha pré-banca e banca. Ao Parque Estadual de Campos do Jordão, em especial ao Seu Anézio, Seu Luiz, Paulo e Viviane. Muito obrigada pela simpatia, hospitalidade e disposição em nos ajudar! Meu carinho a vocês. Ao Parque Estadual da Serra do Mar, especialmente ao Núcleo de Santa Virgínia e à Estação Ecológica de Itirapina.

Agradeço a outro pedaço da minha família: Tia Alba, Durval e sua família (ETs ou não), Vânia e toda família, Mário+Tarcila= Joaquinzinho, Daninha & Ulysses, Léo Jorge (valeu também pela imensa ajuda no R e no texto!), Kaya, Karina, DaniLuluzinhaLuluzelaEtc, Paulão+Lynda=Marcelinho e Fernandinho, Mau, Gastão, Gustavo Shimizu (e seu aparato inseparável!), Lorena, Marcelinho & Biba, Zé Bola (“Renato?”), Rosa Caraça, Tomate, Sarah Papiorek, Pipoquinha, Rubens, Ana, Alê, Dani&Marcela, Davis, Laura, Beleza, Coquinho, Samantha, Marcelão, Ana Paula gaúcha, Felipe e família, Andre, Ju Ricarte & Jose, Carlos, Ju Salomé, Fabio; ao Nathan, Marsha, Paul, Erika Mieko, Juliana, Adriana Rocha, Eduardo, Telma Ferreira, Roberto Marin e família, Gislaine e família.

Aos novos amigos de trabalho que compreenderam, estimularam e me ajudaram no “antes-defesa”, em especial ao Dr. Rubens (por me tirar do “E agora, Jose?-estatístico”), Lígia Ferrari, Sr. Antonio, Dr. Marcio Nahuz, Daniel, Lucinha, Carol, Mari e Thiago.

Aos professores do Cruzeiro do Sul (à Claudia Hiroaki); à todos os professores do colegial na FITO Norte (1999-2001) (Mitika, Claudia, Gláucia, Odmir, Yoji, etc), aos professores do cursinho Anglo Osasco (2002) (Cadu e Sérgio!); ao Prof. Mohamed, Giovanna, Prof. Maria Alice, Prof. Miguel Altieri, Clara Nichols e Toni Mar (U.C. Berkeley), Náira Rodrigues, ao CEA-Campinas, a Marina. Ao Lama Rinchen Khyenrab e todos do mosteiro Sakya Tsarpa Thupten, ao Lama Padma Samten e ao CEBB-Campinas. Ao pessoal do VEJA (2004/5) e ao grupo da Terceira Idade de Plantas Mediciniais do CPQBA! Aos alunos do IA pelos instantes mágicos. Ao programa do MusiSAE, ao Rodrigo Eisinger. Aos alunos das Cênicas pelas peças de fim de semestre. Aos flautistas amigo-professores Cesar Augusto e Leandro + pessoal do Clube da Música. E falando em Clube... agradeço aos Mil Tons e seus tons geniais e a todos que proporcionam felicidade pela Cultura.

Às árvores, aos bichos da terra (ao Buck, Gerbão, Belinha, Pintadinho, Duque, Lindinha, Tina, Liza!) aos morros, aos céus com suas nuvens, chuvas e **neblinas**, ao sol, ao fogo, à escuridão tilintada de estrelas, aos ventos... Tudo que chamo **Deus**.



*"(...) it is very probable that rain and dew are imbibed by vegetables, especially in dry seasons"*

George Hales (1731)

*"In heavy fogs, on elevated situations especially, trees are perfect alembics and no one that has not attended to such matters can imagine how much water one tree will distill in a night's time, by condensing the vapour which trickles down the twigs and boughs, so as to make the ground below quite in a float"*

Gibert White (1776)



*"Some plants in unfavoured conditions can obviously use mist or fog to augment their water supplies"*

Martin & Juniper (1970)



*"Não há dúvidas, mas há poucas evidências..."*

*Então aqui estão mais algumas...*

## Resumo da dissertação

Lima, Aline Lopes. *O papel ecológico da neblina e a absorção foliar de água em três espécies lenhosas de Matas Nebulares, SP – Brasil*. Campinas: Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2010. Dissertação (Mestrado).

Eventos de neblina constituem uma importante fonte de água em vários ecossistemas terrestres, pois molham as superfícies foliares das plantas sem aumentar significativamente o conteúdo de água no solo. A água interceptada pode escoar ou ser absorvida diretamente pelas folhas inclusive de espécies lenhosas. No entanto, pouco se sabe sobre o papel ecológico desse processo e os mecanismos e estruturas envolvidos no transporte de água do exterior para os tecidos foliares, especialmente em espécies tropicais. Nesse contexto, avaliamos as vias anatômicas envolvidas na absorção de água pelas folhas e elucidamos as consequências desse processo no desempenho ecofisiológico, crescimento e sobrevivência de três espécies lenhosas comuns em matas nebulares do sudeste brasileiro, *Drimys brasiliensis*, *Eremanthus erythropappus* e *Myrsine umbellata*.

Experimentos com água deuterada e sais traçadores apoplásticos mostraram que as espécies são capazes de obter água diretamente pelas folhas. A absorção foliar pode contribuir em até 42% do conteúdo de água das folhas em *D. brasiliensis*, que inclusive apresentou fluxo reverso de seiva e menores taxas de transpiração noturna quando expostas à neblina. A água pode difundir diretamente pelas cutículas foliares em todas as espécies. Os tricomas tectores de *E. erythropappus* e os tricomas glandulares peltados de *M. umbellata* parecem ser estruturas importantes para a absorção de água nessas espécies. Após transpor a barreira cuticular, as soluções podem difundir pelas vias apoplásticas da epiderme e do parênquima das folhas das três espécies e atingir o xilema de *E. erythropappus* e acumular nas células coletoras de *M. umbellata*. A alta concentração de compostos hidrofílicos nos tecidos foliares de *D. brasiliensis* e *M. umbellata* pode ter contribuído na retenção das soluções no mesófilo destas espécies.

A borrifação de ramos causou aumento imediato do *status* hídrico foliar nas espécies, benefício também observado em um experimento de longa duração. Após dois meses, plantas das três espécies que receberam neblina exclusivamente na parte aérea apresentaram maior potencial hídrico, fotossíntese

e condutância estomática em comparação às plantas do tratamento de seca em casa de vegetação. *D. brasiliensis* apresentou 100% de mortalidade após um mês no tratamento de seca. O conteúdo relativo de água no solo das plantas dessa espécie sob neblina manteve-se constante ao longo do experimento, indicando que a neblina pode ter sido usada como fonte de água transpirada neste período. *E. erythropappus* foi a única espécie que manteve taxas de crescimento e sobrevivência semelhantes entre os tratamentos, sendo que os benefícios da nebulização só se tornaram evidentes no final do segundo mês. O conteúdo de água no solo das plantas de *M. umbellata* foi reduzido nos tratamentos de neblina e seca, mas não observamos reduções no potencial hídrico, condutância estomática e fotossíntese. Estes dados sugerem que a absorção de água pelas folhas desta espécie causou um desacoplamento das relações hídricas foliares e das trocas gasosas em relação à disponibilidade de água no solo. Demonstramos que durante eventos de neblina, as três espécies lenhosas de matas nebulares tropicais podem absorver água diretamente pelas folhas. Este processo favorece a hidratação, o desempenho ecofisiológico, o crescimento e a sobrevivência das plantas, mesmo sob baixa disponibilidade de água no solo.

*Palavras-chave:* traçadores apoplásticos, isótopos estáveis, relações hídricas, seca, ecofisiologia, *Drimys brasiliensis*, *Eremanthus erythropappus*, *Myrsine umbellata*

## Dissertation abstract

Lima, Aline Lopes. *The ecological role of fog and foliar water uptake in three woody species from Southeastern Brazilian Cloud Forests*. Campinas: Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2010. Master Dissertation.

Fog deposition is an important water source in several terrestrial ecosystems. Fog water intercepted by the plants can run off to the soil or be absorbed by the leaves. However, very little is known about the ecological role of fog and the mechanisms and structures involved in foliar water uptake by woody species in tropical environments. In this context, we investigated the anatomical pathways involved in the process of foliar uptake of water and evaluated the consequences of this process in the ecophysiological performance, growth and survival of three common woody species from Brazilian cloud forests: *Drimys brasiliensis*, *Eremanthus erythropappus* e *Myrsine umbellata*.

Greenhouse experiments using artificial fog enriched in deuterium and labelling experiments with fluorescent apoplastic tracers demonstrated that the three species absorbed water directly through their leaf surfaces. Leaf water uptake contributed to as much as 42% of total foliar water content in *D. brasiliensis*. Fog exposition caused reversals in sap flow and reduced nighttime transpiration for this species. Water diffused directly through leaf cuticles in all species. Tector trichomes of *E. erythropappus* and glandular peltate trichomes of *M. umbellata* are important pathways for water uptake in these species. After the cuticular barrier was transposed, solutions moved through apoplast routes at the epidermis and parenchyma in all species, reaching the xylem in *E. erythropappus* and accumulating on collector cells of *M. umbellata*. The high abundance of hidrofilic compounds found on leaf surfaces of *D. brasiliensis* and *M. umbellata* may have contributed to the great retention of solution with apoplastic tracers in the mesophyll of these species.

Sprayed water on isolated branches caused an immediate increase in leaf water *status* in the three species, a benefit also observed in a long-term experiment. After two months, plants under the fog treatment improved leaf water potential, photosynthesis and stomatal conductance in relation to plants exposed to drought in a greenhouse experiment. Species responses to the treatments were different. *D. brasiliensis* had 100% mortality after a month under drought. Soil water content (SWC) of fogged plants

was constant throughout the experiment, suggesting that fog water might have been used as the main water source for transpiration during this period. *E. erythropappus* was the only species with similar growth and survival rates in all treatments and the beneficial effects of fog water was only observed after two months. For *M. umbellata*, SWC decreased substantially in the drought and fog treatments but no decrease in water potential, photosynthesis and stomatal conductance was observed. For this species, fog water deposition caused a decoupling of foliar water relations and gas exchange from soil water availability. We demonstrated that the three cloud forest woody species can absorb water directly through their leaves during fog deposition, allowing shoot rehydration and improving ecophysiological performance, growth and survival when soils are dry.

Key words: fog, drought, apoplastic routes, deuterated water, reverse rates of sap flow, *Drimys brasiliensis*, *Eremanthus erythropappus*, *Myrsine umbellata*

## ÍNDICE

<b>Nomenclatura .....</b>	<b>3</b>
<b>Lista de figuras e tabela .....</b>	<b>4</b>
<b>Introdução geral.....</b>	<b>6</b>
Referências bibliográficas.....	11
<b>Material e métodos gerais .....</b>	<b>18</b>
Área de estudo.....	18
Escolha das espécies.....	19
Figura.....	22
Referências bibliográficas.....	23
<b>CAPÍTULO I: Absorção foliar de água em três espécies lenhosas de Matas Nebulares, SP- Brasil: evidências e estruturas anatômicas .....</b>	<b>27</b>
Resumo .....	27
Material e métodos .....	34
Resultados .....	40
Discussão .....	45
Conclusões .....	55
Figuras .....	56
Referências bibliográficas.....	65
<b>CAPÍTULO II: O papel da neblina no desempenho ecofisiológico, crescimento e sobrevivência de três espécies lenhosas de Matas Nebulares, SP – Brasil .....</b>	<b>76</b>
Resumo .....	76
Introdução .....	78
Material e métodos .....	82

Resultados .....	89
Discussão .....	98
Figuras .....	113
Tabela.....	122
Referências bibliográficas.....	123
<b>Considerações finais.....</b>	<b>135</b>
Referências bibliográficas.....	140

## Nomenclatura

**A:** Taxa de Assimilação líquida de CO<sub>2</sub> ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de CO<sub>2</sub>)

**E:** Taxa de Transpiração ( $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )

**FWC:** Conteúdo de água foliar (*Foliar water content*) (%)

**gs:** Condutância estomática ( $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de H<sub>2</sub>O)

**h:** Altura (cm)

**LA:** Área foliar total estimada ( $\text{cm}^2$ )

**PAR:** Radiação Fotossinteticamente Ativa (*Photosynthetically active radiation*)  
( $\mu\text{mol f\^otons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )

**VPD:** Déficit de pressão de vapor (*Vapour pressure deficit*) (KPa)

**V:** Velocidade do fluxo de seiva (*Sap velocity*) (cm/h).

**SWC:** Conteúdo de água no solo (*Soil water content*) (%)

**WUE:** Eficiência do uso de água (*Water use efficiency: A/E*)

**$\Theta_{\text{St}}$ :** Diâmetro do caule (*Stem diameter*) (mm)

**$\delta\text{D}$ :** Composição isotópica de Deutério (em notação delta por ‰)

**$\Psi_{\text{L}}$ :** Potencial hídrico foliar (MPa)

**$\Psi_{\text{PD}}$ :** Potencial hídrico foliar de madrugada (*pre-dawn: PD*) (MPa)

**$\Psi_{\text{MD}}$ :** Potencial hídrico foliar ao meio-dia (*midday: MD*) (MPa)

## Lista de figuras e tabelas

### *Material e métodos gerais*

**Figura 1.** Dados climáticos para a região de Campos do Jordão a 1620 m de altitude de 1994 a 2008, segundo dados CIIAGRO (2009)..... 22

### *Capítulo I*

**Figura 1.** Composição isotópica do hidrogênio ( $\delta D$ , ‰) da água das folhas das três espécies..... 56

**Figura 2.** Secções transversais das folhas usadas em um ensaio com solução aquosa de Lucifer Yellow CH Dilithium salt a 1% por 24 horas nas superfícies adaxiais e abaxiais de *Drimys brasiliensis* Miers – Winteraceae, Mata Nebular (1900 m), Campos de Jordão, SP .....57-58

**Figura 3.** Secções transversais das folhas usadas em um ensaio com solução aquosa de Lucifer Yellow CH Dilithium salt a 1% por 24 horas nas superfícies adaxiais e abaxiais de *Eremanthus erytropappus* (DC.) MacLeish - Asteraceae, Mata nebular (1700 m), Campos de Jordão, SP .....59-60

**Figura 4.** Secções transversais das folhas usadas em um ensaio com solução aquosa de Lucifer Yellow CH Dilithium salt a 1% sob as superfícies adaxiais e abaxiais de *Myrsine umbellata* Mart. - Myrsinaceae, Mata Nebular (1900 m), Campos de Jordão, SP .....61-62

**Figura 5.** Velocidade do fluxo de seiva de *D. brasiliensis* (*Sap velocity*: V, cm/h) e déficit de pressão de vapor (*VPD*, KPa) ao longo dos dias (*days*) em seca do solo ..... 63

**Figura 6.** Velocidade do fluxo de seiva de *D. brasiliensis* (*Sap velocity*: V, cm/h) associada à umidade foliar (*Leaf wetness*, %) e ao déficit de pressão de vapor (*VPD*, KPa) ao longo do 14° e 15° dia em seca do solo (horários do dia, “*Time of Day*”) ..... 64

## Capítulo II

<b>Figura 1.</b> Conteúdo de água foliar (FWC em %) dos ramos submetidos ao experimento de borrifação das três espécies .....	113
<b>Figura 2.</b> Potencial hídrico foliar (MPa) dos ramos submetidos ao experimento de borrifação das três espécies .....	114
<b>Figura 3.</b> Dinâmica temporal dos parâmetros ecofisiológicos nos tratamentos de Irrigação, Seca e Neblina das três espécies submetidas à nebulização ao longo de dois meses em experimento na Casa de Vegetação, Campinas/ SP.....	115-116
<b>Figura 4.</b> Conteúdo de água no solo (Soil water content, SWC em %) por tratamento das três espécies ao longo dos dois meses de experimento na Casa de Vegetação, Campinas/ SP .....	117
<b>Figura 5.</b> Déficit de pressão de vapor (VPD em KPa) ao longo dos dois meses de experimento na Casa de Vegetação, Campinas/ SP.....	118
<b>Figura 6.</b> Parâmetros morfológicos (área foliar total estimada, diâmetro do tronco e altura) por tratamento das três espécies em relação aos valores de início e fim do experimento de longa duração .....	119-120
<b>Figura 7.</b> Número de indivíduos mortos e vivos por tratamento no final dos dois meses em experimento para a mesma classe de tamanho das três espécies e indivíduos maiores de <i>M. umbellata</i> .....	121
<b>Tabela 1.</b> Valores da ANOVA de medidas repetidas dos parâmetros do desempenho ecofisiológico do experimento de longa duração (incluindo WUE) quanto aos efeitos dos tratamentos ao longo do tempo (dois fatores: tratamento e dias) para cada espécie separadamente.....	122

## **Introdução geral**

A neblina é um fenômeno meteorológico importante para o ciclo hidrológico em vários ecossistemas terrestres (Ingraham & Matthews 1988, 1995; Cavalier & Golstein 1989; Bruijnzeel *et al.* 1993; Dawson 1998; Bruijnzeel 1990, 2002; Holder 2004, 2006; Liu *et al.* 2005; Prada *et al.* 2009; Qiu *et al.* 2010). Ela pode ser formada pelo encontro de massas de ar quentes e frias, pela formação de nuvens baixas e também pelo resfriamento noturno que forma nevoeiros (*groundfog*) (Burgess & Dawson 2004). A formação de neblina ocorre também pelos mesmos processos que formam as chuvas orográficas, que ocorrem quando os ventos úmidos se elevam e se resfriam ao encontrar uma barreira montanhosa, determinando áreas mais úmidas de um lado da montanha e mais secas no sotavento (efeito *Föhn*) (Wheeler & Mayes 1997). Nesse processo, a formação de neblina depende da direção do fluxo, da umidade, da estabilidade da massa de ar e da topografia do ambiente (Money 2000). Ao longo de um gradiente de altitude, massas de ar resfriam-se adiabaticamente cerca de 1°C a cada 100 m (Money 2000). Esse resfriamento pode atingir o ponto de formação de orvalho (com a saturação do ar), podendo formar gotículas de água sobre superfícies sólidas (Juvik & Nullet 1995) como ocorre caracteristicamente nas matas nebulares de altitude (Bruijnzeel & Proctor 1995; Holder 2004; McJannet, Wallace & Reddell 2007).

A precipitação por neblina representa uma proporção significativa no balanço hídrico e de nutrientes de florestas tropicais e subtropicais situadas em cotas mais elevadas (Bruijnzeel 1990). Esta fonte é responsável por 30 a 60% do total da água precipitada em diversos ecossistemas (Smathers 1982; Cavalier & Golstein 1989; Bruijnzeel 1990; Hutley *et al.* 1997; Dawson 1998). As gotas de neblina são produzidas conforme o tipo, duração e dinâmica dos ventos e pela área de contato da neblina com a vegetação (Ingraham & Matthews 1988; Bruijnzeel & Proctor 1995). Partículas de água de neblina (entre 1 a 40  $\mu\text{m}$ ) apresentam velocidade de queda muito baixa (menores que 5 cm/s) e por isso ficam suspensas movendo-se horizontalmente com os ventos (Prada & da Silva 2001). Dessa forma, ramos e folhas de árvores funcionam como importantes superfícies interceptadoras sendo responsáveis por 20% do total precipitado nas florestas amazônicas (Kerfoot 1968; Lloyd *et al.* 1988). Além de contribuir na hidrologia de ecossistemas, a neblina pode desempenhar um papel ecológico relevante como fonte alternativa

de água para a vegetação. A água é adsorvida nas superfícies sólidas pode evaporar (Juvik & Wullet 1995), reduzindo ou eliminando o déficit de pressão de vapor atmosférico e a transpiração de água pelas folhas (Simonin *et al.* 2009); pode escorrer para o solo e ser absorvida pelas raízes (Chaney 1981; Prada *et al.* 2009; Hutley *et al.* 1997; Diaz & Granadillo 2005) e/ou ser absorvida diretamente pelas folhas (Burgess & Dawson 2004; Breshears *et al.* 2008; Simonin *et al.* 2009; Limm *et al.* 2009).

A absorção direta de água pelas folhas supre imediatamente os tecidos aéreos enquanto que o transporte de água das raízes para o dossel pode levar até mais que um mês em espécies de grande porte (Woodward 2004; Zimmermann *et al.* 2007). A absorção foliar de água ainda é um mecanismo fisiológico pouco conhecido, mas pode ser importante para o metabolismo e sobrevivência de algumas plantas em determinados ambientes. Por exemplo, os limites de distribuição de *Sequoia sempervirens* na costa da Califórnia são definidos pela frequência e intensidade de ocorrência de eventos de neblina e pela capacidade que estas árvores têm de absorver água dessa fonte pelas folhas durante a estação seca (Burgess & Dawson 2004). A água de neblina interceptada e absorvida pelas folhas das sequoias possibilita a reidratação dos tecidos durante as secas de verão, o que possibilita maior fixação de carbono (Simonin *et al.* 2009). Nesse mesmo ecossistema, a absorção de água pelas folhas foi descrita como um mecanismo comum de aquisição de água, pois foi verificada em 80% das espécies dominantes (Limm *et al.* 2009).

Embora a entrada de água pelas folhas represente uma fração pequena de toda água utilizada diariamente, essa fração pode contribuir para a melhora no *status* hídrico da planta quando o potencial de água no solo está baixo (Grammatikopoulos & Manetas 1994; Simonin *et al.* 2009). A água absorvida pelas folhas ainda pode tornar-se uma fonte de nutrientes dissolvidos (Benzing & Pridgeon 1983; Anderson 2004; Wójcik 2004), favorecer o crescimento (Gaertner 1964; Bourcher *et al.* 1995) e reduzir a mortalidade, como em *Pinus ponderosa* (Stone 1957). Dessa forma, a capacidade de absorção de água pelas folhas confere vantagens à vegetação reduzindo os impactos negativos da seca.

Florestas alto-montanas são ecossistemas peculiares que ocorrem em regiões com formação regular de neblina, onde a vegetação pode funcionar como captadora de água

(Stadtmuller 1987; Veneklaas 1990; Hutley *et al.* 1997). No Brasil, esses ecossistemas ocorrem principalmente na Mata Atlântica, um bioma importante no contexto da biodiversidade global por sua grande heterogeneidade ambiental (Tabarelli & Mantovani 1999; Myers *et al.* 2000). A Mata Atlântica originalmente ocupava toda a região leste do território nacional em altitudes variando do nível do mar até altitudes de aproximadamente 2900 m (como no Pico da Bandeira entre MG e ES). O Estado de São Paulo apresenta regiões altas na Serra do Mar e na Serra da Mantiqueira (entre 1500 e 2800 m). Hueck (1972) registrou a ocorrência de campos de altitude e florestas alto-montanas no topo dessas serras a partir de 1200 m de altitude na Serra do Mar e 1300 m na Serra da Mantiqueira.

As matas de altitude apresentam heterogeneidade de formações vegetais, onde as matas nebulares (florestas ou matinhas nebulares) se alternam com áreas de campos, cujas áreas de transição podem ser bruscas especialmente em locais com longo histórico de ocupação humana, como em Campos do Jordão (Stafford 1999). Matas nebulares são formadas por árvores e arbustos baixos e tortuosos, entre 5 e 12 m de altura, geralmente sem estratificação característica e grande abundância e diversidade de epífitas (Hueck 1972; Walter 1986; Falkenberg & Voltolini 1995; Doumenge *et al.* 1995; Falkenberg 2003). Apresentam alto grau de endemismo biológico e várias espécies têm distribuição restrita às áreas mais frias sujeitas a neblina frequente (Falkenberg & Voltolini 1995), especialmente em altitudes superiores a 1120 m na Serra do Mar (Bertoncello 2009). Grande parte do padrão dessa biodiversidade das florestas nebulares foi moldado por episódios de contrações e expansões da vegetação durante o Pleistoceno, em resposta a flutuações climáticas (Velo, Rangel-Filho & Lima 1991; Falkenberg & Voltolini 1995). Já os campos de altitude são formações com predominância do estrato herbáceo e lenhosas de pequeno porte (Velo *et al.* 1991). Os campos também apresentam grande riqueza de espécies endêmicas e grande diversidade de Asteraceae e estão situados principalmente nas regiões serranas de Minas Gerais, ocorrendo em Campos do Jordão em áreas menores, mas com grande relevância ecológica (Safford 1999). Devido às grandes altitudes e a maior exposição às frentes polares, os campos de altitude representam os pontos mais frios do leste da América do Sul (Safford 1999).

Levantamentos florísticos nessas formações vegetais são raros, mas indicam que o dossel em matas nebulares é formado principalmente por Myrtaceae (*Siphoneugenia*, *Myrceugenia*, *Gomidesia*) e/ou *Drimys brasiliensis* (Falkenberg & Voltolini 1995; Meireles, Shepherd & Kinoshita 2008; Bertonecello 2009). O gênero *Myrsine* (*ex Rapanea*) também apresenta espécies típicas de cotas altimétricas elevadas, sendo frequente em formações alto-montanas e montanas (Meireles, Shepherd & Kinoshita 2008; Bertonecello 2009) e até dominante na Serra do Itatiaia (Segadas-Vianna 1965; Lupo & Pirani 2002; Safford 2007). Junto com *Drimys*, esse gênero é relacionado como típico de formações florestais nebulares (Safford 1999). Em áreas de campos de altitude, *Eremanthus erythropappus* (popularmente conhecida como candeia) é abundante e pode formar uma fisionomia quase florestal, conhecida como candeial (Oliveira-Filho *et al.* 2004). De acordo com Oliveira-Filho & Fluminhan-Filho (1999), o candeial surge normalmente nas áreas de transição entre florestas e campos de altitude, onde os solos tornam-se gradualmente mais rasos, formando uma área tampão contra os incêndios.

A disponibilidade de água raramente é considerada um fator limitante para o crescimento de plantas em regiões altas de montanhas tropicais (Ohsawa 1999). No entanto, efeitos microclimáticos em áreas a sotavento (Wheeler & Mayes 1997), sazonalidade da precipitação e eventos extremos de seca são bastante comuns em regiões tropicais (Oliveira *et al.* 2005). Leuschner (2000) demonstrou que nos períodos sem neblina, ambientes tropicais alpinos podem ser considerados ambientes áridos, caracterizados por uma alta demanda evaporativa. Logo, plantas de florestas alto-montana e campos de altitude podem estar sujeitas a déficits hídricos frequentes. Os eventos de neblina nestes ecossistemas poderiam minimizar o alto déficit de pressão de vapor atmosférico, reduzir a transpiração da vegetação e servir como fonte de água para as plantas (Breazeale *et al.* 1950; Yates & Hutley 1995).

Matas de altitude no sudeste brasileiro formam um cinturão alto-montano que coincide com áreas de alta frequência de neblina durante o ano (Falkenberg & Voltolini 1995). Estas áreas estão sujeitas a influência de massas de ar vindas das regiões subtropicais, temperadas e polares (Safford 1999). As massas de ar polar são muito mais intensas e numerosas entre junho e setembro, e formam fracos eventos de chuva quando colidem com as massas continentais do Atlântico-Sul (Safford 1999). Efeitos orográficos aumentam a precipitação nas regiões medianas

e altas da Serra do Mar e Mantiqueira, mas não são suficientes para manter os níveis de precipitação homogêneos nos diversos ambientes montanhosos do sudeste brasileiro. Grande parte dessas regiões montanas são caracterizadas climaticamente pela extrema sazonalidade, com verões úmidos e invernos secos (com meses com precipitação abaixo de 50 mm) com temperaturas abaixo de zero (responsáveis pelas geadas frequentes), ventos fortes e taxas de radiação altas e persistentes (Segadas-Vianna & Dau 1965). A estação seca pode durar até três meses, sendo mais intensa com o aumento da altitude e continentalidade (Nimer 1977; Safford 1999). Além disso, os eventos de El niño também causam secas severas no inverno e estão associadas com o aumento da frequência e magnitude de queimadas antropogênicas (Safford 1999). Os efeitos das secas sazonais na vegetação de campos de altitude e florestas alto-montanas podem ser minimizados pelos eventos frequentes de neblina (Segadas-Vianna & Dau 1965). Esses fatores climáticos conjuntamente influenciaram na evolução dos caracteres morfofuncionais da vegetação (Camerik & Werger 1981; Smith & Young 1987; Smith 1994).

O objetivo desse estudo foi verificar a capacidade de absorção de neblina pelas folhas como mecanismo alternativo de obtenção de água em três espécies lenhosas comuns nas matas nebulares da Mata Atlântica, *Drimys brasiliensis* Miers. (Winteraceae), *Eremanthus erythropappus* MacLeish (Asteraceae) e *Myrsine umbellata* Mart. (Myrsinaceae). Além disso, testamos a hipótese de que a absorção foliar de água pode contribuir para o desempenho ecofisiológico, o crescimento e a sobrevivência de espécies lenhosas sob condições de baixa disponibilidade de água no solo. Conduzimos o trabalho em duas linhas, apresentadas em dois capítulos:

Capítulo I. Verificamos a ocorrência de absorção foliar mediante dois experimentos: 1) nebulização exclusiva da parte aérea em câmara nebulizadora utilizando água enriquecida em isótopos de deutério; 2) aplicação de soluções contendo sais apoplásticos fluorescentes nas superfícies adaxiais e abaxiais de folhas destacadas de indivíduos em seca para verificarmos as vias de entrada de água pelas folhas das espécies. Acompanhamos também mudanças no fluxo de seiva em um indivíduo de porte arbóreo de *D. brasiliensis* sob nebulização.

Capítulo II. Investigamos a contribuição da absorção de água foliar no desempenho ecofisiológico das espécies em experimentos de curta e longa duração. O experimento de curta

duração foi realizado utilizando borrifação de ramos cortados das plantas do ambiente natural para verificar mudanças no *status* hídrico (potencial hídrico foliar) e no conteúdo de água foliar. No experimento de longa duração, acompanhamos indivíduos submetidos aos tratamentos de irrigação contínua, nebulização exclusiva da parte aérea e seca completa ao longo de dois meses utilizando câmaras de nebulização em casa de vegetação. O objetivo deste experimento foi avaliar o papel da neblina na manutenção do *status* hídrico, fotossíntese, condutância estomática, transpiração, crescimento e sobrevivência de plântulas crescendo em solo seco.

### Referências bibliográficas

- Allen C.D. & Breshears D. D. (1998) Drought-induced shift of a forest–woodland ecotone: rapid landscape response to climate variation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 14839–14842.
- Anderson B. (2005) Adaptations to foliar absorption of faeces: a pathway in plant carnivory. *Annals of Botany* 95, 757-761.
- Benzing D.H. & Pridgeon A.M. (1983) Foliar Trichomes of Pleurothallidinae (Orchidaceae): Functional Significance. *American Journal of Botany* 70, 173-180.
- Bertoncello R. (2009) *A vegetação em um gradient altitudinal no Morro do Cuscuzeiro, Ubatuba (SP): uma análise florística, fitossociológica e fitogeográfica*. Tese de mestrado. UNICAMP, Campinas/SP - Brasil.
- Boucher J.F., Munson A.D. & Bernier P.Y. (1995) Foliar absorption of dew influences shoot water potential and root growth in *Pinus strobes* seedlings. *Tree Physiology* 15, 815–823.
- Breazeale E.L., McGeorge W.T. & Breazeale J.F. (1950) Moisture absorption by plants from an atmosphere of high humidity. *Plant Physiology* 25, 413-419.
- Breshears D.D., Cobb N.S., Rich P.M., Price K.P. & Allen C.D. (2005) Regional vegetation die-off in response to global-change type drought. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 15144–15148.

- Breshears D.D., McDowell N.G., Goddard K.L., *et al.* (2008) Foliar absorption of intercepted rainfall improves woody plant water status most during drought. *Ecology* 89, 41–47.
- Bruijnzeel L.A. (1990) Hydrology of Moist Tropical Forests and Effects of Conversion: a State of Knowledge Review. IHP-UNESCO Humid Tropical Programme, Paris – França.
- Bruijnzeel L.A. (2002) Hydrology of tropical montane cloud forests: a reassessment. In *Proceedings of the Second International Colloquium on Hydrology and Water Management of the Humid Tropics* (ed. Gladwell J.S.). pp.353–383. UNESCO, Paris and CATHALAC, Panama City – Panama.
- Bruijnzeel L.A. & Proctor J. (1995) Hydrology and biogeochemistry of tropical montane cloud forests: what do we really know? In *Tropical montane cloud forests*. (eds. Hamilton L.S., Juvik J.O. & Scatena F.N.). pp.25-46. Proceedings of an international symposium. East-West Center, Honolulu/Hawaii - USA.
- Bruijnzeel L.A., Waterloo M.J., Proctor J., Kuiters A.T. & Kotterink B. (1993) Hydrological observations in montane rain forests on Gunung Silam, Sabah, Malaysia, with special reference to the "Massenerhebung" effect. *Journal of Ecology* 81, 145-167.
- Burgess S.S.O. & Dawson T.E. (2004) The contribution of fog to the water relations of *Sequoia sempervirens* (D. Don): foliar uptake and prevention of dehydration. *Plant Cell and Environment* 27, 1023-1034.
- Camerik A.M. & Werger W.J.A. (1981) Leaf characteristics of the flora of the high plateau of Itatiaia, Brasil. *Biotropica* 13, 39-48.
- Cavalier J. & Goldstein G. (1989) Mist and fog interception in elfin cloud forest in Colombia and Venezuela. *Journal of Tropical Ecology* 5, 309-322.
- Chaney W.R. (1981) Sources of water. In *Water deficits and plant growth* (ed. Koslowski T.T.) Woody plant communities Vol. VI. Academic Press, San Diego – USA.
- Dawson T.E. (1998) Fog in the California redwood forest: ecosystem inputs and use by plants. *Oecologia* 117, 476-485.

- Dias M. & Granadillo E. (2005) The significance of episodic rains for reproductive phenology and productivity of trees in semiarid regions of northwestern Venezuela. *Trees* 19, 336-348.
- Doumenge C., Gilmore D., Perez M.R. & Blockhus J. (1995) Tropical montane cloud forest: conservation status and management issues. pp. 24-37. *Ecological Studies* v. 110. Springer Verlag, New York - USA.
- Falkenberg D.B. & Voltolini J.C. (1995) The montane cloud forest in Southern Brazil. In *Tropical montane cloud forest*. (eds. Hamilton L.S., Juvik J.O. & Scatena F.N.). pp. 138-149. Springer-Verlag, New York - USA.
- Falkenberg D.B. (2003) *Matinhas nebulares e vegetação rupícola dos Aparados da Serra Geral (SC/RS), sul do Brasil*. Tese de doutorado. UNICAMP, Campinas/SP - Brasil.
- Gaertner E.E. (1964) Tree growth in relation to the environment. *The Botanical Review* 30: 393-436.
- Grammatikopoulos G. & Manetas Y. (1994) Direct absorption of water by hairy leaves of *Phlomis fruticosa* and its contribution to drought avoidance. *Canadian Journal of Botany* 72, 1805-1811.
- Holder C.D. (2004) Rainfall interception and fog precipitation in a tropical montane cloud forest of Guatemala. *Forest Ecology and Management* 190, 373–384.
- Holder C.D. (2006) The hydrological significance of cloud forests in the Sierra de las Minas Biosphere Reserve, Guatemala. *Geoforum* 37, 82–93.
- Hueck K. (1972) *As florestas da América do Sul*. Editora da Universidade de Brasília, Brasília – Brasil.
- Hutley L.B., Doley D., Yates D.J. & Boosaner A. (1997) Water balance of an Australian subtropical rainforest at altitude: the ecological and physiological significance of intercepted cloud and fog. *Australian Journal of Botany* 45, 311–329.

- Ingraham N.L. & Matthews R.A. (1988) Fog drip as a source of ground water recharge in northern Kenya. *Water Resources Research* 24, 1406-1410.
- Ingraham N.L. & Matthews R.A. (1995) The importance of fog-drip water to vegetation: Point Reyes Peninsula, California. *Journal of Hydrology* 164, 269-285.
- Juvik J.O. & Nullet D. (1995) Relationships between rainfall, cloud-water interception and canopy throughfall in a Hawaiian montane forest. In *Tropical Montane Cloud Forests* (eds. Hamilton L.S., Juvik J.O. & Scatena F.N.) (Ecological Studies 110). pp.: 165-182. Springer Verlag, New York - USA.
- Kerfoot O. (1968) Mist precipitation on vegetation. *Forest Abstracts* 29, 8-20.
- Leuschner C. (2000) Are the high elevations in Tropical Montane Arid Environments for plants? *Ecology* 81, 1425-1436.
- Limm E., Simonin K., Bothman A. & Dawson T. (2009) Foliar water uptake: a common water acquisition strategy for plants of the redwood forest. *Oecologia* 161, 449-459.
- Liu W.J., Zhang Y.P., Li H.M., Liu Y.H. (2005) Fog drip and its relation to groundwater in the tropical seasonal rain forest of Xishuangbanna, Southwest China: a preliminary study. *Water Research* 39, 787-794.
- Lloyd C.R., Gash J.H.C., Shuttleworth W.J.U., Marques F. & De O F. (1988) The measurement and modeling of rainfall interception by Amazonian rain forest. *Agric. Forest Meteorol.* 43, 277-294.
- McJannet D., Wallace J. & Reddell P. (2007) Precipitation interception in Australian tropical rainforests: II. Altitudinal gradients of cloud interception, stemflow, throughfall and interception. *Hydrological Processes* 21, 1703-1718.
- Meireles L.D., Shepherd G.L. & Kinoshita L.S. (2008) Variações na composição florística e na estrutura fitossociológica de uma floresta ombrófila densa alto-montana na Serra da Mantiqueira, Monte Verde, MG. *Revista Brasileira de Botânica* 31, 559-574.

- Money D.C. (2000) *Weather and climate*. pp. 16. Focus on geography. Nelson Thornes Ltd. – UK.
- Myers N., Mittermeier R.A, Fonseca G.A.B & Kent J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403, 853-858.
- Nimer E. (1977) Clima. *Geografia do Brasil* Vol. 3. pp. 51-89. Regido Sudeste, Fundagco Instituto de Geografia e Estatistica, Rio de Janeiro/ RJ - Brasil.
- Ohsawa M. (1984) Differentiation of vegetation zones and species strategies in the subalpine region of Mt. Fuji. *Vegetatio* 57, 15-52.
- Oliveira-Filho A.T. & Fluminhan-Filho M. (1999) Ecologia da vegetação do Parque Florestal Quedas do Rio Bonito. *Cerne* 5, 51-64.
- Oliveira-Filho A.T, Carvalho D.A., Fontes M.A., Van den Berg E., Curi N. & Carvalho W.A.C. (2004) Variações estruturais do compartimento arbóreo de uma floresta semidecídua alto-montana na chapada das Perdizes, Carrancas, MG. *Revista Brasileira de Botânica* 27, 291-309.
- Oliveira R.S., Dawson T.E, Burgess S.S.O. & Nepstad D.C. (2005) Hydraulic redistribution in three Amazonian trees. *Oecologia* 145, 354-363.
- Prada S.N. & Silva M.O. (2001) Fog precipitation on the Island of Madeira (Portugal). *Environmental Geology* 41: 384–389.
- Prada S., Sequeira M.M., Figueira C. & Silva M.O. (2009) Fog precipitation and rainfall interception in the natural forests of Madeira Island (Portugal). *Agricultural and Forest Meteorology* 149, 1179-1187.
- Qiu Y., Hong-lang X., Liang-ju Z., Sheng-cun X., Mao-xian Z., Cai-zhi L. & Liang Z. (2010) Research progress on water uptake through foliage. *Acta Ecologica Sinica* 30, 172-177.

- Safford H.D. (1999). Brazilian Páramos I. An introduction to the physical environment and vegetation of the campos de altitude. *Journal of Biogeography* 26, 693–712.
- Safford H.D. (2007). Brazilian Páramos IV. Phytogeography of the campos de altitude. *Journal of Biogeography* 34: 1-22.
- Segadas-Vianna F. (1965) Ecology of the Itatiaia Range, Southeastern Brazil. I. Altitudinal zonation of the vegetation. *Arquivos do Museu Nacional* 53, 7-30.
- Segada-Vianna F. & Dau L. (1965). Ecology of the Itatiaia range, Southeastern Brazil. II – Climates. *Arquivos do Museu Nacional* 53: 31–53.
- Simonin K.A., Santiago L.S., Dawson T.E. (2009) Fog interception by *Sequoia sempervirens* (D.Don) crowns decouples physiology from soil water deficit. *Plant Cell and Environment* 32, 882–892.
- Smathers G.A. (1982) Fog interception on four southern Appalachian mountain sites. *Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society* 98, 119–129.
- Smith A.P. & Young T.P. (1987) Tropical alpine plant ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18, 137-158.
- Smith A.P. (1994) *Introduction to tropical alpine vegetation*. Tropical alpine environments. Plant form and function (ed. Rundel P.W., Smith A.P. & Meinzer F.C.). pp. 1-19. Cambridge University Press, Cambridge.
- Stadtmüller T. (1987) *Cloud forests in the humid tropic - A bibliographic review*. United Nations University, Tokyo and CATIE, Turrialba - Costa Rica.
- Stone E.C. (1957) Dew as an ecological factor. II. The effect of artificial dew on the survival of *Pinus podenrosa* and associated species. *Ecology* 38, 414-422.
- Tabarelli M. & Mantovani W. (1999) A riqueza das espécies arbóreas na floresta atlântica de encosta no estado de São Paulo (Brasil). *Revista Brasileira de Botânica* 22, 217-233.

- Veloso H.P., Rangel-Filho A.L.R. & Lima J.C.A. (1991) *Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal*. IBGE, Rio de Janeiro - Brasil.
- Veneklaas E.J., Zagt R.J., Van Leerdam A., Van Ek R., Broekhoven A.J. & Van Genderen M. (1990) Hydrological properties of the epiphyte mass of a montane tropical rain forest. *Vegetatio* 89, 183-192.
- Walter P.L. (1986) *Vegetação e zonas climáticas*. Tratado de ecologia global. E.P.U. – Brasil.
- Waisel Y. (1958) Dew absorption by plants of arid zone. *Bulletin of the Research Council of Israel* 6D, 180-186.
- Westhoff M., Zimmermann D., Zimmermann G. *et al.* (2009) Distribution and function of epistomatal mucilage plugs. *Protoplasma* 235, 101-105.
- Wheeler D. & Mayes J. (1997) The anatomy of regional climates in the British Isles. In *Regional climates of the British Isles* (eds. Wheeler D. & Mayes J.) pp.: 23-24. 1ª edição. Routledge/New York - USA.
- Wójcik P. (2004) Uptake of mineral nutrients from foliar fertilization. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* (Special edition) 12; 201-21.
- Woodward I. (2004) Tall storeys. *Nature* 428: 807-808.
- Yates D.J. & Hutley L.B. 1995. Foliar uptake of water by wet leaves of *Sloanea woollsi* an Australian subtropical rainforest tree. *Australian Journal of Botany* 43, 157-167.
- Zimmermann D., Westhoff M., Zimmermann, G. *et al.* (2007) Foliar water supply of tall trees: evidence for mucilage-facilitated moisture uptake from the atmosphere and the impact on pressure bomb measurements. *Protoplasma* 232, 11-34.

## **Material e métodos gerais**

### *Área de estudo*

As plantas utilizadas nesse estudo foram coletadas em florestas alto-montana (nebular) ou em campos de altitude, do Parque Estadual de Campos do Jordão (PECJ) (22°43'S - 45°27'O) – SP, localizado entre 1500 e 2000 m de altitude. Como as demais regiões de florestas tropicais de altitude do sudeste brasileiro, essa região apresenta influências das massas de ar provenientes das regiões subtropicais, temperadas e polares (Safford 1999a). As massas de ar polar são muito mais intensas e numerosas entre junho e setembro e formam fracos eventos de chuva quando colidem com as massas de ar do Atlântico-Sul (Safford 1999a). Os efeitos orográficos também aumentam a precipitação nas regiões medianas e altas da Serra do Mar e da Serra da Mantiqueira. Mesmo assim, na estação seca, a precipitação média mensal pode ser inferior a 50 mm em até três meses consecutivos, o que é comum em ambientes montanhosos do sudeste, sendo a seca mais intensa quanto maior a altitude e a continentalidade (Nimer 1977; Safford 1999a).

Situada na face Sul da Serra da Mantiqueira, a região de Campos do Jordão é sazonalmente seca, com baixa precipitação durante os meses de inverno caracterizando uma estação seca bem definida, de maio a agosto (INMET 2010), como verificamos para os anos de 1994 a 2008 (CIIAGRO 2009) (Figura 1). Julho é o mês que apresenta as menores temperaturas e precipitação (Seibert *et al.* 1975; Barbosa 2006). Para o período de 1994 a 2008 a temperatura média anual foi de 14,9°C, quando o mês de julho foi, de fato, o mais frio, com média térmica mensal de 10,3°C, média mínima absoluta de 4,2°C, com frequentes quedas abaixo de zero (CIIAGRO 2009). A precipitação média anual foi 1723 mm para o período, com médias mensais de 144 mm, sendo que de junho a agosto a precipitação média mensal foi inferior a 50 mm (CIIAGRO 2009) (Figura 1). Janeiro foi o mês mais quente e chuvoso nesse mesmo período, com temperatura média de 18,1°C e precipitação média de 332,3 mm. Independente da estação, as temperaturas máximas diárias podem superar a média mensal em grande magnitude, observamos máximas em torno de 40°C em fevereiro de 2009, por exemplo. Mesmo no ano de 2009, que foi atipicamente chuvoso, tivemos uma estação mais seca, com precipitação mensal média abaixo de 50 mm de junho a agosto (a 1620 m) (CEPAGRI 2010). Eventos de veranicos,

que são períodos de estiagem prolongada com altas temperaturas e baixa umidade relativa durante o inverno, também são frequentes, especialmente em anos sob influência do El Niño (Safford 1999<sup>a</sup>; Nakagawa *et al.* 2000).

Os efeitos das secas sazonais na vegetação de campos de altitude devem ser amenizados pelos eventos de neblina orográfica frequentes durante o ano todo (Safford 1999a). Em Campos do Jordão, a frequência de formação de neblina é altíssima, o que justifica a alta umidade relativa do ar durante todo o ano (Modenesi-Gauttieri *et al.* 1998), tornando-se mais intensa durante o inverno, pois as massas de ar frio vindas do Sul não se dissolvem rapidamente (Safford 1999a). Ela ocorre em torno de 80% dos dias do ano, sendo extremamente densa no inverno (obs. pessoal). No Parque Nacional do Itatiaia, também localizado na Serra da Mantiqueira, a aproximadamente 100 km de Campos do Jordão, a neblina ocorre em 218 dias no ano, a 2199 m de altitude, e a umidade relativa do ar média mensal varia entre 65 a 90% (Segadas-Vianna & Dau 1965). Geadas também são comuns no inverno seco em Campos do Jordão, ocorrendo em torno de 40 dias ao ano a 1630 m de altitude (Segadas-Vianna & Dau 1965; Nimer 1977; Safford 1999b). Durante as coletas de campo, foram frequentes a formação de neblina (especialmente após as 15h00), grandes amplitudes térmicas ao longo do mesmo dia e altas taxas de radiação independente da estação (obs. pessoal).

#### *Escolha das espécies*

Para o estudo, escolhemos três espécies comuns nas matas nebulares da Serra da Mantiqueira que ocupam vertentes e topos de montanhas sujeitas a eventos frequentes de neblina: *Drimys brasiliensis* Miers. (Winteraceae), *Eremanthus erythropappus* MacLeish (Asteraceae), *Myrsine umbellata* Mart. (Myrsinaceae). As plantas utilizadas foram provenientes da germinação de sementes coletadas no início de 2008 em fisionomias de floresta ou de campos de altitude no PECJ entre 1500 e 1900 m. Apenas os indivíduos de *D. brasiliensis* foram removidos do subosque da mata devido à incapacidade de germinação das sementes em casa de vegetação e à grande abundância de plântulas no subosque.

*Drimys brasiliensis* Miers. (Winteraceae) (Cataia, Casca D'anta, Melambo, Canela-amarga, Capororoca-picante) é uma espécie lenhosa, geralmente arbusto ou arvoreta, podendo

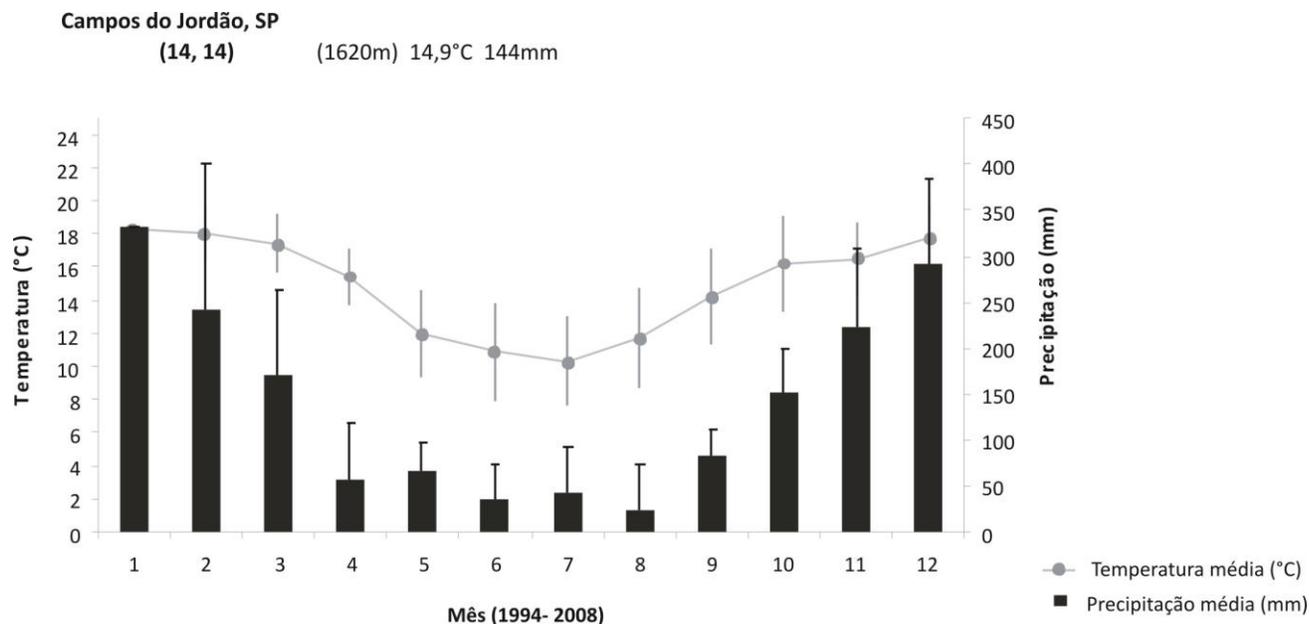
apresentar hábito arbóreo com até 20 m de altura (Trinta & Santos 1997). É heliófila, perenifólia e seletiva hidrófila (Marchiori 1997), com folhas simples, glabras, hipostomáticas e superfície abaxial esbranquiçada (Trinta & Santos 1997; Lorenzi 2002) devido à cobertura cuticular espessa, de aspecto papiloso, e à deposição de ceras (Metcalfe 1987). Esta espécie pertence ao gênero de maior distribuição geográfica da família Winteraceae (Feild, Zwieniecki & Holbrook 2000). No Brasil, sua distribuição vai da Bahia até o Rio Grande do Sul (Roderjan & Kuniyoshi 1988; Marchiori 1997; Lorenzi & Matos 2002; Abreu *et al.* 2005). *D. brasiliensis* ocorre em matas de altitude e ciliares de terrenos brejosos ou bem drenados e sua distribuição tem sido associada à disponibilidade de água, alta precipitação e alta umidade relativa (Grubb & Whitmore 1966; Grubb 1977; Lawton & Dryer 1980; Rebertus & Veblen 1993; Lorenzi & Matos 2002). Também ocorre em florestas de araucárias do planalto sul-brasileiro (Marchiori 1997), em Floresta Estacional Semidecídua (Figliolia & Piña-Rodrigues 1995; Veloso *et al.* 1997), em Floresta Ombrófila Densa Alto-Montana (Roderjan & Kuniyoshi 1988; Meireles, Shepherd & Kinoshita 2008; Bertoncetto 2009), estando entre as espécies que mais contribuem na formação de biomassa morta na Serra da Mantiqueira (Meireles *et al.* 2008). Consideramos *D. brasiliensis* um ótimo modelo para nossa investigação, pois é uma espécie indicadora de ambientes de clima úmido e frio, associada à *Araucaria* e *Podocarpus* nos processos de retração e expansão de suas distribuições conforme as flutuações climáticas do Pleistoceno (Falkenberg & Voltolini 1995; Oliveira, Behling & Pessenda 2008). Dentre as angiospermas dicotiledôneas da flora brasileira, *D. brasiliensis* pertence à ordem Canellales, a única com ausência de elementos de vasos, sendo considerada a ordem mais basal das angiospermas viventes (Metcalfe 1987; Barroso *et al.* 1999; Abreu *et al.* 2005).

*Eremanthus erythropappus* MacLeish (Asteraceae), popularmente conhecida como “candeia-da-serra” (Souza *et al.* 2003), é uma espécie lenhosa, geralmente com porte de arbustos e arvoretas, podendo apresentar hábito arbóreo, com até 10 m de altura (Rosal 2004; Chagas, Filho & Lisi 2007). É heliófila, perenifólia com folhas simples, predominantemente hipostomáticas com a superfície abaxial esbranquiçada devido à grande quantidade de tricomas (obs. pessoal). É uma espécie pioneira na formação vegetal de campos (Carvalho 1994), frequente em ambientes de altitudes mais elevadas e bordas de florestas alto-montanas (em altitudes geralmente acima dos 1500 m) especialmente na Serras da Mantiqueira e Espinhaço

(Souza *et. al.* 2003), onde o solo se classifica como cambissolo e litossolo, com rochas afloradas (Pereira 1998). Essa espécie ocorre na Argentina, Paraguai e em quase todas as regiões do Brasil, exceto na região Norte (Carvalho 1994; Pedralli, Teixeira & Nunes 1997).

*Myrsine umbellata* Mart. (Myrsinaceae) (segundo classificação sugerida em Freitas 2003; Freitas & Kinoshita 2005), é popularmente conhecida como Capororocão. É uma espécie lenhosa, geralmente de hábito arbustivo ou arvoreta, podendo apresentar porte arbóreo com mais de 20 m de altura (Freitas 2003). É heliófila, perenifólia, pioneira, seletiva higrófila, de folhas simples cartáceas, glabras, lisas, ovaladas, com distribuição alterna, dotadas de tricomas glandulares peltados irregularmente distribuídos em ambas as superfícies foliares (Lorenzi 2002; Freitas 2003). É uma das espécies da família mais amplamente distribuída, com ocorrência em diversos habitats e bastante frequente na Mata Atlântica, tanto em mata primária como em capoeiras e áreas abertas e nas matas de araucárias do sudeste paulista (Lorenzi 2002; Freitas 2003), sendo comum nas cotas altimétricas mais elevadas na região de Monte Verde na Serra da Mantiqueira (Meireles *et al.* 2008). O gênero *Myrsine* também tem sido relacionado às formações de florestas de araucária em períodos geológicos mais frios e úmidos (Oliveira, Behling & Pessenda 2008).

## Figura



**Figura 1. Dados climáticos para a região de Campos do Jordão a 1620 m de altitude de 1994 a 2008, segundo dados CIAGRO (2009).** Barras representam médias mensais de precipitação (mm) e a linha cinza as médias mensais de temperatura (°C), com os respectivos desvios padrão em linhas verticais. As informações na parte superior do gráfico referem-se ao local, número de anos de observação, altitude, temperatura média anual, precipitação mensal média.

## Referências bibliográficas

- Abreu D.C.A., Kuniyoshi Y.S. Medeiros A.C.S & Nogueira A.C. (2005) Caracterização morfológica de frutos e sementes de Cataia (*Drimys brasiliensis* MIERS. – Winteraceae). *Revista Brasileira de Sementes*, 67-74.
- Barbosa J.P.M. (2006) Utilização de método de interpolação para análise e espacialização de dados climáticos: o SIG como ferramenta. *Caminhos de Geografia* 7, 85-96.
- Barroso G.M., Morim M.P., Peixoto A.L. & Ichaso C.L.F. (1999) *Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas*. 443p. UFV, Viçosa/MG – Brasil.
- Bertoncello R. (2009) *A vegetação em um gradient altitudinal no Morro do Cuscuzeiro, Ubatuba (SP): uma análise florística, fitossociológica e fitogeográfica*. Tese de mestrado. UNICAMP, Campinas/SP - Brasil.
- Carvalho P.E.R. (1994) *Espécies florestais brasileira: recomendações silviculturais, potencialidade e uso da madeira*. pp.640. EMBRAPA-CNPQ: Brasília Brasil.
- CEPAGRI (Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura) (2010). Disponível em: <[http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima\\_muni\\_111.html](http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima_muni_111.html)>. Acesso em maio 2010.
- Chagas M.P, Filho M.T. & Lisi C.S. Caracterização macro e microscópica da madeira de candeia (*Eremanthus erythropappus*, Asteraceae). *Revista Brasileira de Biociências* 5, 156–158.
- CIAGRO (Centro Integrado de Informações Meteorológicas) (2009) Disponibilizado pela administração do Parque Estadual de Campos de Jordão em julho 2009.
- Falkenberg D.B. & Voltolini J.C. (1995) The montane cloud forest in Southern Brazil, p.: 138-149. In *Tropical montane cloud forest*. (Eds. Hamilton, L.S., Juvik, J.O. & Scatena F.N.). Springer-Verlag, New York/USA.
- Field T.S., Zwieniecki M.A & Holbrook N.M. (2000) Winteraceae Evolution: An Ecophysiological Perspective. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 87: 323-334.

- Figliolia M.B. & Piña-Rodrigues F.C.M. (1995) Manejo de sementes de espécies arbóreas. IF/São Paulo. *Série registros* 14, 1-56.
- Freitas M.F. (2003) Estudos taxonômicos das espécies de *Myrsine* L. (Myrsinaceae) nas regiões sudeste e sul do Brasil. pp.50-83. Tese de doutorado. pp.15-173. UNICAMP, Campinas/SP – Brasil.
- Freitas M.F. & Kinoshita L.S. (2005) Novas espécies de *Myrsine* L. para o Brasil. *Rodriguésia* 56, 67-72.
- Grubb P.J. & Whitmore T.C. (1966) A Comparison of Montane and Lowland Rain Forest in Ecuador: II. The Climate and its Effects on the Distribution and Physiognomy of the Forests. *The Journal of Ecology* 54, 303–333.
- Grubb P.J. (1977) Control of Forest Growth and Distribution on Wet Tropical Mountains: with Special Reference to Mineral Nutrition. *Annual Review of Ecology and Systematics* 8, 83–107.
- INMET (Instituto Nacional de Meteorologia) (2010). Disponível em: <<http://www.agritempo.gov.br/agroclima/pesquisaWeb>>. Acesso em maio de 2010.
- Lawton R.O. & Dryer V. (1980) The vegetation of the Monteverde Cloud Forest Reserve. *Brenesia* 18, 101-116.
- Lorenzi H. (2002) *Árvores brasileiras: manual de identificação de plantas arbóreas nativas do Brasil*. pp. 268 e 368. 4ªed. Editora Plantarum, São Paulo/ SP – Brasil.
- Lorenzi H. & Matos F.J.A. (2002) Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas. 512p. Instituto Plantarum, Nova Odessa/SP – Brasil.
- Marchiori J.N.C. (1997) *Dendrologia das angiospermas: das magnoliáceas às flacurtiáceas*. 271p. UFSM/Santa Maria/RS – Brasil.

- Meireles L.D., Shepherd G.L. & Kinoshita L.S. (2008) Variações na composição florística e na estrutura fitossociológica de uma floresta ombrófila densa alto-montana na Serra da Mantiqueira, Monte Verde, MG. *Revista Brasileira de Botânica* 31, 559-574.
- Metcalf C. R. (1987) *Anatomy of the dicotyledons: Magnoliales, Illiciales & Laurales* (sensu Armen Takhtajan). 2ªed. Vol.III. Claredon Press Oxford, New York - USA.
- Modenesi-Gauttieri M. C. & Nunes L. H. (1998) Processos geocriogênicos quaternários nas cimeiras da Mantiqueira, com considerações climáticas. *Revista IG São Paulo* 19, 19-30.
- Nimer E. (1977) Clima. *Geografia do Brasil* Vol. 3. pp. 51-89. Regido Sudeste, Fundagco Instituto de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro/ RJ - Brasil.
- Oliveira M.A.T, Behling F. & Pessenda L.C.R. (2008) Late-Pleistocene and mid-Holocene environmental changes in highland valley head areas of Santa Catarina state, Southern Brazil. *Journal of South American Earth Sciences* 26, 55-67.
- Pedralli G., Teixeira M.C.B. & Nunes Y.R. (1997). Estudos sinecológicos sobre a candeia (*Vanillosmopsis erythropappa* Schult. BIP) na estação ecológica do Tripui, Ouro Preto, MG. *Revista Árvore* 21, 301-306.
- Pereira A.A.S. (1998) Nutrição e adubação da candeia (*Vanillosmopsis erythropappa*). pp.22. Monografia de graduação em engenharia florestal. UFLA, Lavras/MG - Brasil.
- Rebertus A.J. & Veblen T.T. (1993) Structure and treefall gap dynamics of old-growth *Nothofagus* forests in Tierra del Fuego, Argentina. *Journal of Vegetation Science* 4, 641-654.
- Roderjan C.V. & Huniyoshi Y.S. (1988) *Macrozoneamento florístico da área de proteção ambiental APA – Guaraqueçaba*. pp.25-26. Fupef – série técnica 15, Curitiba/ PR - Brasil.
- Rosal L.F. (2004) Germinação, indução de calor, micropropagação e anatomia foliar da candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) Mac Leish). Tese de Mestrado. UFLA, Lavras/MG - Brasil.

- Safford H.D. (1999a). Brazilian Páramos I. An introduction to the physical environment and vegetation of the campos de altitude. *Journal of Biogeography* 26, 693–712.
- Safford H.D. (1999b) Brazilian paramos II. Macro- and mesoclimate of the campos de altitude and affinities with high mountain climates of the tropical Andes and Costa Rica. *Journal of Biogeography* 26, 713-737.
- Segadas-Vianna F. & Dau L. (1965). Ecology of the Itatiaia range, Southeastern Brazil. II – Climates. *Arq. Museu Nacional* 53: 31-53.
- Seibert P., Negreiros O.C., Bueno, R.A., Emmerich W. *et al.* (1975) Plano de manejo do Parque Estadual Campos de Jordão. *Boletim Técnico do Instituto Florestal* 19, 1-148.
- Souza O.V.S., Oliveira M.S., Rabello S.V., Cunha R.O., Costa B.L.S. & Leite M.N. (2003) Estudo farmacognóstico de galhos de *Vanillosmopsis erythropappa* Schult. Bip.-Asteraceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 13, 50-53.
- Trinta E.F. & Santos E. (1997) *Flora Ilustrada Catarinense*. 19p. BR Petrobras, Itajaí/SC - Brasil.

## **CAPÍTULO I: Absorção foliar de água em três espécies lenhosas de Matas Nebulares, SP- Brasil: evidências e estruturas anatômicas**

### **Resumo**

A chuva é considerada a principal fonte de água para espécies que ocorrem em florestas tropicais. Entretanto, em habitats sujeitos a déficits hídricos no solo, fontes alternativas de água como neblina ou orvalho podem ser importantes, podendo, inclusive, ser absorvida diretamente pelas folhas. Matas nebulares são caracterizadas por frequentes eventos de neblina e secas esporádicas e sazonais. No entanto, pouco se sabe sobre a capacidade de absorção de água da neblina pelas folhas de espécies lenhosas em ambientes tropicais. Este estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de absorção pelas folhas e as vias de entrada de água em três espécies lenhosas comuns nas matas de altitude do sudeste brasileiro: *Drimys brasiliensis*, *Eremanthus erythropappus* e *Myrsine umbellata*. Por meio de experimentos de nebulização artificial com água enriquecida isotopicamente e aplicações de soluções contendo sais fluorescentes traçadores de vias apoplásticas nas superfícies foliares, nós demonstramos que as três espécies estudadas são capazes de absorver água pelas superfícies adaxial e abaxial. A água de neblina absorvida pelas folhas de *D. brasiliensis* representou até 42% do conteúdo foliar de água, causou fluxo reverso na seiva e redução na intensa transpiração noturna dessa espécie. Água difundiu diretamente pela cutícula em ambas superfícies foliares para todas as espécies. Tricomas tectores de *E. erythropappus* e tricomas glandulares de *M. umbellata* podem ser importantes vias de entrada de água nessas espécies. Após atravessar a cutícula, as soluções percorreram vias apoplásticas epidérmicas e parenquimáticas, atingindo o xilema em *E. erythropappus* e acumulando-se nas paredes das células coletoras de *M. umbellata*. A grande retenção das soluções traçadoras pelas vias apoplásticas do mesofilo pode estar relacionadas à abundância de compostos hidrofílicos nas folhas, especialmente em *D. brasiliensis* e *M. umbellata*, como observamos na caracterização anatômica.

Palavras-chave: cutícula, tricomas, vias apoplásticas, células coletoras, água deuterada, fluxo reverso, *Drimys brasiliensis*, *Eremanthus erythropappus*, *Myrsine umbellata*

## Abstract

Rainfall is considered the main water source for plants in tropical forests. Nevertheless, alternative water sources such as fog and dew can play an important ecological role in habitats with seasonal water deficits, especially because some plants can absorb water directly through their leaves. Cloud forests are characterized by frequent fog formation all the year long, even during periods of sporadic and seasonal droughts. However, there is scarce information about the process of direct fog water uptake through leaves of woody species in tropical environments. The objective of this study was to assess the potential of foliar water uptake and the anatomical pathways involved in this process on three common woody species from Brazilian cloud forests: *Drimys brasiliensis*, *Eremanthus erythropappus* e *Myrsine umbellata*. We conducted greenhouse experiments using artificial fog enriched in deuterium isotopes and labelling experiments with fluorescent apoplastic tracers. We demonstrated that the three species can absorb water directly through their adaxial and abaxial leaf surfaces. Leaf water uptake contributed to 42% of total foliar water content in *D. brasiliensis*. Fog exposition also caused reversals in sap flow and reduced nighttime transpiration for this species. Water can diffuse directly through leaf cuticles in both leaf surfaces for all species. Tector trichomes of *E. erythropappus* and glandular peltate trichomes of *M. umbellata* can be important pathways for water uptake in these species. After the cuticular barrier is transposed, solutions can move through apoplast routes at epidermis and parenchyma reaching the xylem in *E. erythropappus* and accumulating on collector cell walls of *M. umbellata*. The great retention of solution with apoplastic tracers along the mesophyll could be related to the high abundance of hidrofilic compounds over the leaf surfaces, observed especially in *D. brasiliensis* and *M. umbellata*.

Key words: cuticle, trichomes, apoplastic routes, collector cells, deuterated water, reverse rates of sap flow, *Drimys brasiliensis*, *Eremanthus erythropappus*, *Myrsine umbellata*

## Introdução

A folha é o órgão mais eficaz para realizar trocas gasosas, sendo a fotossíntese sua função primordial (Taiz & Zeiger 2006). No entanto, quando expostas a atmosferas saturadas, folhas também podem absorver umidade depositada sobre suas superfícies melhorando seu *status* hídrico mesmo que não ocorra a hidratação do solo (Haberlandt 1965; Breshears *et al.* 2008; Simonin, Santiago & Dawson 2009). Embora a absorção foliar de água tenha sido demonstrada para espécies nativas em vários ecossistemas, pouco se sabe sobre o significado ecológico desse processo. Esse fenômeno é frequente onde há ocorrência de eventos responsáveis pela formação de uma atmosfera saturada em torno da vegetação e/ou deposição de água sobre as superfícies foliares (Stone 1957; Leyton & Armitage 1968; Ourcival, Berger & Le Floch'H 1994; Grammatikopoulos & Manetas 1994; Bourcher *et al.* 1995; Yates & Hutley 1995; Munné-Bosch, Nogues & Alegre 1999; Munné-Bosch & Alegre 1999; Gouvra & Grammatikopoulos 2003; Burgess & Dawson 2004; Oliveira *et al.* 2005; Breshears *et al.* 2008; Zimmermann *et al.* 2007; Simonin *et al.* 2009; Limm *et al.* 2009). Entretanto a ocorrência desse processo em matas nebulares e as vias de entrada de água para o interior da folha ainda não foram descritas para nenhuma espécie lenhosa de florestas tropicais.

A entrada de água pelas folhas pode ocorrer pela cutícula, mesmo que esta estrutura seja vista como uma barreira físico-química extremamente eficiente contra perda de água (Dybing & Currier 1961; Grammatikopoulos & Manetas 1994; Yates & Hutley 1995; Gouvra & Grammatikopoulos 2003; Anderson 2005; Widholzer 2005; Mastroberti & Mariath 2008; Schönherr 2006; Kerstiens 2006). Na realidade, estudos recentes têm revelado que a cutícula é uma estrutura complexa e dinâmica, capaz de modificar suas propriedades biofísicas e alterar sua permeabilidade em resposta a mudanças nas condições ambientais (Schreiber *et al.* 2001; Schönherr 2006). A composição heterogênea da cutícula pode apresentar regiões mais permeáveis, ricas em poros ou vias (possivelmente canais cuticulares anastomosados) pelas quais pequenas partículas podem se mover (Martin & Juniper 1970; Miller 1986). Essas estruturas podem apresentar composição química apolar e polar para o transporte de soluções com diferentes propriedades químicas. Os poros e vias apolares são formados por ceras para absorção de compostos hidrofóbicos (Schreiber *et al.* 2001; Kerstiens 2006) e os poros polares (*aqueous*

*pores*) são estruturas dinâmicas bastante permeáveis a água e solutos iônicos (Schönherr 2000, 2006; Schönherr, Fernández & Schreiber 2005; Schlegel, Schönherr & Schreiber 2005; Kerstiens 2006; Schönherr 2006; Ohruit *et al.* 2007). Os poros polares podem formar verdadeiras vias contínuas de difusão de soluções polares e podem apresentar uma diversidade de arranjos e preenchimentos, por exemplo, por pectina (Lyshede 1978), carboidratos (Hoch 1979) ou proteínas (Bregman & Graven 1997). Inclusive, alguns poros polares são revelados apenas na presença de água (Schönherr 2006) e podem ser permanentes e/ou eventuais, aumentando a permeabilidade cuticular em resposta ao aumento da umidade relativa do ar (Chamel *et al.* 1991; Montelth 1995; Kerstiens 1996, 2006; Hoad *et al.* 1997; Schreiber *et al.* 2001; Schreiber *et al.* 2001, 2005; Schönherr 2006). A permeabilidade aumenta em função dos ajustes na matriz polimérica de cutina não-esterificada que apresenta vários grupos carboxila livres, configurando uma estrutura de polieletrólitos muito sensíveis à umidade (Van Hove & Adema 1996; Schreiber *et al.* 2001). Como resultado da adsorção das moléculas de água, os domínios polares das barreiras ao transporte na membrana de matriz polimérica distendem, possivelmente através do fluxo de íons, e conseqüentemente o tamanho e/ou o número de poros polares aumentam (Schreiber *et al.* 2001). Dessa forma, os poros polares cuticulares podem desempenhar um papel ecológico importante na retenção de água quando o ar está seco e na absorção de água por folhas e frutos durante neblina e chuvas, como sugeriu Schönherr (2006).

A absorção de água também pode ocorrer através de ectodesmas que são caracterizados pelo prolongamento protoplasmático delimitados por elementos da parede celular da epiderme que conduzem soluções através das camadas cuticulares para os tecidos mais internos (Franke 1967; Martin & Juniper 1970; Eichert & Burkhart 2001; Widholzer 2005; Schönherr 2006). Os mecanismos envolvidos na absorção pelos ectodesmas podem ser passivos (Martin & Juniper 1970) ou podem ser controlados por processos metabólicos (Franke 1961). No entanto, a dinâmica do funcionamento das vias absorptivas, de forma geral, ainda é pouco conhecida (Widholzer 2005).

Uma vez ultrapassada a barreira cuticular, o movimento da água pode ocorrer por três principais vias (*cf.* Steudle & Peterson 1998): apoplásticas, simplásticas (pelos plasmodesmas celulares) e transmembranas (pelas membranas celulares). A via apoplástica ocorre através do

apoplasto constituído pela ligação de todas as paredes celulares, lamela média (ou mediana) e espaços intercelulares. O espaço apoplástico forma uma via contínua para o transporte de solutos através das paredes celulares, muito mais rápido do que a via simplástica (Meidner & Sheriff 1976; Canny 1993). A sacarose em solução aquosa, por exemplo, percorre o mesofilo foliar e atinge o floema rapidamente através do apoplasto (Canny 1993). Ao movimentar-se através do apoplasto, a água não atravessa nenhuma membrana, por isso os sais fluorescentes marcadores de vias apoplásticas podem ser visualizados nas regiões de contato entre células. As paredes celulares, em geral, restringem as taxas de difusão de solutos, variando conforme a natureza do tecido (Canny 1990). A epiderme adaxial das folhas de trigo, por exemplo, apresentaram taxas de difusão de sais marcadores de via apoplástica muito maiores do que a epiderme abaxial (Baker & Hunt 1981; Canny 1990). Isso porque há vias nanométricas específicas em diferentes regiões das paredes celulares nas quais os traçadores podem difundir até encontrar os locais de cruzamento para porções simplásticas (denominadas *flume*), onde os sais traçadores podem ficar acumulados (*sumps*) (Canny 1990). A absorção pode ocorrer pelas paredes das células epidérmicas preferencialmente naquelas localizadas acima dos feixes vasculares (Dybing & Currier 1961). A água pode ser retida em células mucilaginosas (Mastroberti & Mariath 2008) ou difundir por todo o mesofilo foliar (Gouvra & Grammatikopoulos 2003; Widholzer 2005).

A participação dos estômatos no processo de absorção de água foliar ainda é bastante controversa (Schlegel *et al.* 2005; Widholzer 2005; Eichert *et al.* 2008; Burkhart 2010), embora já verificada (Dybing & Currier 1961; Eichert & Burkhart 2001; Eichert *et al.* 2008; Burkhart 2010). É possível que estruturas comumente associadas aos estômatos, como os poros polares presentes sobre células-guarda, favoreçam a absorção (Franke 1964; Schlegel *et al.* 2005). Além disso, camadas e *plugs* mucilaginosos epistomáticos podem estar envolvidos na absorção direta de umidade pela presença de cátions di-(multi-)valentes que conferem proteção às folhas na perda excessiva de pressão de turgor em baixas umidades relativas (Westhoff *et al.* 2009). *Plugs* epistomáticos ricos em compostos ácido-mucopolissacarídico em *Drimys winteri*, além de aumentarem a resistência à transpiração, facilitam a absorção de água da neblina, chuva ou mesmo da evaporação do solo e transpiração de folhas localizadas em estratos mais baixos (Westhoff *et al.* 2009). *Plugs* estomáticos podem mediar a absorção foliar suprindo os tecidos

aéreos de forma imediata, em contraste ao transporte das raízes às folhas, que pode levar muitos dias ou até um mês em árvores muito altas (Westhoff *et al.* 2009). A densidade de *plugs* pode variar sazonalmente e quanto maior a densidade dos *plugs*, maior o suprimento de água atmosférica de forma direta em várias espécies (Westhoff *et al.* 2009).

Outras estruturas podem mediar a entrada de água pelas folhas. Hidatódios epidérmicos, que representam uma abertura da cutícula e da epiderme envolvidos no processo de gutação (Curtis 1943; Wood 1970; Metcalfe & Chalk 1983), podem obter água do orvalho e neblina em espécies de *Crassula* (Fahn Werker & Ben-Zur 1979; Martin & von Willert 2000). Tricomas também podem absorver soluções em virtude de atividade osmótica não apenas em briófitas e pteridófitas, mas também em muitas fanerófitas (Ennis & Boyd 1946; Haberlandt 1965; Katz *et al.* 1989; Boyce *et al.* 1991; Jagels 1991; Schreider *et al.* 2001; Schlegel *et al.* 2005; Ohruit *et al.* 2007).

Tricomas com capacidade de absorção estão presentes em diversas espécies epífitas, carnívoras, poiquiloídricas, e de ambientes xéricos, e apresentam grande diversidade estrutural: simples, capitados, peltados, escamosos, uni ou multicelulares e glandulares (Haberlandt 1965; Martin & Juniper 1970; Lyshede 1978; Benzing *et al.* 1976; Pridgeon 1981; Benzing & Pridgeon 1983; Fahn 1986, 1990). Os tricomas glandulares geralmente apresentam células basais com paredes intensamente cutinizadas e suberizadas nas células-base que previnem o fluxo de soluções pelo apoplasto (*stalk cells*) (Fahn 1986, 1990). Esses tricomas são geralmente relacionados à secreção de compostos, mas também podem absorver solutos (Fahn 1986, 1990). A influência dos tricomas nos processos absorptivos varia entre espécies e pode ser resultante das diferentes propriedades químico-estruturais dos tricomas (Fahn 1986). Além disso, uma grande densidade de poros polares (*aqueous pores*) (Schlegel *et al.* 2005; Schönherr 2006; Ohruit *et al.* 2007) e ectodesmas (Franke 1961; Schönherr 2006) já foram encontrados em tricomas de muitas espécies, especialmente na região da base. Embora alguns tricomas já tenham sido relacionados à absorção, ainda não há um entendimento completo sobre o seu papel funcional nos processos absorptivos, e sim apenas algumas evidências de sua grande plasticidade estrutural e dinamismo. Mesmo camadas suberificadas consideradas hidrofóbicas, podem apresentar microcanais que se expandem quando em atmosfera saturada promovendo a absorção pelas porções hidrofílicas

(como substâncias pécticas) e se fecham quando em condições de seca, minimizando a transpiração excessiva (Lyshede 1979). Em *Passiflora incarnata* e *Plantago major* foi observada uma maior densidade de ectodesmas na parede das células epidérmicas no período noturno e retração no período diurno, indicando uma variação sazonal e mesmo circadiana nas propriedades absorptivas de tricomas (Metcalf 1987).

De fato, são diversos os mecanismos e as variáveis que podem influenciar na aquisição de água pelas folhas. Mas independente das vias, quando a água atinge o interior foliar se difunde muito mais facilmente do que os fotoassimilados, que continuamente atingem o floema pelas vias apoplásticas foliares (Meidner & Sheriff 1976; Canny 1990). Sendo absorvida, a água foliar pode melhorar o *status* hídrico, preenchendo os feixes vasculares e tamponando o sistema vascular contra processos de cavitação por seca (Zimmermann *et al.* 2007). Além disso, a água interceptada e absorvida pelas folhas pode ser redistribuída para outros tecidos através da mudança na direção do fluxo de seiva no xilema (Burgess & Dawson 2004). A quantidade de água absorvida pelas folhas de *Sequoia sempervirens* durante eventos de neblina é baixa, mas é suficiente para provocar o fluxo reverso da seiva, melhorando o *status* hídrico de toda a planta, inclusive na região de contato radicular com o solo (Burgess & Dawson 2004).

Apesar das evidências de absorção foliar de água, os estudos que descrevem estruturas anatômicas e mostram sua função em um contexto ecológico são raros (Qiu *et al.* 2010). Com o presente trabalho pretendemos investigar a ocorrência da absorção de água pelas folhas e as estruturas envolvidas em espécies lenhosas de matas de altitude do sudeste brasileiro, sujeitas a eventos frequentes de neblina. É possível que as folhas de espécies lenhosas de matas nebulares possam absorver a água depositada nas suas superfícies quando expostas a seca do solo, diretamente pela cutícula ou por estruturas específicas como tricomas. Assim, temos como objetivos: 1. avaliar a capacidade de absorção de água pelas folhas em três espécies comuns em matas nebulares: *Drimys brasiliensis* (Winteraceae), *Eremanthus erythropappus* (Asteraceae) e *Myrsine umbellata* (Myrsinaceae), e 2. elucidar as estruturas foliares envolvidas na absorção de água nessas espécies. Para isso, realizamos dois experimentos: nebulização com água deuterada, onde o enriquecimento da composição da água foliar foi usado como evidência da absorção de água da neblina; uso de soluções contendo sais fluorescentes traçadores de via apoplástica que

possibilitam reconhecer possíveis vias de entrada e a deposição posterior da solução (Dybing & Currier 1961; Katz *et al.* 1989; Gouvra & Grammatikopoulos 2003; Widholzer 2005; Cutler, Botha & Stevenson 2008; Mastroberti & Mariath 2008). Complementarmente acompanhamos mudanças na direção e magnitude do fluxo de seiva em *D. brasiliensis* usando o método de pulsos de calor (Burgess & Dawson 2004), para verificar os efeitos da nebulização exclusivamente da parte aérea como evidência da absorção em um indivíduo de porte arbóreo submetido à seca do solo em casa de vegetação.

## **Material e métodos**

### *Caracterização anatômica das espécies*

As lâminas histológicas para as análises anatômicas foram preparadas no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia vegetal (IB/ UNICAMP) com folhas maduras e completamente expandidas de cada espécie fixadas em FAA e FNT. O material permaneceu em solução FAA 50 (formalina, ácido acético, álcool etílico 50% 1:1:18 v/v) por 24h sob vácuo e estocadas em álcool 70% (Johansen 1940); e em solução FNT tampão fosfato (formalina neutra tamponada; tampão fosfato, formalina 9:1 v/v) por 48h sob vácuo, passando por oito lavagens em água destilada a cada duas horas, e em seguida, em álcool 30%, 50% e 70% (Clark 1973).

A porção mediana da lâmina foliar, entre a nervura central e a borda, foram incluídas em resina plástica (*Historesin*®, *Leica*), seguindo as recomendações do fabricante, seccionadas em micrótomo rotativo e coradas com Azul de Toluidina (O'Brien, Feder & McCully 1964, O'Brien & McCully 1981). Para detecção de pectinas ácidas hidrofílicas, lipídios totais, compostos fenólicos simples e compostos polissacarídicos utilizamos, respectivamente, Vermelho de Rutênio (Johansen 1940, Widholzer 2005), Sudam Black (Pearse 1980), Cloreto Férrico (Johansen 1940) e Reação ao Ácido Periódico de Schiff (Reação PAS) (McManus 1948).

Para a análise da superfície foliar em microscopia eletrônica de varredura fixamos a região mediana do limbo (sem a nervura) em Solução de Karnovsky (Karnovsky 1965) e FNT (formalina neutra tamponada), posteriormente desidratadas em série etílica e secas pelo método do ponto crítico com CO<sub>2</sub>. Após o ponto crítico, as superfícies adaxial e abaxial foram fixadas

em solução de Karnovsky e metalizadas com ouro coloidal por 220 segundos. A análise e o registro eletromicrográfico foi realizado ao microscópio eletrônico de varredura *JEOL-JSM5800LV* no Laboratório de Microscopia Eletrônica (IB/ UNICAMP), sob responsabilidade da Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder.

### *Experimentos para verificar a absorção foliar de água*

#### 1. Experimento de marcação por água deuterada

Para quantificar a importância da umidade foliar noturna no *status* hídrico das plantas, comparamos o potencial hídrico e a composição isotópica do hidrogênio da água foliar de plantas expostas e não expostas à neblina em casa de vegetação. Para isso, utilizamos nas nebulizações água enriquecida por óxidos de deutério (*Cambridge Isotope Lab., Inc. Andover, MA/USA*) com composição isotópica bastante distinta da água comumente usada na irrigação. Quanto mais distintas isotopicamente, maior a precisão para a determinação do total de água utilizado de cada fonte (Phillips & Gregg 2001). Os valores isotópicos são expressos em notação padronizada delta (partes por mil ou ‰) relativo ao padrão V-SMOW (*Vienna Standard Mean Ocean Water*) (Ehleringer & Dawson 1992). Para determinar a proporção de água nas folhas que advêm da água nebulizada *versus* água do solo usamos o modelo de mistura *IsoError* (Phillips & Gregg 2001).

Doze indivíduos de *D. brasiliensis* e *M. umbellata* e dezoito de *E. erythropappus*, provenientes do experimento conduzido em longo prazo em casa de vegetação (Capítulo II) ficaram sete dias sem receber irrigação antes de iniciarmos o experimento. O vaso de cada planta foi encoberto com plástico e isolado por parafilme para evitar a entrada da água no solo. Esses indivíduos foram separados de forma pareada a fim de criar dois lotes homogêneos, um para compor o tratamento de exposição à neblina enriquecida em Deutério (Tratamento D) e outro para o tratamento controle (CT). Antes do início do experimento, às 17h30, coletamos de duas a oito folhas maduras, para verificar a composição isotópica da água foliar antes de iniciar os tratamentos. Essas folhas foram armazenadas em tubos plásticos, vedados por parafilme e mantidos em freezer a -20°C. Também medimos o potencial hídrico foliar de uma folha antes e

depois do tratamento de cada indivíduo com uma câmara de pressão, Bomba de Scholander (*Model 1000, PMS, USA*) (Scholander *et al.* 1965).

As plantas a serem nebulizadas (Tratamento D) foram assistematicamente distribuídas em uma câmara de nebulização montada em estrutura de PVC (1,5 X 1,0 X 0,78 m) para criar uma atmosfera saturada. Para a nebulização, utilizamos um umidificador ultra-sônico que emite 80% de partículas de água menores que 10 micras por processo de cavitação por som (*Waterclear Premium, Soniclear, SP- Brasil*). A exposição à neblina durou 12 horas durante a noite e a água enriquecida apresentava uma composição isotópica de deutério ( $\delta D$ ) de  $668,8 \pm 1,2\%$  (Média  $\pm$  Desvio Padrão).

No interior da câmara de nebulização, instalamos um sensor de umidade foliar acoplado a um armazenador de dados (*Onset HOBO Micro Station Data logger - Modelo H21-002*), para monitorar a formação imediata da película de água sob as folhas após o início da nebulização. Esse procedimento assegurou que não houve influência do efeito da difusão contrária (no sentido atmosfera-folha) do vapor de água do ar no enriquecimento da composição isotópica da água foliar (Limm *et al.* 2009). A saturação da lâmina foliar pela umidade depositada atingiu valores de 100% em menos de cinco minutos de exposição à nebulização no experimento, não havendo tempo hábil para uma “contaminação” da água foliar meramente por difusão da água atmosférica para o interior foliar.

Às 7h30 do dia seguinte coletamos de duas a oito folhas dos mesmos indivíduos para análise da composição isotópica de deutério da água foliar ( $\delta D$ ) e medimos o potencial hídrico. Para remover a água adsorvida, lavamos todas as folhas com a água utilizada na irrigação das plantas controle que apresentava  $\delta D = -44,45 \pm 0,66\%$  (Média  $\pm$  Desvio Padrão) (adaptado de Limm *et al.* 2009). Após lavá-las, secamos as folhas em papel toalha e pano de algodão antes de armazená-las em tubos plásticos vedados por parafilme. Os tubos foram mantidos em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a extração de toda água foliar por destilação criogênica a vácuo (Ehleringer, Roden & Dawson 2000) no Laboratório de Ecologia Isotópica, CENA/ USP - Piracicaba.

A análise da composição isotópica de deutério foi realizada no Centro de Pesquisas Geocronológicas (CPGeo/ USP, São Paulo) através de um espectrômetro de massa *DeltaPlus*

*Advantage (Thermo Finningan)*. O erro intrínseco das análises é de -0,5%. O volume de água de dezessete amostras foi insuficiente para as análises no espectrômetro e água com composição isotópica conhecida foi adicionada para obtenção do volume ideal. Comparamos a composição isotópica da água foliar (expressa como valores  $\delta D$  com unidade de ‰) e os potenciais hídricos dos indivíduos submetidos ao tratamento de nebulização (D) e de indivíduos controle, sem nebulização (CT). Para possibilitar verificar o efeito da nebulização na composição isotópica da água foliar ( $\delta D$ ) e no potencial hídrico foliar, criamos duas categorias em cada um dos tratamentos em função do período da amostragem: a noite, antes de iniciar o experimento (*Before*) e pela manhã, depois da exposição ou não à neblina (*After*).

Os dados da composição isotópica de hidrogênio e de potencial hídrico das três espécies não apresentaram distribuição normal pelo Teste de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk ( $p < 0,05$ ). A maior parte dos dados não apresentou homocedasticidade dos resíduos, considerando as variâncias entre os tratamentos (com  $p > 0,05$  pelo Teste de Bartlett). As transformações testadas (logarítmica, exponencial, arcoseno, seno) não foram adequadas para a normalização da maior parte dos dados e assim, padronizamos as análises pelo método não paramétrico *Kruskal Wallis* (KW), seguido do Teste Tukey para reconhecer quais categorias diferem entre si utilizando o software *Systat 11* (*Systat Software Inc., Point Richmond, CA*). Os gráficos foram compilados através do *CorelDraw 11* (2002).

A magnitude da diferença de  $\delta D$  e do potencial hídrico foram obtida com a subtração dos valores noturnos (antes) aos valores matutino (depois) do mesmo indivíduo para cada tratamento (CT e D). Excluímos os indivíduos em que alguma das medidas realizadas apresentou problemas na leitura do  $\delta D$  pelo equipamento, uma vez que valores menores que -100‰ são impossíveis de ocorrer pela composição isotópica das fontes utilizadas no experimento, o que justifica o número de amostras (N) reduzidos de *D. brasiliensis* em relação às amostras previstas.

## 2. Traçadores apoplásticos fluorescentes

Folhas maduras e completamente expandidas, do terço médio do tronco principal, de plantas envasadas e mantidas em casa de vegetação no Departamento de Biologia Vegetal (IB/

UNICAMP) foram destacadas e conduzidas imediatamente para o experimento em laboratório (como em Widholzer 2005; Mastroberti & Mariath 2008).

As folhas foram acondicionadas em placas de Petri forradas por papel filtro umedecido, proporcionando uma câmara úmida, com umidade relativa estimada em 98% (Widholzer 2005). As regiões do corte no pecíolo foram seladas com graxa de silicone. Aplicamos 100µL da solução aquosa a 0,02% de 8-hidroxipireno-1,3,6,-ácido trissulfônico, sal trissódico HPTS – *Molecular Probes*, e a 1% de *Lucifer Yellow CH Dilithium salt* – *Sigma* (LY) nas duas faces foliares. Para as folhas controle aplicamos apenas água destilada. Priorizamos a aplicação das soluções na porção da lâmina entre borda e nervura central, por constituir a maior fração de área foliar. Tanto o HPTS e o LY são atóxicos para os tecidos vegetais, solúveis de baixo peso molecular, com atividade fluorescente sob pH da parede celular, de carga negativa, sendo que o LY pode se ligar a aldeídos alifáticos (Oparka *et al.* 1988). Os dois sais fluorescentes são incapazes de cruzar o plasmalema para as vias simplásticas e transpor as membranas celulares (Dybing & Currier 1959; Oparka *et al.* 1988; Canny 1990; Oparka & Read 1994; Widholzer 2005; Mastroberti & Mariath 2008).

As folhas com a solução de HPTS permaneceram no escuro por 2, 4, 6, 8 e 24 horas e por 24 horas com a solução de LY. Após esses intervalos lavamos as folhas em água destilada corrente para a remoção do excesso do traçador e as secamos cuidadosamente em papel filtro. Priorizamos a região central das porções foliares para as secções a mão livre. As lâminas histológicas foram montadas em meio de montagem comumente usado em imunofluorescência: glicerol em tampão fosfato a 90%, ajustado ao pH 9 com a adição de 0,5 M de carbonato de sódio (técnica adaptada pelos Profs. C.F.N. Widholzer, A. Mastroberti & J.E.A. Mariath, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS).

As lâminas preparadas com material mantido em HPTS foram observadas e fotografadas em um microscópio Leica DFC500M-R em epifluorescência, sob excitação ultravioleta (UV) entre 340 a 380 nm e filtro de barreira de 400 nm, e os mantidos em LY sob excitação azul intenso entre 450 a 490 nm, de filtro de barreira de 515 nm no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Botânica (Instituto de Biociências/ UFRGS) sob responsabilidade do Prof. Dr. J.E.A. Mariath.

### 3. Velocidade e direção do fluxo de seiva em *D. brasiliensis*

Para testar o efeito da neblina no uso de água de *D. brasiliensis* em solo seco, medimos a velocidade do fluxo de seiva em um indivíduo de dois metros utilizando o método da razão de pulsos de calor (*Heat Ratio Method, HRM*) (Burgess *et al.* 2001a,b) (*ICT International Pty Ltd*, Austrália). Esse método, desenvolvido por Burgess *et al.* (1998) originalmente para medir fluxo de seiva em raiz, permite medir fluxos baixos e reversos de seiva, como verificado em plantas sob atmosfera saturada de umidade (Burgess & Dawson 2004). O método tem como princípio o registro do aumento da temperatura a partir de pulsos em dois pontos, um acima e outro abaixo do aquecedor central. Assim, cada sensor contém dois pares de termopares acoplados ao tronco, cada um com dois segmentos de leitura, e um terceiro, central, que emite os pulsos de calor, que, neste trabalho, ocorreu a cada 30 minutos. O registro das medições foi feito em um *SL5 Smart logger* (*ICT International Pty. Ltd.*, Austrália) também a cada 30 minutos.

O indivíduo de *D. brasiliensis* foi removido do subosque da Mata Nebular do PECJ em novembro de 2008 e mantido em vaso de 150L em substrato misto do solo local e terra vegetal (Medeiros Plantas M.E.), sob irrigação diária por microaspersão e radiação de  $126 \pm 277 \mu\text{mol f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (MD  $\pm$  DP) e máxima de  $1958 \mu\text{mol f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  na casa de vegetação do Departamento de Biologia Vegetal, IB/ UNICAMP. O experimento foi iniciado em janeiro de 2010 com a interrupção da irrigação do solo, permanecendo em seca do solo por 20 dias. Para iniciar as nebulizações, isolamos completamente a entrada de água no solo impermeabilizando o vaso e a base do tronco com plástico e parafilme. No quarto dia de seca, iniciamos as medições da velocidade do fluxo de seiva (*Sap flow* em cm/h) em dois sensores inseridos em diferentes alturas no tronco principal. Um sensor foi acoplado mais próximo à base, a 43 cm em uma porção com 2,5 cm de diâmetro (chamado Sensor Base), e outro mais próximo ao ápice, a 1,33 m com 0,98 cm de diâmetro (Sensor Ápice). Devido ao pequeno diâmetro do tronco, apenas um termopar em cada sensor registrou os dados da velocidade do fluxo de seiva.

Para proporcionar uma atmosfera saturada montamos uma câmara de nebulização com plástico de estufa em estrutura metálica ao redor do indivíduo arbóreo, que foi submetido a quatro nebulizações noturnas entre 18h e 10h da manhã no 8º, 11º, 14º e 16º dia em seca do solo

e uma nebulização diurna das 10h às 13h, no 15º dia. O ápice foi cortado no penúltimo dia de registro para zerar o fluxo no Sensor Ápice, conferindo maior precisão na determinação do ponto zero (Burgess *et al.* 2001a,b). Além disso, os dados de fluxo durante períodos noturnos de baixa demanda evaporativa também possibilitam a determinação do ponto zero para o sensor base (Burgess & Dawson 2004). Com a determinação do fluxo zero torna-se possível distinguir o fluxo reverso de seiva (do dossel para o tronco) e o fluxo normal causado pela transpiração (da base para o dossel) (Oliveira *et al.* 2005).

Para monitorar os principais parâmetros ambientais durante o experimento utilizamos sensores da radiação fotossinteticamente ativa (*Photosynthetically active radiation*, PAR em  $\mu\text{mol f\u00f4tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e umidade foliar (*Leaf wetness* em %) acoplados ao *HOBO Micro Station*; e da temperatura e umidade relativa pelo *HOBO® Pro Series™ Weatherproof Loggers* para calcular o déficit de pressão de vapor (*Vapour pressure deficit*, VPD em KPa). Dados da velocidade do fluxo de seiva (V) foram demonstrados graficamente apenas para aqueles registrados pelo Sensor Base durante o período do 04º dia ao 20º dia de seca no solo.

## Resultados

### 1. Experimento de marcação por água deuterada

A água foliar das três espécies tornou-se enriquecida em deutério após a nebulização (*D. brasiliensis*: N=24, KW=14,557 p=0,002; *E. erythropappus*: N=36, KW=17,147 p<0,001; *M. umbellata*: N=24, KW=24,485 p=0,001; Grau de liberdade, G.L.=3 para todas as análises) (Figura 1). A mudança na composição isotópica da água foliar é uma evidência que houve absorção direta de água de neblina pelas folhas nas três espécies. A diferença de magnitude da  $\delta D$  antes e depois da nebulização, que indica a capacidade de absorção foliar de água das espécies, foi maior para *D. brasiliensis*, seguida por *M. umbellata* e *E. erythropappus*. Folhas de *D. brasiliensis* apresentaram a maior capacidade de absorção foliar de água, pois a magnitude da diferença da  $\delta D$  média entre os tratamentos foi de 327,66‰, comparada a 210,40‰ para *M. umbellata* e 169,31‰ para *E. erythropappus*.

Os indivíduos das três espécies submetidos à nebulização absorveram grande quantidade da água da neblina, sendo que 42% do conteúdo de água foliar de *D. brasiliensis* foi proveniente da neblina enriquecida em deutério (Intervalo de confiança - IC: 0-89%), 31% em *E. erythropappus* (IC: 12-48%) e 30% em *M. umbellata* (IC: 20-39%).

Embora o aporte de água pela via foliar tenha sido evidenciado pelo enriquecimento em isótopos de deutério, não houve diferenças significativas entre o potencial hídrico dos indivíduos antes e depois da nebulização para nenhuma das espécies (*D. brasiliensis*: N=24, KW=1,409, p=0,703; *E. erythropappus*: N=32, KW=2,118, p=0,548; *M. umbellata*: N=24, KW= 1,184, p=0,757; GL=3 para todas as análises).

## 2. Traçadores apoplásticos fluorescentes

Todas as espécies absorveram as soluções com os traçadores apoplásticos HPTS e LY, mas diferiram quanto à via de entrada pelas diferentes faces foliares (adaxiais e abaxiais) e quanto aos mecanismos envolvidos (difusão direta pela cutícula e/ou por tricomas tectores ou glandulares). O aumento da intensidade da fluorescência do HPTS no interior das folhas foi proporcional ao tempo de exposição e os resultados obtidos após 24 horas se assemelharam aos obtidos com a aplicação do LY. A autofluorescência dos tecidos foi menor nas folhas observadas em filtro azul para o ensaio com o LY. Além disso, a intensidade da fluorescência do LY foi maior, o que o tornou mais detectável do que o HPTS, e por isso priorizamos as imagens obtidas dos tecidos foliares em contato com o LY (Figura 2, 3 e 4).

Ambas as superfícies foliares de *D. brasiliensis* apresentaram fluorescência devido à presença dos sais traçadores de vias apoplásticas (Figura 2: A-D). Foi possível visualizar a presença do HPTS em 2 horas de contato com a solução, especialmente quando aplicado na superfície adaxial intensificando-se gradualmente quanto maior o tempo de contato. A absorção da solução contendo LY ocorreu em algumas regiões de forma mais concentrada na superfície adaxial, em que houve grande intensidade da fluorescência dos sais (Figura 2B). Para essa espécie, a solução passou diretamente pela cutícula e o acúmulo do LY foi observado principalmente nas paredes das células epidérmicas e do parênquima paliçádico, com deposição

posterior, inclusive, no interior das células do parênquima paliçádico (Figura 2B). O mesmo padrão foi verificado na aplicação da solução na superfície abaxial, com a presença do traçador por toda a cutícula e células epidérmicas, diferindo apenas pelo padrão de acúmulo nas células do parênquima lacunoso que ocorreu de forma organizada em espaçamento regular, provavelmente devido às células-guarda dos estômatos e as células mucilaginosas epidérmicas (Figura 2D).

Folhas de *D. brasiliensis* são hipoestomáticas, dotadas de epiderme unisseriada, parênquima paliçádico e lacunoso (Figura 2E) e cutícula espessa, especialmente na superfície abaxial onde ocorre com frequência uma penetração cuticular pelos ostíolos dos estômatos (Figura 2F). Todo o mesofilo é riquíssimo em compostos fenólicos, lipídicos e polissacarídicos (Figura 2F-I). Observamos a presença de idioblastos com compostos heterogêneos, lipídicos (Figura 2F) e uma grande concentração de polissacarídeos nas epidermes das superfícies adaxiais e abaxiais (Figura 2H e I). Com vermelho de rutênio pudemos verificar a presença de pectinas ácidas nas paredes celulares das células do parênquima paliçádico e especialmente nas células próximas da borda foliar e da nervura central, mas pela ausência de aplicações das soluções nessas regiões não podemos descrever padrões de absorção por essa via nas bordas e nas nervuras.

A impregnação dos sais na cutícula adaxial de *E. erythropappus* também ocorreu em regiões específicas, sendo mais intensa nas regiões de depressões superficiais formadas após a senescência dos tricomas glandulares (Figura 3A e B). Observamos a ocorrência dos tricomas glandulares em diferentes estágios de desenvolvimento nas duas superfícies foliares, até os estágios finais de ruptura e pequenos fragmentos nas regiões de depressões. No tratamento com HPTS, observamos após 4 horas um leve aumento da fluorescência na porção da cabeça dos tricomas glandulares e nas regiões laterais entre o tricoma e a depressão. No entanto, esse padrão não foi observado em todas as folhas e não foi confirmado pelo tratamento com LY. Com a aplicação da solução de LY na superfície abaxial, houve uma intensa impregnação dos sais por toda parede celular dos tricomas tectores ramificados, abundantes na epiderme abaxial (Figura 3 C e D). Os tricomas tectores apresentaram maior acúmulo do LY nas paredes celulares da célula apical e das regiões de contato entre a célula apical e célula basal do tricoma (Figura 3E). A via

que os sais percorrem após a impregnação nos tricomas tectores demonstra ser contínua pela presença de sais nas paredes celulares das células epidérmicas e parenquimáticas até o xilema, onde ocorreu intenso acúmulo do LY (Figura 3C e D).

A estrutura foliar de *E. erythropappus* é hipoestomática, dotada de epiderme unisseriada com tricomas tectores ramificados, extremamente abundante na superfície abaxial e tricomas glandulares em ambas superfícies foliares (Figura 3F, H e L). Os feixes vasculares são envoltos por bainha do feixe que frequentemente apresentam extensões parenquimáticas (Figura 3G), que aparentemente formam uma via apoplástica de transporte da solução absorvida para os feixes vasculares (Figura 3D). O Sudam Black permite visualizar a cutícula espessa revestindo as células epidérmicas e penetrando por entre as paredes celulares anticlinais (Figura 3H). Compostos polissacarídicos estão presentes nas paredes celulares das células epidérmicas e parênquimáticas, sendo mais concentrados nas paredes celulares periclinais externas, que fazem contato com a cutícula, e na porção superior das paredes anticlinais, como revelado pela reação PAS (Figura 3I e J). Pectinas ácidas estão presentes nas paredes celulares, embora em baixas concentrações como revelado pelo vermelho de rutênio.

*M. umbellata* também absorveu soluções dos sais fluorescentes em ambas as superfícies foliares após 2 horas de contato com o HPTS. As paredes das células em toda a extensão do mesofilo apresentaram fluorescência bastante intensa após 24 horas em contato com a solução de LY (Figura 4A e B). Observamos acúmulo dos sais na cutícula das superfícies adaxial e abaxial (Figura 4C, D e E). Os sais concentraram-se ao longo de todo o mesofilo e mais intensamente na região onde estão situadas as células coletoras, que apresentam uma distribuição regular logo abaixo do parênquima paliçádico (em aspecto linear no corte transversal) (Figura 4B). As extensões citoplasmáticas das células coletoras parecem envolvidas na passagem da solução da cutícula adaxial para o interior foliar (Figura 4B e E). Completando a retenção da solução pela cutícula, verificamos intensa retenção dos sais nos tricomas glandulares peltados das duas superfícies foliares (Figura 4F e G). Os poros estomáticos são evidentes nessa espécie mesmo em cortes a mão livre e não encontramos sais fluorescentes, indicando que aparentemente não houve absorção pelas cavidades estomáticas.

*M. umbellata* apresenta folha hipoestomática, com epiderme unisseriada rica em idioblastos mucilaginosos, com cutícula espessa, dotada de tricomas glandulares peltados, parênquima paliçádico e parênquima lacunoso com presença frequente de cavidades secretoras. Entre os dois parênquimas há um arranjo linear de células coletoras (Figura 4H). Todo o tecido foliar, apresentou abundância de compostos polissacarídicos (Figura 4I e J), inclusive a epiderme abaxial e os tricomas glandulares peltados (Figura 4L e M). Esses tricomas glandulares foram frequentes nas duas superfícies de *M. umbellata*, em que ocorre uma ruptura no padrão de deposição de cutícula, que geralmente é espessa e uniforme sobre as células epidérmicas ordinárias (Figura 4N). Houve reação positiva ao cloreto férrico, indicando a presença de compostos fenólicos, além de polissacarídeos (Figura 4O).

### 3. Velocidade e direção do fluxo de seiva em *D. brasiliensis*

O curso diário de fluxo de seiva (*Sap velocity*, V) em *D. brasiliensis* seguiu o curso de déficit de pressão de vapor (VPD), apresentando valores máximos entre 12 e 14h (Figura 5). Houve uma redução gradativa da magnitude do fluxo de seiva com o aumento da seca no solo, indicando controle estomático da transpiração diurna quando em seca (Figura 5). A espécie apresentou valores positivos noturnos da velocidade do fluxo de seiva (*Sap velocity*, V), especialmente nas noites do 7° e 9° dia em que não houve nebulização, o que indica a ocorrência de transpiração noturna (Figura 5).

A nebulização causou uma redução significativa da velocidade do fluxo de seiva no sentido ascendente raiz-parte aérea (Figura 5) e uma inversão do fluxo de seiva especialmente na madrugada do 14° dia até a manhã do dia seguinte (Figura 5 e 6). Houve um longo período de fluxo reverso da seiva de baixa intensidade, nas últimas horas do 15° dia e na madrugada do dia seguinte, mesmo na ausência de nebulização, pela formação de uma atmosfera saturada da noite chuvosa (indicado pela seta média na Figura 5 e na menor da Figura 6).

No 16° dia em seca, a nebulização causou uma redução abrupta da velocidade do fluxo de seiva logo no início, sem haver, no entanto, fluxo reverso. Posteriormente, o fluxo reverso ocorreu brevemente apenas na madrugada do 19° dia em seca mesmo sem nebulização, enquanto

esteve alta a umidade relativa atmosférica. A nebulização diurna no 15ºD reduziu a magnitude da velocidade abaixo da verificada ao longo do experimento mesmo sob um altíssimo VPD (Figura 5 e 6). A chuva no fim da tarde do 15º dia proporcionou a saturação da atmosfera na casa de vegetação (na ausência de nebulização) e foi responsável pelo aumento da umidade foliar, pela redução da velocidade e mudança no sentido do fluxo de seiva após as 20h (Figura 6).

## **Discussão**

A capacidade de absorção de água através das folhas foi demonstrada de forma direta por dois métodos distintos nas três espécies: marcação por água deuterada e por sais fluorescentes traçadores apoplásticos. O uso de isótopos estáveis constitui uma importante ferramenta para rastrear processos ecológicos e tem sido amplamente utilizada para demonstrar a capacidade de absorção de água pelas folhas de várias espécies em Florestas de Sequóias da Califórnia e em vegetação semi-árida no sudoeste dos EUA (Burgess & Dawson 2004; Breshears *et al.* 2008; Limm *et al.* 2009). O uso de sais fluorescentes, no entanto, constituiu uma ferramenta ainda pouco utilizada para tal fim, mas que apresenta um grande potencial para elucidar as vias apoplásticas e a deposição das soluções absorvidas tanto em folhas quanto em raízes (Canny 1996; Widholzer 2005; Mastroberti & Mariath 2008). A inversão do fluxo de seiva em *D. brasiliensis* durante um evento de nebulização em magnitude de taxa máxima relativa similar à observada em *Sequoia sempervirens* (Burgess & Dawson 2004) constitui uma terceira evidência da capacidade de absorção de água foliar.

### **1. Absorção foliar de água e vias anatômicas**

Com as soluções contendo sais fluorescentes traçadores da via apoplástica, verificamos a presença dos sais no mesofilo advindos das superfícies adaxial e abaxial nas três espécies (Figura 2-4). Houve maior intensidade da fluorescência quando a solução foi aplicada na superfície adaxial, sugerindo uma maior permeabilidade desta superfície, como observado em várias espécies cultivadas que receberam soluções de NAA (*1-Naphthylacetic acid*) nas folhas (Baker & Hunt 1981). É importante ressaltar que nem todos os cortes anatômicos demonstraram a

presença dos traçadores, pois a absorção foliar não ocorre necessariamente em toda a superfície foliar (Haberlandt 1965) e nem toda a superfície seccionada entrou em contato direto com as soluções. Além disso, o rastreamento do sal fluorescente HPTS fica prejudicado pela intensa autofluorescência dos tecidos foliares sob excitação UV. Dessa forma, o LY é mais facilmente rastreável, pois sua visualização requer o filtro azul que barra os comprimentos de ondas da autofluorescência em azul.

Embora a superfície adaxial demonstre ser mais permeável, observamos claramente a absorção da solução com os traçadores na superfície abaxial mesmo em *D. brasiliensis* que apresenta epiderme papilosa revestida por cutícula espessa e *plugs* estomáticos de natureza lipídica, estruturas consideradas repelentes à formação da lâmina d'água sobre as folhas (Smith 1943; Bailey & Nast 1944; Bongers 1973; Feild *et al.* 1998, 2006; Feild & Holbrook 2000). De fato, os *plugs* estomáticos cuticulares são poros com material granular lipofílico que preenche a cavidade acima das células guarda (Bailey & Nast 1944, Bongers 1973) e foram bem visualizadas em reação com o Sudam Black em *D. brasiliensis* (Figura 2F). Estudos pioneiros sugeriram que estas estruturas poderiam reduzir as taxas de perda de água em condições naturais, desempenhando assim um papel compensatório na suposta ineficiência do sistema de transporte hidráulico por traqueídes (Bailey 1944, 1953; Bailey & Nast 1944; Grubb & Whitmore 1966; Calquist 1975; Grubb 1977; Lawton & Dryer 1980). No entanto, o papel funcional destas estruturas ainda é controverso, pois alguns autores sugerem que eles repelem a película de água (Feild *et al.* 1998; Feild & Holbrook 2000) enquanto estudos recentes, incluindo o presente estudo (Figura 2D), demonstram um papel de absorção de água (Westhoff *et al.* 2009).

Westhoff *et al.* (2009) descreveram uma grande quantidade de compostos hidrofílicos, como ácidos mucopolissacarídicos em *plugs* estomáticos de várias espécies, inclusive de *Drimys winteri* e propuseram que estes compostos estariam associados à absorção direta de água pelas folhas. Curiosamente, verificamos em lupa a entrada rápida e instantânea de gotas de água aplicadas na superfície abaxial de folhas de *D. brasiliensis* provenientes do Núcleo de Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar - SP. A estrutura esbranquiçada cuticular que cobre a superfície abaxial das folhas desta espécie se comportou como uma esponja retentora da água. Essa observação associada à evidência de compostos polissacarídicos na cutícula abaxial (Figura

2I em relação a H) corroboraram os resultados de Westhoff (2009) e se insere na discussão sobre o papel dos *plugs* estomáticos como região de condensação de água (Burkhardt 2010). Nesse contexto, o funcionamento desse tipo cuticular especializado pode ser ainda mais complexo, uma vez que a estrutura cuticular pode apresentar plasticidade morfológica e funcional (Schönherr 1976a,b, 2000; Van Hove & Adema 1996; Schreiber *et al.* 2001; Schreiber 2005; Widholzer 2005; Burkhardt 2010).

A capacidade de absorção de água via cuticular deve ser realçada, pois contrasta com o papel comumente associado a essa estrutura, de uma simples barreira físico-química eficiente contra perda de água (Martin & Juniper 1970). De fato, a cutícula apresenta uma estrutura extremamente complexa e elaborada e pode modificar sua permeabilidade em resposta a estímulos ambientais (Schreiber *et al.* 2001; Schreiber 2005). A permeabilidade cuticular não está necessariamente relacionada à sua espessura ou cobertura por ceras, como sugerido por muitos estudos anatômicos descritivos. A composição e o arranjo (densidade e orientação) da sua estrutura molecular são os principais determinantes do aumento da condutividade cuticular e podem sofrer alterações conforme a pressão osmótica do tecido e do déficit de pressão de vapor atmosférico (Skoss 1955; Baker & Hunt 1981; Widholzer 2005; Kerstiens 2006).

A solução contendo os sais fluorescentes impregnou a cutícula (Figura 2D, 3B, 4D), perpassou as paredes celulares epidérmicas, atingiu o parênquima das três espécies (Figura 2B,D, 3D, 4D) e em *E. erythropappus* chegou até o xilema (Figura 3D). A difusão após a cutícula em *E. erythropappus* ocorreu através das paredes celulares da epiderme e do parênquima dotadas de compostos pécticos e polissacarídicos, como revelado com o Vermelho de Rutênio e a Reação de PAS (Figura 3J), até atingir o xilema (Figura 3D). Assim, a permeabilidade às soluções vai além da cutícula, envolvendo as paredes epidérmicas e do parênquima também em *D. brasiliensis*, cujas células são riquíssimas em compostos fenólicos, parte dos quais podem ter reagido também ao PAS (Figura 2G, I). A presença mista dos compostos fenólicos com polissacarídeos indica uma composição hidrofílica (Kelsey 1984) que pode facilitar a retenção de água em espécies arbóreas (Zimmermann *et al.* 2007). Inclusive, é possível que haja células especializadas do parênquima paliçádico responsáveis pelo acúmulo das soluções aquosas absorvidas, isso porque

as soluções contendo os sais traçadores parecem armazenadas no interior dessas células, conforme o padrão de retenção não apenas nas vias apoplásticas (Figura 2B).

Já em *M. umbellata*, a absorção de água do exterior para o interior do mesofilo parece ocorrer por intermédio das células coletoras, que fazem a conexão entre o parênquima paliçádico e o parênquima lacunoso. As células coletoras nessa espécie apresentam expansões citoplasmáticas que fazem contato com as células epidérmicas adaxiais (Figura 4E), sendo esse um padrão distinto das que encontramos descritas em *Psidium widgrenianum*, em que a parede periclinal é igualmente voltada para a face adaxial, mas conectando um número variável de células do parênquima paliçádico. Em *M. umbellata*, o contato das células coletoras faz-se diretamente com as células epidérmicas adaxiais, o sugerindo que essas células interceptam e armazenam a água absorvida pela superfície foliar, uma vez que houve maior concentração dos traçadores nas paredes celulares das células coletoras (Figura 4B). O acúmulo de água não necessita de tecidos extremamente especializados, algumas espécies de florestas úmidas montanas, por exemplo, estocam água na hipoderme foliar (Metcalf 1987). Estudos realizados em *Crassula deceptor* e outras plantas xerófitas sugeriram que a estrutura físico-química das paredes celulares epidérmicas pode formar vias polarizadas em que a água pode ser absorvida mais prontamente. Esse mecanismo foi demonstrado em diversas sementes (Lyshede 1979). Além das mudanças de polaridade na parede celular, microcanais também podem estar envolvidos, como observado em *Spartocystis filipes* (Lyshede 1979). Ambos os mecanismos podem facilitar a translocação da água externa à parede celular (Lyshede 1979).

Além da cutícula, verificamos a intensa retenção dos traçadores nos tricomas tectores de *E. erythropappus* e nos tricomas glandulares de *M. umbellata*, que parecem envolvidos na adsorção e absorção da água depositada na lâmina foliar. Os tricomas tectores de *E. erythropappus* são muito ramificados e cobrem toda a superfície abaxial, o que aumenta as reentrâncias e a superfície de contato com a solução (Figura 3D, E, L). É possível que a exposição da superfície abaxial foliar repleta de escamas absorptivas, como observado em algumas pteridófitas, possa ocorrer em espécies de Asteraceae de matas de altitude e/ou rupícolas. Essa alteração morfológica expõe a superfície absorptiva quando ocorre a perda do

turgor foliar, o que facilita a retenção e absorção da umidade depositada na superfície (Moran 2004).

Os tricomas glandulares peltados de *M. umbellata* estão situados em depressões epidérmicas (Figura 4L-O) onde também se acumulam os sais, além da deposição observada nas fendas entre as células da cabeça do tricoma (Figura 4G). Esses tricomas se assemelham estruturalmente aos tricomas com capacidade absorptiva presentes nas folhas de *Tillandsia rigida*, principalmente na região da base foliar, pois também são formados por um complexo multicelular em uma concavidade epidérmica (Benzing *et al.* 1976). Os tricomas dessas espécies não apresentam uma cobertura cuticular definida, nem espessa (Figura 3H, 4N), o que se assemelha à descrição dos tricomas absorptivos unicelulares de espécies de deserto que apresentam cutícula fina (Haberlandt 1965). Muitos tricomas apresentam um arranjo particular cheio de ectodesmas (Franke 1961) e poros que permitem que a água difunda através das paredes pontoadas da base do tricoma e atinja paredes adjacentes das células do mesofilo. Os tricomas formados por células glandulares podem facilitar a formação de uma via apoplástica contínua do exterior até o mesofilo, capacitando-os a um papel de absorção (Wahid 2003). Tricomas multicelulares absorptivos geralmente apresentam células basais de paredes finas e grande conteúdo protoplasmático (Haberlandt 1965). Atkinson *et al.* (1967) verificou a absorção de íons de Cl<sup>-</sup> diretamente pelas glândulas foliares. Outros solutos também foram observados formando depósitos nas vias apoplásticas foliares, em zonas na base de glândulas e em paredes de células base de glândulas e de idioblastos, indicando que o apoplasto pode encontrar-se aberto na base de glândulas formando um caminho primário para o movimento de íons (Wahid 2003).

Grammatikoupolos & Manetas (1994) observaram que a presença de tricomas na superfície foliar pode, de fato, aumentar a retenção de água, beneficiando o *status* hídrico foliar pela redução da transpiração e aumentando as chances de absorção pelas folhas. Reconhece-se que tricomas possam desempenhar diversas funções de acordo com as condições ambientais (Savé, Biel & Herralde 2000), sendo dotados de uma grande diversidade e complexidade estrutural. Mesmo na mesma espécie, os tricomas podem atuar como camada de repulsão às gotículas de água (“*lifting strategy*”) (Brewer & Smith 1997; Savé *et al.* 2000) ou proporcionar acúmulo de água, que posteriormente poderá evaporar, reduzindo a transpiração (“*segregating*

*strategy*”) (Savé *et al.* 2000). De forma geral, o arranjo das superfícies foliares determinado pela cutícula, epiderme e tricomas pode proporcionar aumento da superfície de contato e adsorção mais intensa da película de água (Burkhardt 2010), especialmente se apresenta potencial osmótico mais negativo, favorecido pela presença de camadas de ácidos muco-polissacarídicos (Westhoff *et al.* 2009). A presença de substâncias vacuolares favorece diminuição da pressão osmótica, o que afeta a viscosidade e a retenção de água (Kramer 1983). A presença de polissacarídeos na cutícula e nas paredes celulares de *E. erythropappus* (Figura 3J), na cutícula e epiderme de *D. brasiliensis* (Figura 2I) e na epiderme, rica em idioblastos, e nos tricomas glandulares de *M. umbellata* (Figura 4J,M) pode favorecer o movimento de água e solutos nas plantas uma vez que ocorrem por difusão ao longo de gradientes de potenciais hídricos decrescentes (Kramer 1983).

Após transpor a cutícula, a solução traçadora percorre as vias apoplásticas de forma generalizada do mesofilo nas três espécies, atingindo o xilema em *E. erythropappus*. As células do mesofilo podem armazenar água mesmo que não apresentem modificações histológicas evidentes, como ocorre em algumas espécies de deserto (Haberlandt 1965). As três espécies não possuem estruturas tipicamente especializadas para o acúmulo de água, mas apresentaram estruturas ricas em polissacarídeos, especialmente *D. brasiliensis* e *M. umbellata* dotadas de células epidérmicas e parenquimáticas mucilaginosas (Figura 2I, 3J, 4J, 4M). Eventualmente observamos maior intensidade na fluorescência dos sais entorno de alguns idioblastos de *D. brasiliensis* e de *M. umbellata*, e em algumas cavidades secretoras de *M. umbellata*, mas não em concentrações significativas. Os idioblastos de *D. brasiliensis* apresentam conteúdo bastante diverso, como evidenciado pelas diferentes cores em Azul de Toluidina e em reação ao Sudam Black (Figura 2F), enquanto *M. umbellata* são tipicamente mucilaginosos (Freitas 2003) (Figura 5J). Esau (1965) sugeriu que os idioblastos mucilaginosos de *Myrsine* estariam envolvidos no armazenamento de água, mas são fracas as evidências que encontramos para confirmar ou refutar a sugestão, diferente do que se observou em *Araucaria angustifolia*, onde foi intenso o acúmulo do traçador HPTS em células mucilaginosas (Mastroberti & Mariath 2008). É possível que os idioblastos apenas atuem de forma indireta na absorção, reduzindo o potencial hídrico na superfície, para facilitar a difusão da água. Inclusive, Ohtani & Hostettman (1992) extraíram de

uma espécie de Myrsinaceae africana (*Rapanea melanophloeos*) compostos polares ricos em diferentes açúcares (glucose, galactose, ramnose, etc) e ainda registraram a ocorrência de saponinas (heterosídeos anfipáticos), cuja porção hidrofílica proporciona elevada solubilidade e que podem modificar a fluidez e a composição das membranas, reduzindo a tensão superficial de água pela sua propriedade surfactante (Manguro *et al.* 1997). Em *M. umbellata*, também estão presentes as cavidades secretoras, que podem apresentar relações com o ajuste osmótico em situações de seca (discussão aprofundada no Capítulo II). Essas cavidades podem estar esvaziadas ou apresentarem compostos mistos (Freitas 2003), geralmente de aspecto resinoso cuja coloração natural foi do amarelo ao âmbar, reagindo somente em alguns cortes com Sudam Black.

Pela natureza restritiva das vias simplásticas, a observação do percurso da água pelas células torna-se impossível com o método dos sais fluorescentes, quando não há especializações celulares que promovam a passagem desses solutos. Isso porque a água pode prosseguir por vias simplásticas e mesmo transcelular (onde atravessa as membranas plasmáticas pelas aquaporinas), sendo essas impermeáveis aos sais (Canny 1990). No entanto, a água se difunde muito mais livremente por todas as estruturas vegetais, devido a suas propriedades físico-químicas, como viscosidade, solubilidade e capilaridade (Meidner & Sheriff 1976). Assim, a técnica empregada foi suficiente para demonstrar que a absorção da solução contendo os sais ocorre e se difunde amplamente no mesofilo, ampliando a possibilidade de difusão da água pelos tecidos vegetais.

É importante ressaltar que o processo de absorção foliar pode ser modulado por diversos fatores como o próprio conteúdo de água na cutícula (Kerstiens *et al.* 2006), o *status* hídrico geral das folhas e as condições ambientais (Westhoff *et al.* 2009). Além dessas relações diretas com a disponibilidade de água, a absorção foliar pode variar com a idade da folha (Baker & Hunt 1981; Schreiber *et al.* 2001), entre as regiões da folha (sendo menos intensa na região do ápice) (Leyton & Juniper 1963) e as regiões que ocupam na parte aérea (Westhoff *et al.* 2009), com a angulação, sendo mais intensa em ângulos menores de 45 a 55° (Leyton & Juniper 1963), e com a composição da microbiota associada (Schreiber *et al.* 2004). Verificamos uma microbiota abundante em *M. umbellata* e em outra espécie do gênero (*M. ferruginea*) em microscopia de varredura e nos cortes anatômicos, ocorrendo próximo aos tricomas glandulares. A microbiota

pode estar associada à secreção de carboidratos das mucilagens secretadas pelas glândulas, como ocorre em *Ardisia crispa* (também Myrsinaceae dotada de tricomas glandulares peltados) (Miller, Gardner & Scott 1984) e em outras espécies, como em *Dioscorea* (Behnke 1984).

Inclusive, encontramos em *M. ferruginea* o mesmo padrão de retenção dos sais fluorescentes apoplásticos de *M. umbellata*, acrescido apenas da observação de acúmulo de HPTS nos tricomas tectores, também presentes nessa espécie. *M. ferruginea*, assim como *M. umbellata*, é uma árvore perenifólia, heliófila, seletiva higrófila e pioneira, ocorrendo em quase todas as formações vegetais do país e particularmente frequente em matas de altitude (Lorenzi 2002), em co-ocorrência com as demais espécies estudadas do Parque Estadual de Campos do Jordão. É interessante a semelhança dos resultados em uma espécie do mesmo gênero para apontarmos o potencial absorptivo de água pelas folhas em espécies aparentadas e também em grupos filogeneticamente distintos que co-ocorrem sob mesmas condições ambientais. A falta de água no solo pode atuar como um fator de seleção ao longo da evolução, favorecendo espécies que são capazes de melhorar seu *status* hídrico a partir de fontes alternativas de água depositadas na superfície foliar, como neblina, orvalho, fracos eventos de chuva, evaporação do solo, transpiração de plantas de estratos inferiores (Westhoff *et al.* 2009).

É possível que haja interferência dos poros estomáticos na absorção pela superfície adaxial, pois as três espécies são hipoestomáticas e apresentaram intensa absorção das soluções por essa superfície (Figura 2D, 3D; não demonstrado para *M. umbellata*). Embora não se possa elucidar com precisão a participação específica dessa via de absorção em cortes a mão livre, foi possível reconhecer um padrão de deposição dos sais traçadores diferenciado em *D. brasiliensis* pela fluorescência generalizada na epiderme abaxial (Figura 2D). É possível que a intensa absorção de água pelas folhas nessa espécie envolva a participação de um mecanismo higroscópio que ativa a permeabilidade dos poros estomáticos em folhas maduras, justificando altas taxas de permeabilidade (impossíveis apenas por transporte cuticular) e o transporte de solutos maiores (Burkhardt 2010). Em *E. erythropappus* (Figura 3D) e *M. umbellata* o transporte pelos estômatos não deve ter tanta importância como em *D. brasiliensis*, o que pode estar relacionado a presença dos *plugs* estomáticos (Westhoff *et al.* 2009; Burkhardt 2010).

## 2. Fluxo reverso da seiva em *Drimys brasiliensis*

Após o início da nebulização, *D. brasiliensis* reduziu imediatamente o fluxo ascendente da raiz para a parte aérea, revertendo o sentido do fluxo em menos de quatro horas de exposição à atmosfera saturada (Figura 5, 6). A magnitude do fluxo reverso de *D. brasiliensis* foi bastante elevada em comparação às árvores amazônicas (Oliveira, comunicação pessoal) e semelhante ao fluxo reverso máximo em sequoias (próximo de -10%) verificado por Burgess & Dawson (2004). O fluxo reverso de seiva em *D. brasiliensis* atingiu até 10,6% do valor máximo de fluxo de seiva diurno. É possível que outras estruturas da parte aérea, como os ramos, estejam envolvidas no processo de absorção, como já foi verificado em outras espécies, sob pressão (Katz *et al.* 1989). Além disso, é interessante mencionar a ocorrência de um longo período de fluxo reverso da seiva de baixa intensidade, nas últimas horas do 15º dia e na madrugada do dia seguinte, mesmo na ausência de nebulização (indicado pela Seta média na Figura 5 e a seta menor da Figura 6). Esse fluxo reverso pode ter ocorrido em resposta ao gradiente de potencial de água mais negativo no solo e maior potencial na atmosfera (baixo VPD causado pelas chuvas intensas).

Nesse experimento, observamos uma redução gradativa no fluxo ascendente de seiva ao longo do experimento. Essa redução deve ter ocorrido em consequência do aumento da resistência hidráulica na planta toda, possivelmente devido ao controle estomático, à cavitação dos traqueídes, mortalidade de raízes finas e redução da área foliar em resposta ao aumento da seca no solo (Lambers, Chapin & Pons 1998; Larcher 2006). A seca repercute rapidamente em menor desempenho ecofisiológico e a nebulização exclusiva da parte aérea atenua seus efeitos negativos (ver Capítulo II). A nebulização rapidamente cria uma atmosfera saturada (de baixo VPD) e a umidade coalesce nas superfícies foliares (conferindo 100% de umidade foliar, Figura 6). De fato, a absorção foliar é favorecida com a diminuição dos valores do VPD (Van Hove & Adema 1996).

Por meio das medições da velocidade do fluxo de seiva, verificamos a ocorrência de transpiração noturna em diversos períodos em *D. brasiliensis* (Figura 5), o que já foi observado para outra espécie do gênero, *Drimys granadensis* (Field & HoodBrook 2000). Em *D. granadensis* a transpiração noturna é responsável por 60% da água diária transpirada, sendo ainda maior com o aumento da velocidade do vento. As taxas de transpiração noturna observadas

chegam a ser 10 vezes maiores que de outras espécies. Os autores sugerem que as perdas de água nessa espécie podem ser controladas pela camada de ar limítrofe, uma vez que a abertura estomática se mostra invariável e em *Drimys winteri* não fecha nem com alto VPD (ver Capítulo II).

### 3. Contribuição da absorção de água pelas folhas

Demonstramos que a água da neblina interceptada e adsorvida nas superfícies foliares pode ser absorvida pelas folhas diretamente pela cutícula ou por estruturas especializadas da epiderme, constituindo assim uma fonte significativa de água para espécies lenhosas tropicais quando sujeitas a períodos de seca do solo. A absorção de água pelas folhas pode ser mais um mecanismo para se evitar a seca em espécies tropicais além do uso de águas de perfis mais profundos do solo e redistribuição hidráulica (Oliveira *et al.* 2005, 2007). Essa fonte direta de água pode representar de 30 a 42% do conteúdo de água da folha, o que sugere um papel significativo como fonte alternativa de água para a parte aérea de algumas espécies durante períodos de déficit hídrico (Slatyer 1960; Rundel 1982; Oliveira 2005; Breshears *et al.* 2008; Limm *et al.* 2009).

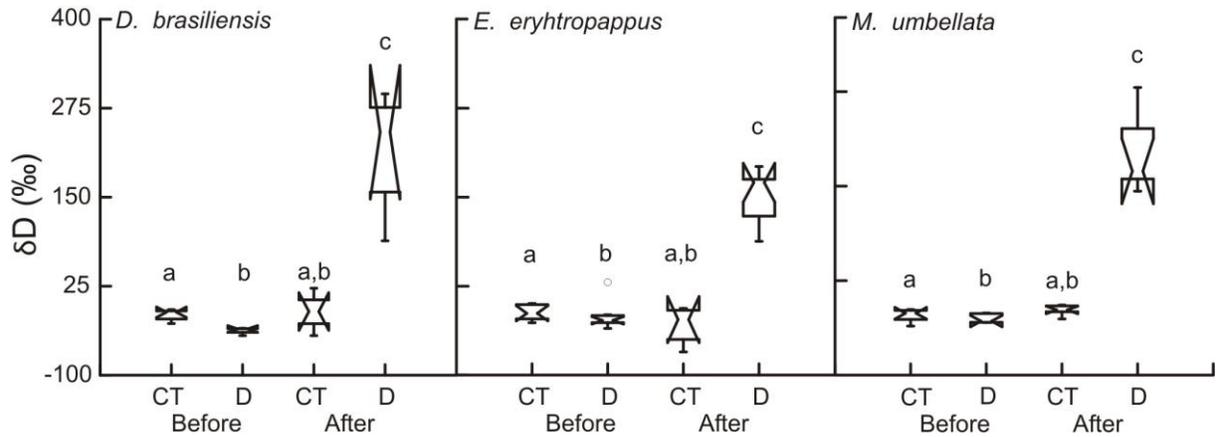
A absorção de água pelas folhas reforça o modelo bidirecional solo-planta-atmosfera, pois a água interceptada pode ser conduzida bidirecionalmente passando das folhas para os tecidos mais internos (Simonin *et al.* 2009). A via de entrada pelas folhas pode ser uma estratégia alternativa para a obtenção direta de água mesmo em espécies lenhosas, onde se aumenta a permeabilidade cuticular das folhas na ocorrência de atmosfera saturada e baixa disponibilidade de água no solo (Simonin *et al.* 2009). Em alguns casos, a água interceptada pode aumentar a hidratação do tecido foliar, aumentando significativamente o conteúdo de água foliar e o potencial hídrico, e, assim, contribuir para a recuperação do *status* hídrico (Grammatikopoulos & Mannetas 1994; Bourcher *et al.* 1995; Yates & Hutley 1995; Gouvra & Grammatikopoulos 2003; Breshears *et al.* 2008; Limm *et al.* 2009). A água absorvida pelas folhas pode beneficiar o desempenho ecofisiológico proporcionando maiores trocas gasosas (Grammatikopoulos & Mannetas 1994; Martin & von Willert 2000; Simonin *et al.* 2009) mesmo em tecidos distantes da

superfície interceptadora (Martin & von Willert 2000), refletindo em melhora no desempenho ecofisiológico, no crescimento e na sobrevivência mesmo em espécies lenhosas filogeneticamente distintas.

### **Conclusões**

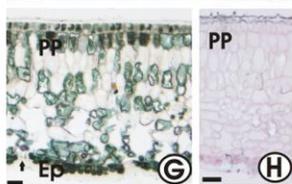
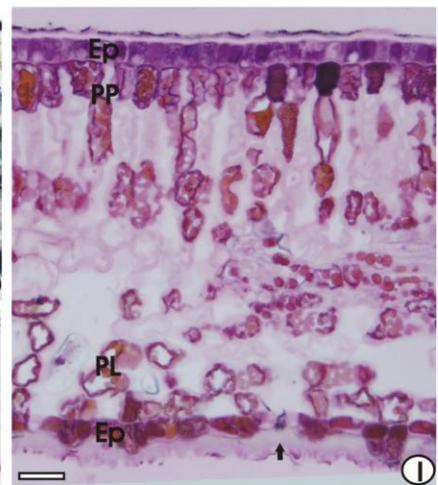
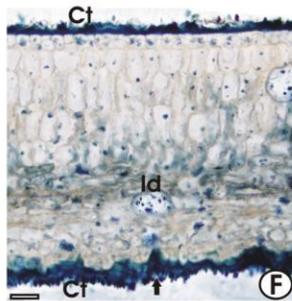
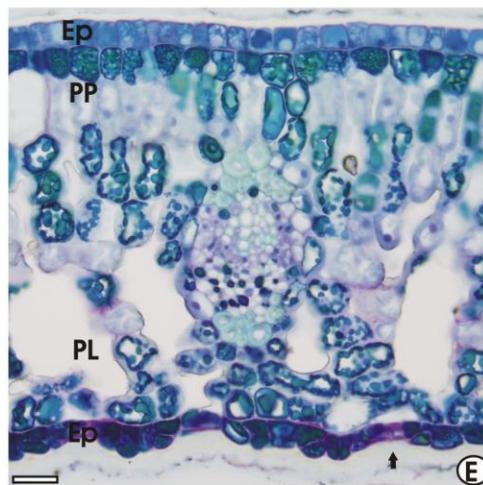
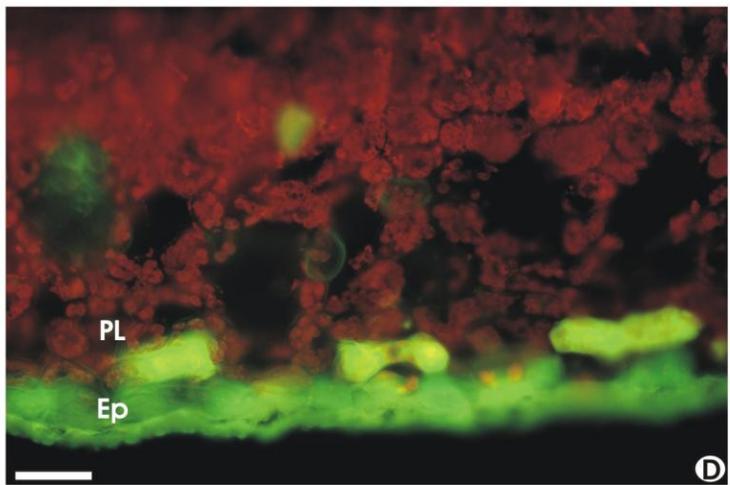
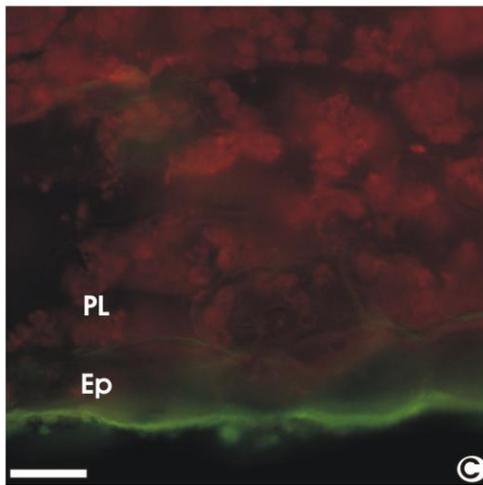
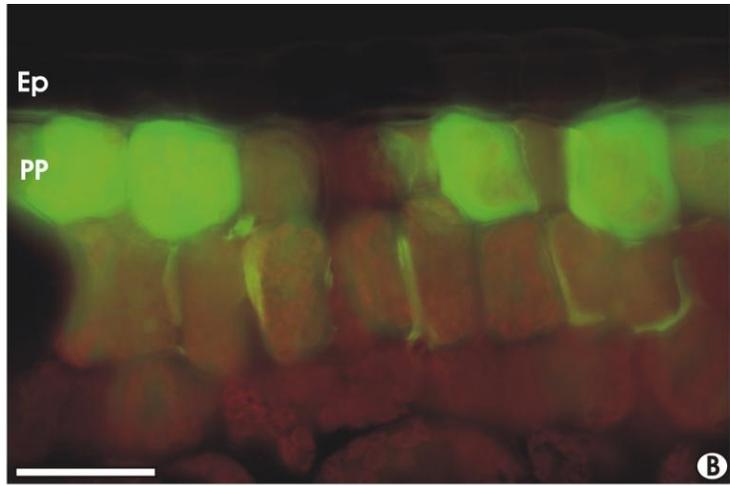
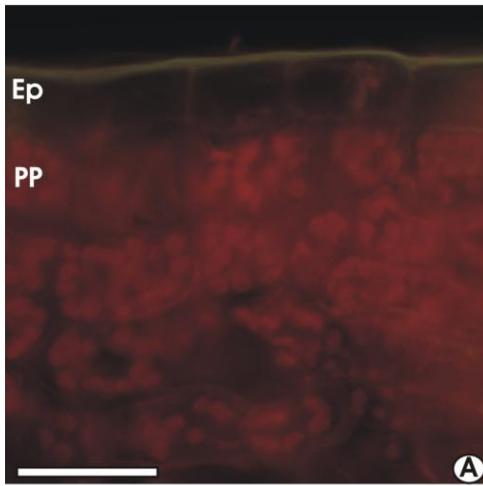
As folhas das espécies estudadas tem grande capacidade de absorver água da neblina. A absorção pode ocorrer diretamente pela cutícula ou pelos tricomas tectores e glandulares. Após a absorção, a água pode ser retida em células especializadas do parênquima paliçádico, como em *D. brasiliensis*, e da região intermediária entre o parênquima paliçádico e lacunoso, como as células coletoras de *M. umbellata*, ou atingir diretamente o xilema, como em *E. erythropappus*. Em *D. brasiliensis*, a entrada de água pelas folhas levou a redução instantânea das taxas de transpiração, levando, inclusive à inversão do fluxo de seiva.

## Figuras



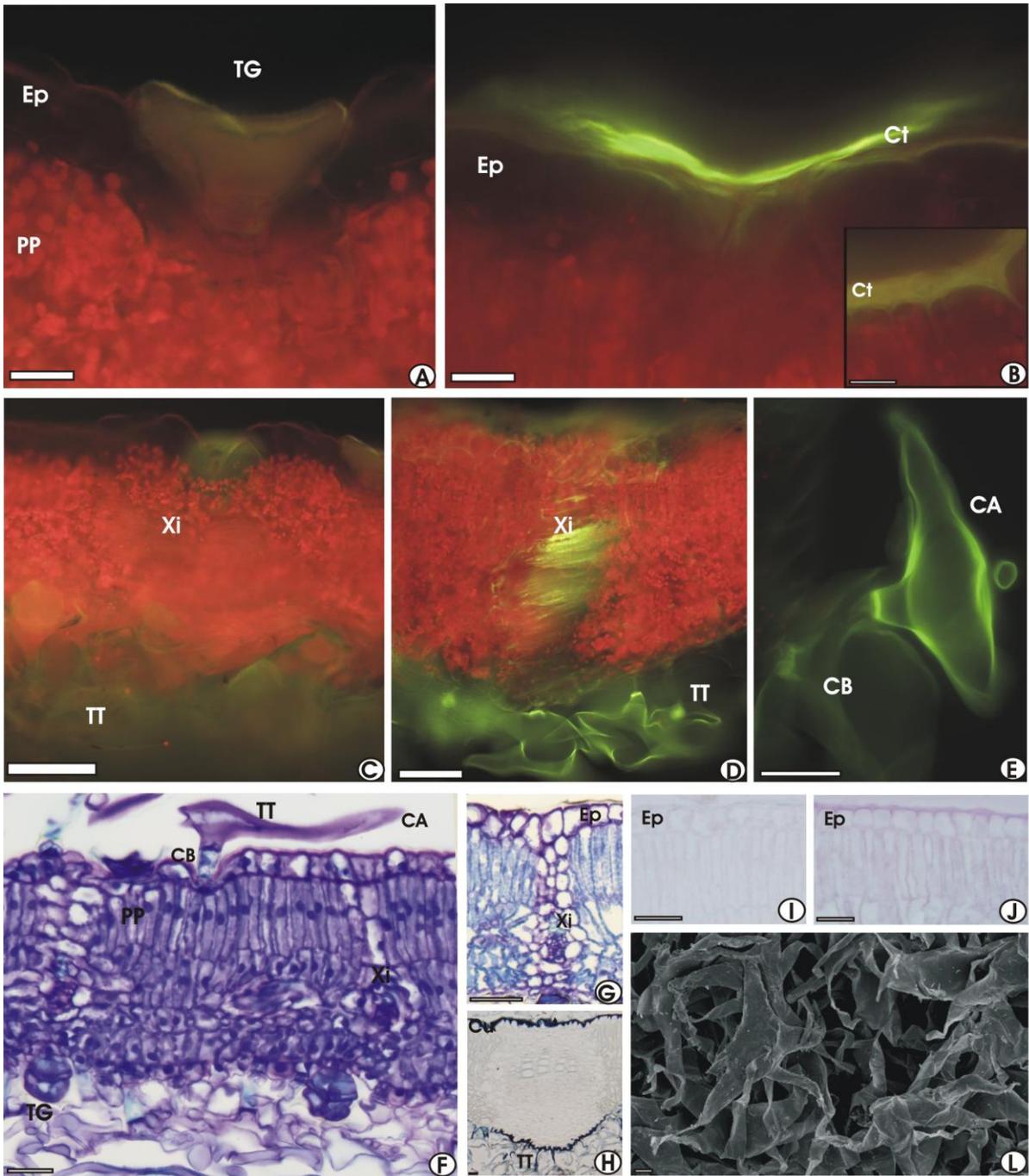
**Figura 1. Composição isotópica do hidrogênio ( $\delta D$ , ‰) da água das folhas das três espécies.**

Note o aumento da  $\delta D$  após nebulização com água enriquecida nas três espécies: *D. brasiliensis*: N=24, KW=14,557, p=0,002; *E. erythropappus*: N=36, KW=17,147, p<0,001; *M. umbellata*: N=24, KW=24,485, p=0,001; G.L.=3 para todas as análises. Categorias dos tratamentos criadas no experimento antes (*Before*) e depois (*After*) da nebulização noturna para o Controle (CT) e o Nebulizado (D). Cada caixa (Box) representa 50% das observações, as barras verticais representam a amplitude da distribuição, os símbolos \* e ° representam valores extremos. A porção “acinturada” da caixa representa o intervalo de confiança de 95% ao redor da mediana. Para letras iguais os grupos não diferem significativamente (Teste Tukey com dados ranqueados).

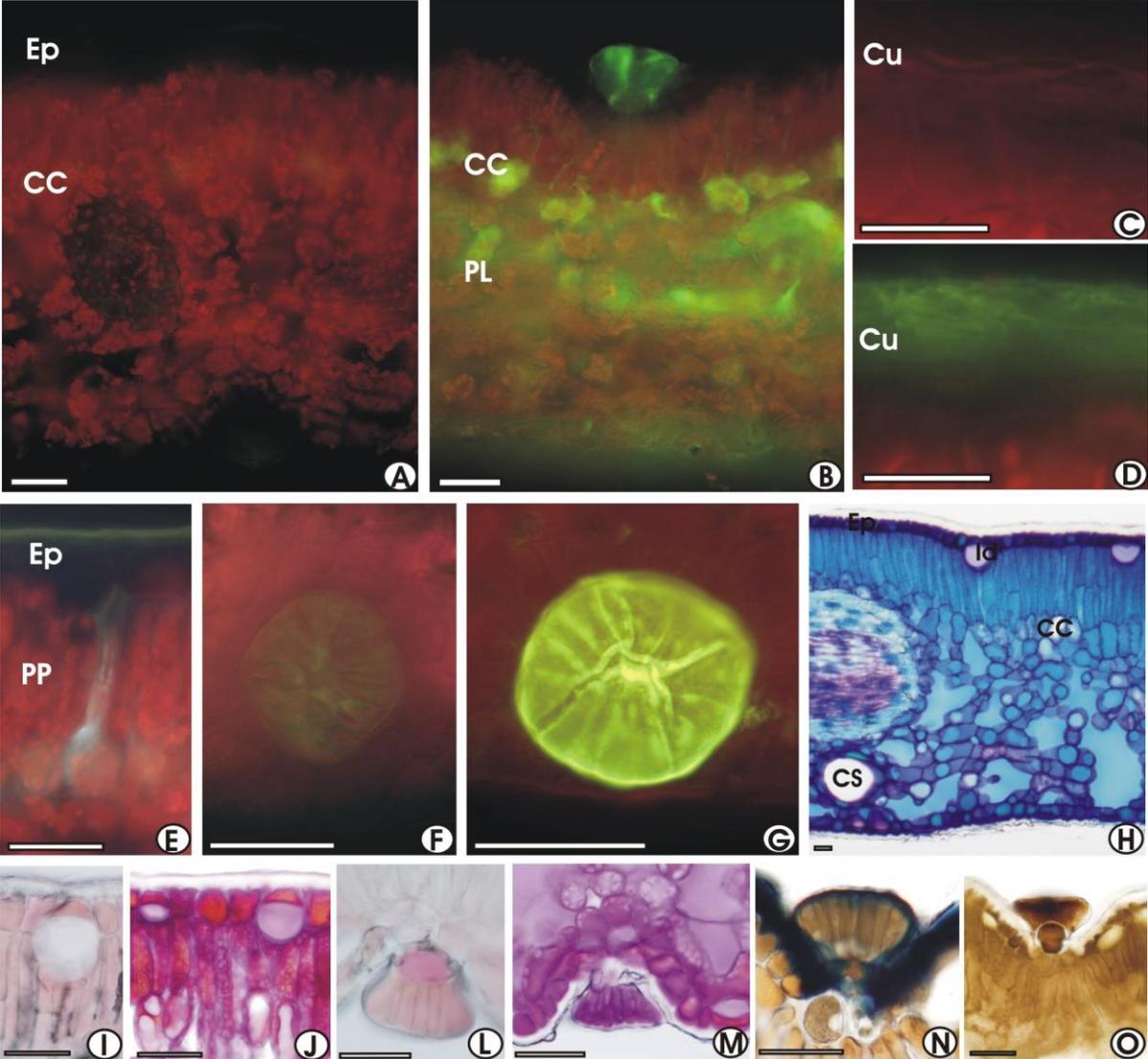


**Figura 2. Secções transversais das folhas usadas em um ensaio com solução aquosa de Lucifer Yellow CH Dilithium salt a 1% por 24 horas nas superfícies adaxiais e abaxiais de *Drimys brasiliensis* Miers – Winteraceae, Mata Nebular (1900 m), Campos de Jordão, SP.**

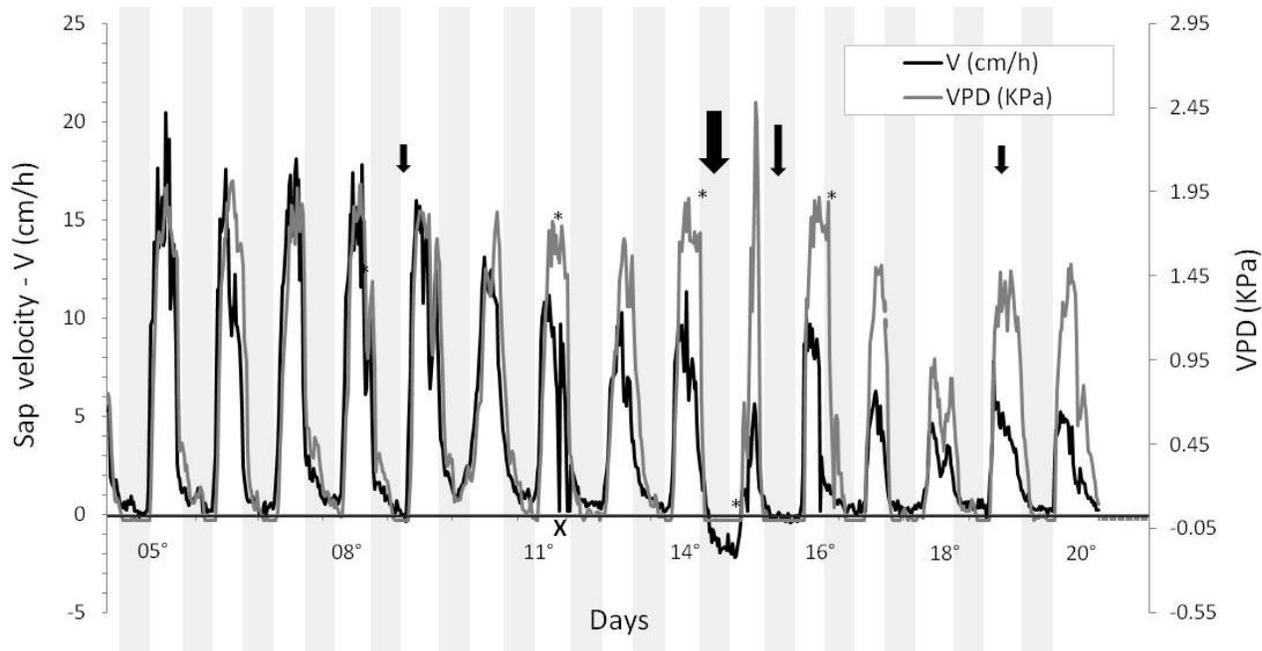
**A.** Autofluorescência da superfície adaxial da folha (Controle). **B.** Concentração do traçador apoplástico fluorescente Lucifer Yellow nas paredes celulares e no interior das células do parênquima paliçádico. **C.** Autofluorescência da superfície abaxial da folha (Controle). **D.** Epiderme da superfície abaxial e parênquima lacunoso com traçador apoplástico. (**A-D:** Corte à mão livre sob Filtro Azul Intenso entre 450 a 490 nm, de barreira de 515 nm; Barras representam 5 µm). **E.** Células epidérmicas e do parênquima paliçádico ricos em compostos secundários (Fixado em FNT e corado em Azul de Toluidina) **F.** Cutícula espessa especialmente na superfície abaxial, com penetração cuticular em alguns ostíolos (folha hipostomática) e presença de idioblastos com reação positiva ao Sudam Black, evidenciando lipídios totais em azul. **G.** Compostos fenólicos heterogêneos na epiderme e no parênquima foliar (reação ao Cloreto Férrico); **H.** Controle da Reação de PAS; **I.** Evidência de compostos polissacarídicos por todo o mesofilo, em especial na epiderme e parênquima paliçádico (Reação de PAS em rosa escuro) (**E-I:** Barras representam 25 µm). Ep: Epiderme unisseriada; PP: Parênquima Paliçádico; PL: Parênquima Lacunoso; Ct: Cutícula; Seta: Estômato.



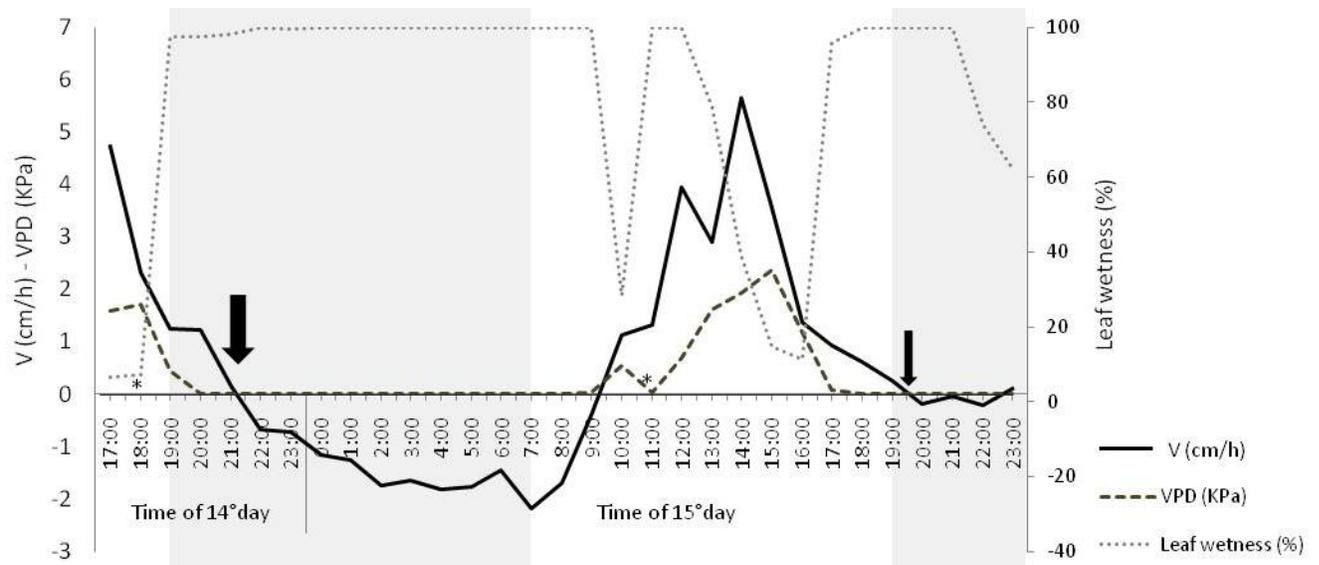
**Figura 3. Secções transversais das folhas usadas em um ensaio com solução aquosa de Lucifer Yellow CH Dilithium salt a 1% por 24 horas nas superfícies adaxiais e abaxiais de *Eremanthus erytropappus* (DC.) MacLeish - Asteraceae, Mata nebular (1700 m), Campos de Jordão, SP. A.** Autofluorescência da superfície adaxial da folha (Controle). **B.** Presença do traçador apoplástico fluorescente Lucifer Yellow na cutícula adaxial da folha especialmente nas depressões dos tricomas glandulares; em detalhe reentrâncias na epiderme. **C.** Autofluorescência da superfície abaxial da folha (Controle). **D.** Tricomas tectores da superfície abaxial, vias apoplásticas da epiderme e do parênquima e xilema com acúmulo do traçador apoplástico. **E.** Detalhe do tricoma tector com acúmulo do traçador na parede celular da célula apical e na região de contato com a célula basal (**A-E:** Corte à mão livre sob Filtro Azul Intenso entre 450 a 490 nm, de barreira de 515 nm; Barras representam 5 µm). **F.** Epiderme unisseriada dotada de tricomas glandulares e tectores (fixado em FAA e corada em Azul de Toluidina) **G.** Extensão da bainha do feixe; **H.** Cutícula espessa revestindo as células epidérmicas, penetrando entre as paredes celulares anticlinais (Sudam Black evidenciando lipídios totais em azul). **I.** Controle da Reação de PAS; **J.** Evidência de compostos polissacarídicos cuticulares (Reação de PAS em rosa mais escuro); **L.** Microscopia de varredura da superfície abaxial repleta de tricomas tectores ramificados (**E-L:** Barras representam 25 µm). Ep: Epiderme; PP: Parênquima Paliçádico; TG: Tricoma glandular senescente; Xi: Xilema; TT: Tricoma tector; CA: célula apical do tricomas tector; CB: Célula basal do tricoma tector; PL: Parênquima Lacunoso; Ct: Cutícula.



**Figura 4. Secções transversais das folhas usadas em um ensaio com solução aquosa de Lucifer Yellow CH Dilithium salt a 1% sob as superfícies adaxiais e abaxiais de *Myrsine umbellata* Mart. - Myrsinaceae, Mata Nebular (1900 m), Campos de Jordão, SP. A. Autofluorescência da superfície adaxial da folha (Controle). B. Presença do traçador apoplástico fluorescente Lucifer Yellow nos tricomas glandulares peltados, por todo o parênquima e concentrado especialmente nas células coletoras (folha mantida por 24 horas com a solução na superfície adaxial). C. Autofluorescência da epiderme e cutícula da superfície adaxial (Controle). D. Presença do traçador na cutícula adaxial (apenas nesse acaso, após 2 horas em contato com a solução de HPTS). E. Detalhe de uma célula coletora com expansão citoplasmática pelo parênquima paliçádico (indicada pela seta) até a região de contato entre duas células epidérmicas. F. Autofluorescência do tricoma glandular da superfície abaxial (visão frontal). G. Presença do traçador na superfície do tricoma glandular abaxial após 24 horas em contato com a solução (visão frontal). (A-G: Corte à mão livre sob Filtro Azul Intenso entre 450 a 490 nm, de barreira de 515 nm, exceto E. sob excitação U.V. entre 340 a 380 nm e filtro de barreira 400 nm. Barras representam 5 µm). H. Estrutura foliar dotada de epiderme unisseriada, idioblastos e células coletoras entre o parênquima paliçádico e o lacunoso (fixado em FAA e corada em Azul de Toluidina) I. Idioblasto da superfície adaxial e tecidos adjacentes como controle da Reação de PAS. J. Epiderme, idioblastos e parênquima paliçádico ricos em polissacarídios (Reação de PAS em rosa mais escuro). L. Tricoma glandular peltado presente nas duas superfícies como controle da Reação de PAS. M. Tricoma glandular com compostos polissacarídicos (Reação de PAS). N. Tricoma glandular peltado com cutícula menos espessa (Sudam Black evidenciando lipídios totais em azul). O. Tricoma glandular peltado rico em compostos fenólicos (Fixado em FNT) (H-O: Barras representam 25 µm). Ep: Epiderme; CC: Célula coletora; PL: Parênquima Lacunoso; Ct: Cutícula; PP: Parênquima Paliçádico; Seta: Expansão citoplasmática de uma célula coletora pelo parênquima paliçádico.**



**Figura 5. Velocidade do fluxo de seiva de *D. brasiliensis* (Sap velocity: V, cm/h) e déficit de pressão de vapor (VPD, KPa) ao longo dos dias (days) em seca do solo.** Indivíduo de 2 m removido em novembro de 2008 do Parque Estadual de Campos do Jordão e mantido em vaso em casa de vegetação em Campinas, SP. Transpiração noturna (valores positivos da V durante a noite) foi observada com frequência. O maior fluxo reverso de seiva foi observado no 14° dia de seca do solo. Barras sombreadas ao fundo indicam o período noturno. Asteriscos (\*) indicam início dos períodos de nebulização. Setas indicam fluxo reverso de seiva, quanto maior a seta, maior é a intensidade do fluxo reverso, sugerindo absorção pela parte aérea. O sinal “X” no eixo das abscissas indica lacuna dos dados entre o 11° e 12° dia. Linha preta próximo ao eixo horizontal indica fluxo zero.



**Figura 6.** Velocidade do fluxo de seiva de *D. brasiliensis* (*Sap velocity*: V, cm/h) associada à umidade foliar (*Leaf wetness*, %) e ao déficit de pressão de vapor (*VPD*, KPa) ao longo do 14° e 15° dia em seca do solo (horários do dia, “*Time of Day*”). Indivíduo de 2 m removido em novembro de 2008 do Parque Estadual de Campos do Jordão e mantido em vaso em casa de vegetação em Campinas, SP. Dados da noite do 14° dia revelam intenso fluxo reverso de seiva. Barras sombreadas ao fundo indicam o período noturno. Asteriscos (\*) indicam início dos períodos de nebulização. Setas indicam fluxo reverso de seiva, quanto maior a seta, maior é a intensidade do fluxo reverso, sugerindo absorção pela parte aérea. Linha preta no eixo horizontal indica fluxo zero.

## Referências bibliográficas

- Anderson B. (2005) Adaptations to foliar absorption of faeces: a pathway in plant carnivory. *Annals of Botany* 95, 757-761.
- Atkinson M.R., Findlay G.P., Hope A.B., Pitman M.G., Saddler H.D.W. & West K.R. (1967) Salt regulation in mangroves *Rhizophora mucronata* Lam. and *Aegialitis annulata* R. Br. *Australian journal of biological sciences* 20, 589-99.
- Bailey I.W. & Nast C. (1944) The comparative morphology of Winteraceae V. Foliar epidermis and sclerenchyma. *Journal of the Arnold Arboretum* 25, 342-348.
- Bailey I.W. (1944) The development of vessels in angiosperms and its significance on morphological research. *American Journal of Botany* 31, 421-428.
- Bailey I.W. (1953) Evolution of the tracheary tissue of land plants. *American Journal of Botany* 40, 4-8.
- Behnke H.D. (1984) Plant trichomes – structure and ultrastructure: general terminology, taxonomic applications and aspects of trichome – bacteria interaction in leaf tips of *Dioscorea*. In *Biology and chemistry of plant trichomes* (Eds Rodrigues E., Healey P. L. & Mehta I.). Plenum Press, New York/USA.
- Benzing D.H., Henderson K., Kessel B. & Sulak J. (1976) The Absorptive Capacities of Bromeliad Trichomes. *American Journal of Botany* 63, 1009-1014.
- Benzing D.H. & Pridgeon A.M. (1983) Foliar Trichomes of Pleurothallidinae (Orchidaceae): Functional Significance. *American Journal of Botany* 70, 173-180.
- Bongers J.M. (1973) Epidermal leaf characteristics of the Winteraceae. *Blumea* 21, 381-411.
- Boucher J.F., Munson A.D. & Bernier P.Y. (1995) Foliar absorption of dew influences shoot water potential and root growth in *Pinus strobes* seedlings. *Tree Physiology* 15, 815-823.
- Boyce R.L., McCune D.C. & Berlyn G.P. (1991) A comparison of foliar wettability of red spruce and balsam fir growing at high elevation. *New Phytologist* 117, 543-555.

- Bregman R. & Graven P. (1997) Subcuticular secretion by seeds improves germination by means rapid uptake and distribution of water. *Annals of Botany* 80, 525-531.
- Breshears D.D., McDowell N.G., Goddard K.L., *et al.* (2008) Foliar absorption of intercepted rainfall improves woody plant water status most during drought. *Ecology* 89, 41-47.
- Brewer C.A & Smith W.K. (1997) Patterns of leaf surface wetness for montane and subalpine plants. *Plant, Cell and Environment* 20, 1-11.
- Burgess S.S.O., Adams M.A., Turner N.C., Ong C.K., Khan A.A.H., Beverly C.R. & Bleby T.M. (2001a) An improved heat pulse method to measure low and reverse rates of sap flow in woody plants. *Tree Physiology* 21, 589-598.
- Burgess S.S.O., Adams M.A., Turner N.C., Ong C.K., Khan A.A.H., Beverly C.R. & Bleby T.M. (2001b) Correction: an improved heat pulse method to measure low and reverse rates of sap flow in woody plants. *Tree Physiology* 21, 1157.
- Burgess S.S.O, Adams M.A, Turner N.C. & Ong C.K. (1998) The redistribution of soil water by tree root systems. *Oecologia* 115, 306-311.
- Burgess S.S.O. & Dawson T.E. (2004) The contribution of fog to the water relations of *Sequoia sempervirens* (D. Don): foliar uptake and prevention of dehydration. *Plant Cell and Environment* 27, 1023-1034.
- Burkhardt J. (2010) Hygroscopic particles on leaves: nutrients or desiccants? *Ecological Monographs* 80, 369-399.
- Carlquist S. (1975) *Ecological Strategies of Xylem Evolution*. University of California Press, Berkeley, CA.
- Canny M.J. (1990) Rates of apoplastic diffusion in wheat leaves. *New Phytologist* 116, 263-268.
- Canny M.J. (1993) The transpiration stream in the leaf apoplast: water and solutes. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 341, 87-100.

- Chamel A., Pineri M. & Escoubes M. (1991) Quantitative determination of water sorption by plant cuticles. *Plant Cell and Environment* 14, 87-95.
- Clark G. (1973) *Staining procedures*. pp.13. 3<sup>ed</sup>. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Curtis L.C. (1943) Deleterious effects of guttated fluid on foliage. *American Journal of Botany* 30, 778-781.
- Cutler D.F., Botha T. & Stevenson D.W. (2008) *Plant anatomy, an applied approach*. pp: 92. Blackwell Publishing Ltd.
- Donato A.M & Morretes B.L. (2005) Estudo anatômico das folhas de *Psidium widgrenianum* Berg. (Myrtaceae), uma potencial espécie medicinal. *Revista Brasileira de Farmácia* 86, 65-70.
- Dybing C.D. & Currier H.B. (1959) A fluorescent dye method for foliar penetration studies. *Weeds* 7, 214-222.
- Dybing C.D. & Currier H.B. (1961). Foliar penetration by chemicals. *Plant Physiology* 36, 169-174.
- Ehleringer J.R. & Dawson T.E. (1992) Water uptake by plants: perspectives from stable isotope composition. *Plant Cell and Environment* 15, 1073-1082.
- Ehleringer J.R., Roden J. & Dawson T.E (2000) Assessing ecosystem-level water relations through stable isotope ratio analyses, p.: 181-198. In *Methods in ecosystem science* (Eds Sala O., Jackson R., Mooney H.A. & Howarth R.), Springer Verlag, New York/USA.
- Eichert T. & Burkhart J. (2001) Quantification of stomatal uptake of ionic solutes using a new model. *Journal of Experimental Botany* 52: 771-781.
- Eichert T., Kurtz A., Steinerb U. & Goldbach H. (2008) Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and watersuspended nanoparticles. *Physiologia Plantarum* 134, 151-160.

- Ennis V.B.Jr. & Boyd F.T. (1946) The response of kidney-bean & soybean plants to aqueous spray application of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid with & without carbowax. *Botanical Gazette* 107: 552-559.
- Esau K. (1965) *Plant Anatomy*. 2<sup>o</sup>ed. John Wiley & Sons Inc., New York/USA.
- Fahn A. (1986) Structural and functional properties of trichomes of xeromorphic leaves. *Annals of Botany* 57, 631-637.
- Fahn A. (1990) *Plant Anatomy*. 4<sup>o</sup>ed. 588p. Oxford : Butterworth-Heinemann.
- Fahn A., Werker, F. & Ben-Zur P. (1979) Seasonal effects of wounding and growth hormones on the development of traumatic ducts in *Cedrus libani*. *New Phytologist* 82, 537-544.
- Feild T.S., Zwieniecki M.A, Donighue M.J. & Holdbrook M. (1998) Stomatal plugs of *Drimys winteri* (Winteraceae) protect leaves from mist but not drought. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America* 95, 14256-14259.
- Feild T.S & Holbrook N.M. (2000) Xylem sap flow and stem hydraulics of vesselless angiosperm *Drimys granadensis* (Winteraceae) in a Costa Rican elfin forest. *Plant, Cell and Environment* 23, 1067-1077.
- Franke W. (1961) Ectodesmata and Foliar Absorption. *American Journal of Botany* 48, 683-691.
- Franke W. (1964) Role of Guard Cells in Foliar Absorption. *Nature* 202, 1236-1237.
- Franke W. (1967) Mechanisms of foliar penetration of solutions. *Annual Review of Plant Physiology* 18, 281-300.
- Freitas M.F. (2003) Estudos taxonômicos das espécies de *Myrsine* L. (Myrsinaceae) nas regiões sudeste e sul do Brasil. pp.50-83. Tese de doutorado. pp.15-173. UNICAMP, Campinas/SP – Brasil.
- Gouvra E. & Grammatikopoulos G. (2003) Beneficial effects of direct foliar water uptake on shoot water potential of five chasmophytes. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 81, 1280-1286.

- Grammatikopoulos G. & Manetas Y. (1994). Direct absorption of water by hairy leaves of *Phlomis fruticosa* and its contribution to drought avoidance. *Canadian Journal of Botany* 72, 1805-1811.
- Grubb P.J. (1977) Control of Forest Growth and Distribution on Wet Tropical Mountains: with Special Reference to Mineral Nutrition. *Annual Review of Ecology and Systematics* 8, 83–107.
- Grubb P.J. & Whitmore T.C. (1966) A Comparison of Montane and Lowland Rain Forest in Ecuador: II. The Climate and its Effects on the Distribution and Physiognomy of the Forests. *The Journal of Ecology* 54, 303-333.
- Haberlandt G. (1965) *Physiological plant anatomy*. Today and Tomorrow's. New Delhi.
- Haines F.M. (1952) The absorption of water by leaves in an atmosphere of high humidity. *Journal of Experimental Botany* 3, 95-98.
- Hoad S.P., Grace J. & Jeffree C.E. (1997) Humidity response of cuticular conductance of beech (*Fagus sylvatica* L.) leaf discs maintained at high relative water content. *Journal of Experimental Botany* 48, 1969-1975.
- Hoch H.C. (1979) Penetration of chemicals into the *Malus* leaf cuticle. *Planta* 147, 186-195.
- Jagels R. (1991) Biophysical aspects of fog deposition on the needles of three conifers. *Journal of Experimental Botany* 42, 757-763.
- Johansen D.A. (1940) *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book Co., New York, USA.
- Karnovsky M.J. (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cellular Biology* 27, 137-138.
- Katz C., Oren R., Schulze E.D. & Milburn J.A. (1989) Uptake of water and solutes through twigs of *Picea abies* (L.) Karst. *Trees* 3, 33-37.
- Kerstiens G. (1996) Cuticular water permeability and its physiological significance. *Journal of Experimental Botany* 47, 1813-1832.

- Kerstiens G. (2006) Water transport in plant cuticles: an update. *Journal of Experimental Botany* 57, 2493-2499.
- Kramer P. J. (1983) *Water relations of plants*. Academic press inc Ltd. London.
- Lambers H., Chapin III F.S. & Pons T.L. (1998) *Plant Physiological ecology*. Springer, New York/USA.
- Larcher W. (2006) *Ecofisiologia vegetal*. RiMa, São Carlos, SP/Brasil.
- Lawton R.O. & Dryer V. (1980) The vegetation of the Monteverde Cloud Forest Reserve. *Brenesia* 18, 101-116.
- Leyton L. & Armitage, I. P. (1968) Cuticle structure and water relations of the needles of *Pinus radiata* (D. Don). *New Phytologist* 67 (1), 31–38.
- Limm E., Simonin K., Bothman A. & Dawson T. (2009) Foliar water uptake: a common water acquisition strategy for plants of the redwood forest. *Oecologia* 161, 449-459.
- Lorenzi H. (2002) *Árvores brasileiras: manual de identificação de plantas arbóreas nativas do Brasil*. pp. 268 e 368. 4ªed. Editora Plantarum, São Paulo/ SP – Brasil.
- Lorenzi H. & Matos F.J.A. (2002) *Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas*. 512p. Instituto Plantarum, Nova Odessa/SP – Brasil.
- Lyshede O.B. 1978. Studies outer epidermal cell walls with microchannels in a xerophytic species. *New phytologist* 80, 421-426.
- Manguro L.O.A., Midiwo J. O. & Kraus W. (1997) Triterpenoids and steroids of *Myrsine africana* leaves. *Planta medica* 63, 290.
- Martin, J. T. & Juniper, B. E. (1970) *The cuticles of plants*. R & R Clarck, Ltd. Edinburgh, St. Martins's Press, New York/USA.

- Martin C.E. & von Willert D.J. (2000) Leaf epidermal hydathodes and the ecophysiological consequences of foliar water uptake in species of *Crassula* from the Namib Desert in southern Africa. *Plant Biology* 2, 229-242.
- Mastroberti A.A. & Mariath J.E.A. (2008) Development of mucilage cells of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). *Protoplasma* 232, 222-245.
- McManus J.F.A. (1948) Histological and histochemical uses of period acid. *Stain Technology* 23, 99-108.
- Meidner H. & Sheriff D.W. (1976) *Water and Plants* (Tertiary Biology Series). pp.1-135. Blackie, Glasgow and London.
- Metcalf C.R. & Chalk L. (1983) *Anatomy of the dicotyledons – leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses*. Vol.II. Clarendon Press, Oxford, New York - USA.
- Metcalf C. R. (1987) *Anatomy of the dicotyledons: Magnoliales, Illiciales & Laurales (sensu Armen Takhtajan)*. 2<sup>o</sup>ed. Vol.III. Clarendon Press Oxford, New York - USA.
- Miller M., Gardner I.C. & Scott A. (1984) Structure and function of trichomes in the shoot tip of *Ardisia crispa* (Thunb.) A.DC. (Myrsinaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 88, 223-236.
- Monteith J.L. (1995) A reinterpretation of stomatal responses to humidity. *Plant Cell and Environment* 18, 357-364.
- Moran R.C. (2004) *A Natural History of Ferns*. pp.154-177. Timber Press Inc., Portland, USA.
- Munné-Bosch S. & Alegre L. (1999). Role of dew on the recovery of water-stressed *Melissa officinalis* L. plants. *Journal of Plant Physiology* 154, 759-766.
- Munné-Bosch S., Nogues S. & Alegre L. (1999) Diurnal variations of photosynthesis and dew absorption by leaves in two evergreen shrubs growing in Mediterranean field conditions. *New Phytologist* 144, 109-119.

- Nakagawa M., Tanaka K., Nakashizuka T., *et al.* (2000) Impact of severe drought associated with the 1997-1998 El Nino in a tropical forest in Sarawak. *Journal of Tropical Ecology* 16, 355-367.
- O'Brien T.P., Feder N., McCully M.E. (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59, 368-373.
- O'Brien T.P. & McCully M.E. (1981) *The study of plant structure: principles and selected methods*. Termarcaphy PTY. Ltd. Melbourne - Australia.
- Ohri T., Nobira H., Sakata Y. *et al.* (2007) Foliar trichome and aquaporin aided water uptake in a drought-resistant epiphyte *Tillandsia ionantha* Planchon. *Planta* 227, 47-56.
- Ohtani K. & Hostettman K. (1992) Molluscidal and antifungal triterpenoid saponins from the leaves of *Rapanea melanophloeos*. *Planta medica* 58, 708.
- Oliveira R.S., Dawson T.E, Burgess S.S.O. & Nepstad D.C. (2005) Hydraulic redistribution in three Amazonian trees. *Oecologia* 145, 354-363.
- Oliveira R.S, Martinelli L.A., Camargo P., Lara L. & Paes L. (2007) *O papel da neblina como fonte de água nas Florestas Ombrófilas Montanas no Estado de São Paulo*. Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 23 a 28 de Setembro de 2007, Caxambu – MG/Brasil.
- Oparka K.J. & Read E.D. (1994) The use of fluorescent probes for studies of living plant cells. In: *Plant Cell Biology: a practical approach*. (Eds Harris N. & Oparka K.J.). pp. 27-50. Oxford: Oxford University Press.
- Oparka K.J., Robinson D., Prior D.A.M., Derrick P. & Wright K.M. (1988) Uptake of Lucifer Yellow CH into intact barley roots: evidence for fluid-phase endocytosis. *Planta* 176, 541-547.
- Ourcival J.M, Berger A. Le Floch'H E. (1994) Absorption de l'eau atmosphérique par la partie aérienne d'un chaméphyte de La Tunisie présaharienne: *l'Anthyllis henoniana* (Fabaceae). *Canadian Journal of Botany* 72, 1222-1227.

- Phillips D.L. & Gregg J.W. (2001) Uncertainty in source partitioning using stable isotopes. *Oecologia* 127, 171-179.
- Pridgeon A.M. (1981) Absorbing trichomes in the Pleurothallidinae (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 68, 64–71.
- Qiu Y., Hong-lang X., Liang-ju Z., Sheng-cun X., Mao-xian Z., Cai-zhi L. & Liang Z. (2010) Research progress on water uptake through foliage. *Acta Ecologica Sinica* 30, 172-177.
- Savé R., Biel C. & Herralde F. de (2000) Leaf pubescence, water relations and chlorophyll fluorescence in two subspecies of *Lotus creticus* L. *Biologia plantarum* 43, 239-244.
- Segada-Vianna F. & Dau L. (1965). Ecology of the Itatiaia range, Southeastern Brazil. II – Climates. *Arquivo do Museu Nacional* 53: 31-53.
- Schlegel T.K., Schönherr J. & Schreiber L. (2005) Size selectivity of aqueous pores in stomatous cuticles of *Vicia faba* leaves. *Planta* 221, 648-655.
- Scholander P.F., Bradstreet E.D., Hemmingsen E.A & Hammel H.T. (1965) Sap pressure in vascular plants: Negative hydrostatic pressure can be measured in plants. *Science* 148, 339-346.
- Schönherr J. (1976a) Water permeability of isolated cuticular membranes: the effect of pH and cations on diffusion, hydrodynamic permeability and size of polar pores. *Planta* 128, 113-126.
- Schönherr J. (1976b) Water permeability of isolated cuticular membranes: the effect of cuticular waxes on diffusion of water. *Planta* 131, 159-164.
- Schönherr J. 2000. Calcium chloride penetrates pear leaf cuticles via aqueous pores. *Planta* 212, 112-118.

- Schönherr J., Fernández V. & Schreiber L. (2005) Rates of cuticular penetration of chelated Fe(III): role of humidity, concentration, adjuvants, temperature and type of chelate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 4484-4492.
- Schönherr J. (2006) Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes. *Journal of Experimental Botany* 57, 2471-2491.
- Schreiber L., Skrabs M., Hartmann K.D., *et al.* (2001) Effect of humidity on cuticular water permeability of isolated cuticular membranes and leaf disks. *Planta* 214, 274-282.
- Schreiber L., Krimm U., Knoll D., Sayed, M., Auling G. & Kroppenstedt R.M (2004) Plant–microbe interactions: identification of epiphytic bacteria and their ability to alter leaf surface permeability *New Phytologist* 166, 589-594.
- Schreiber, L. (2005) Polar paths of diffusion across plant cuticles: new evidence for an old hypothesis. *Annals of Botany* 95, 1069-1073.
- Skoss J.D. (1955) Structure and composition of plant cuticle in relation to environmental factors and permeability. *Botanical Gazette* 117, 55-72.
- Simonin K.A., Santiago L.S., Dawson T.E. (2009) Fog interception by *Sequoia sempervirens* (D.Don) crowns decouples physiology from soil water deficit. *Plant Cell and Environment* 32, 882-892.
- Smith A.C. (1943) The American species of *Drimys*. *Journal of the Arnold Arboretum* 24, 1-33.
- Steudle E. & Peterson, C. (1998) Review article: How does water get through roots? *Journal of Experimental Botany* 49, 775-788.
- Stone E.C. (1957) Dew as an ecological factor I: a review of the literature. *Ecology* 38, 407-413.
- Stone E.C. (1963) The ecological importance of dew. *Quarterly Review of Biology* 38, 328-341.
- Van Hove L.W.A, & Adema E.H. (1996) The effective thickness of water films on leaves. *Atmospheric Environment* 30, 2933-2936.

- Wahid, A. (2003) Physiological Significance of Morpho-Anatomical Features of Halophytes with Particular Reference to Cholistan Flora. *International Journal of Agriculture & Biology* 5, 207-212.
- Westhoff M., Zimmermann D., Zimmermann G. *et al.* (2009) Distribution and function of epistomatal mucilage plugs. *Protoplasma* 235, 101-105.
- Widholzer C.F.N. (2005) *Bases anatômicas do transporte de água e solutos através da epiderme foliar: estudos de Sophronitis cernua Ldl. (Orchidaceae)*. pp. 50-83. Tese de doutorado. UFRGS, Porto Alegre/RS – Brasil.
- Wood D. (1970) The role of marginal hydathodes in foliar water absorption. *Botanical Journal of Scotland* 41, 61-64.
- Yates D.J. & Hutley L.B. (1995) Foliar uptake of water by wet leaves of *Sloanea woollsii* an Australian subtropical rainforest tree. *Australian Journal of Botany* 43, 157-167.
- Zimmermann D., Westhoff M., Zimmermann, G. *et al.* (2007) Foliar water supply of tall trees: evidence for mucilage-facilitated moisture uptake from the atmosphere and the impact on pressure bomb measurements. *Protoplasma* 232, 11-34.

## **CAPÍTULO II: O papel da neblina no desempenho ecofisiológico, crescimento e sobrevivência de três espécies lenhosas de Matas Nebulares, SP – Brasil**

### **Resumo**

Embora situadas no Domínio da Mata Atlântica, caracterizada por altos índices pluviométricos anuais, as matas de altitude do sudeste brasileiro são sujeitas a secas sazonais ou esporádicas do solo. Além disso, ambientes montanhosos apresentam altas taxas de radiação e grandes amplitudes térmicas diárias que intensificam o déficit hídrico. Nos períodos de baixa precipitação, eventos de neblina podem constituir uma importante fonte de água para as plantas nestes ambientes, quando absorvida pelas raízes superficiais e/ou diretamente pelas folhas. Nesse contexto, avaliamos o papel da neblina no desempenho ecofisiológico, crescimento e sobrevivência de três espécies lenhosas comuns nas matas nebulares da Serra da Mantiqueira: *Drimys brasiliensis*, *Eremanthus erythropappus* e *Myrsine umbellata*. Experimentos de borrifação de ramos demonstraram aumento imediato no *status* hídrico foliar nas três espécies, benefício também observado em um experimento de longo prazo em casa de vegetação. Depois de dois meses, plantas que tiveram a parte aérea expostas à neblina apresentaram aumento do potencial hídrico foliar, fotossíntese e condutância estomática em relação às plantas submetidas à exclusão total de água. As espécies apresentaram respostas diferentes aos tratamentos. *D. brasiliensis* teve 100% de mortalidade com a redução do conteúdo de água no solo (SWC) em um mês em seca. As plantas nebulizadas, em contrapartida, apresentaram SWC mais constantes, sugerindo que a neblina é utilizada como fonte de água para a transpiração. *E. erythropappus* foi a única espécie com taxas de crescimento e sobrevivência similares entre os tratamentos e os benefícios da neblina foram evidentes somente após 50 dias. Em *M. umbellata*, o SWC diminuiu nos tratamentos de seca e neblina, mas somente as nebulizadas não apresentaram reduções no *status* hídrico e nas trocas gasosas. Nessa espécie, a água da neblina causa um desacoplamento das relações hídricas e das trocas gasosas da planta em relação à água no solo.

Palavras-chave: absorção foliar de água, estresse hídrico, relações hídricas, *Drimys brasiliensis*, *Eremanthus erythropappus*, *Myrsine umbellata*

## Abstract

Tropical forests are characterized by high annual rainfall but seasonal and sporadic droughts are common, especially in mountainous environments such as cloud forests in southeastern Brazil. Mountain tops are also subjected to high radiation loads and daily swings in temperature, which can intensify soil water deficit. Fog is a common phenomenon in these environments and can be an important water source for plants. In this study we evaluated the consequences of foliar uptake of water in ecophysiological performance, growth and survival on three common woody species from Brazilian cloud forests: *Drimys brasiliensis*, *Eremanthus erythropappus* and *Myrsine umbellata*. Experiments using sprayed water on isolated branches showed an immediate increase in leaf water *status* in the three species, a benefit also observed in a long-term experiment. After two months, plants under the fog treatment improved leaf water potential, photosynthesis and stomatal conductance in relation to plants exposed to drought in a greenhouse experiment. Species responses to the treatments were different. *D. brasiliensis* had a 100% mortality after a month under drought. Soil water content (SWC) of fogged plants maintained constant throughout the experiment, suggesting that fog water might have been used as the main water source for transpiration during this period. *E. erythropappus* was the only species with similar growth and survival rates in all treatments and fog water had a beneficial effect only after 50 days. For *M. umbellata*, SWC decreased substantially in the drought and fog treatments but no decrease in water potential, photosynthesis and stomatal conductance was observed. For this species, fog water deposition caused a decoupling of foliar water relations and gas exchange from soil water availability. We demonstrated that the three cloud forest woody species can absorb water directly through their leaves during fog deposition, allowing shoot rehydration and improving ecophysiological performance, growth and survival when soils are dry.

Key words: foliar water uptake, fog, drought stress, ecophysiological performance, water relations, survival, *Drimys brasiliensis*, *Eremanthus erythropappus*, *Myrsine umbellata*

## Introdução

Florestas tropicais não apresentam homogeneidade no regime de chuvas e podem apresentar secas sazonais e interanuais de grande intensidade (Wright & Cornejo 1990; Condit *et al.* 1995; Oliveira *et al.* 2005; Comita & Engelbrecht 2009). Os episódios de secas sazonais, crônicas ou fortuitas (como as proporcionadas pelo El Niño) influenciam a fisiologia, o crescimento e a sobrevivência das plantas, determinando assim a composição e a estrutura de florestas tropicais (Condit *et al.* 1995; Safford 1999; Nakagawa *et al.* 2000; Slik 2004; Nepstad *et al.* 2004; Engelbrecht *et al.* 2005, 2007; Saha *et al.* 2005; Holbrook & Franco 2005; McDoweel *et al.* 2008; Comita & Engelbrecht 2009). Secas constituem uma importante força seletiva de caracteres morfo-fisiológicos de plantas em vários ecossistemas tropicais. Nestes ambientes, as plantas podem apresentar uma gama de respostas adaptativas capacitando-as a sobreviver em situações de baixo conteúdo de água do solo e alta demanda evaporativa da atmosfera, tais como: controle estomático (Fisher *et al.* 2006, 2008), deciduidade (Wright & Cornejo 1990), sistema radicular profundo e redistribuição hidráulica (Oliveira *et al.* 2005). Ainda sim, muitas espécies tropicais apresentam grande vulnerabilidade ao dessacamento, especialmente no estágio de estabelecimento ou quando apresentam pequeno porte (Condit *et al.* 1995; Nepstad *et al.* 2004; Engelbrecht *et al.* 2005; Saha *et al.* 2005; McDoweel *et al.* 2008; Comita & Engelbrecht 2009). Mesmo espécies reconhecidas como tolerantes a seca podem apresentar as mesmas taxas de mortalidade das espécies suscetíveis, não apresentando, necessariamente, adaptações morfo-fisiológicas que lhes conferiram maior resistência, mas sim, uma vantagem numérica por terem maior densidade de plântulas no mesmo habitat (Comita & Engelbrecht 2009).

O fechamento estomático é uma das primeiras respostas das plantas à seca e tem sido amplamente estudado em espécies de diversos ecossistemas (Schulze 1986; Jones & Sutherland 1991; Cornic 2000; Lawlor & Cornic 2002; Fisher *et al.* 2006). Esse mecanismo é mediado pelo hormônio ácido abscísico e tem consequências importantes por limitar de forma imediata e reversível as trocas de gases entre o interior da folha e a atmosfera de acordo com mudanças na disponibilidade hídrica (Schulze 1986; Cornic 2000). O fechamento restringe os danos provocados pela desidratação uma vez que o potencial de transpiração nas folhas é muito maior

do que a capacidade de abastecimento e/ou armazenamento de água (Schulze 1986; Taiz & Zeiger 2006). Até mesmo espécies amazônicas demonstraram regulação estomática durante a estação seca, em que a abertura estomática reduz e/ou fecha, favorecendo a manutenção do potencial hídrico foliar, o que as caracteriza como isohídricas (Fisher *et al.* 2006).

Espécies menos capazes de manter os mesmos níveis do potencial hídrico apresentam redução de forma gradual dos valores foliares quanto menor a disponibilidade de água no solo, pois demonstram maior dependência do abastecimento contínuo de água no sistema solo-raiz-parte aérea para a recuperação do *status* hídrico (Schulze 1986; Sperry *et al.* 2002). Valores muito negativos de pressão hídrica no xilema podem levar ao potencial hídrico crítico (ponto crítico) em que a diminuição da pressão apoplástica e da condutividade hidráulica levam a cavitação (Hacke & Sperry 2001; Sperry 2003; McDowell *et al.* 2008) pela formação de bolhas de (embolias) ar nas conexões de pontoações e placas perfuradas entre os elementos traqueais do xilema (Hacke *et al.* 2001). A embolia pode interromper total ou parcialmente o transporte de água, intensificando ainda mais o déficit hídrico nos tecidos adjacentes, provocando a perda da condutividade hídrica (cavitação) (Hacke & Sperry 2001; Sperry 2003). Os condutos do xilema das folhas são os primeiros a sofrerem os efeitos da cavitação que podem ser propagados por todo o sistema hidráulico (Hacke & Sperry 2001; Sperry 2003).

Para reduzir os efeitos nocivos das secas prolongadas do solo, as espécies vegetais podem fazer uso de fontes alternativas de água por meio de diferentes mecanismos e serem beneficiadas pela manutenção do desempenho ecofisiológico em níveis favoráveis, que garantem a sobrevivência. Fontes alternativas de água podem desempenhar um papel ecológico relevante mesmo em ambientes tropicais, onde a água pode estar presente, mas nem sempre se encontra prontamente disponível às raízes (Oliveira *et al.* 2005). Ambientes tropicais de grandes altitudes, por exemplo, podem ser mais áridos que ambientes de mesma altitude situados em latitudes médias devido às altas demandas evaporativas e baixa pluviosidade (Leuschener 2000). Nestes ambientes há a formação frequente de eventos de neblina mesmo durante os períodos de secas, como ocorre nas formações alto-montanas da Serra do Mar e da Serra da Mantiqueira (Safford 1999; Oliveira *et al.* 2007; Westhoff *et al.* 2009; WWF 2010), o que pode representar uma proporção significativa do total de água disponível para a vegetação (Weaver 1972; Vogelmann

1973; Zadroga 1981; Cavelier & Goldstein 1989; Gordon, Herrera & Hutchinson 1994; Cavelier, Solis & Jaramillo 1996; Clark *et al.* 1998; Holder 2004, 2006; McJannet, Wallace & Reddell 2007). Em Campos do Jordão a frequência de formação de neblina de origem orográfica é elevada durante o ano inteiro, devido às massas de ar frio vindas do Sul que não se dissolvem rapidamente e, especialmente nos períodos de seca, durante o inverno (Safford 1999; WWF 2010). Em Itatiaia, na região da Serra da Mantiqueira, a aproximadamente 100 km de Campos do Jordão, a neblina ocorre em 218 dias no ano e a umidade média mensal é de cerca de 65 a 90% a 2199 m de altitude (Segadas-Vianna & Dau 1965). Além das secas sazonais, esses ambientes também estão sujeitos a geadas, que agravam o déficit hídrico por congelamento (Hacke & Sperry 2001), sendo bastante comuns no inverno seco em Campos do Jordão (em torno de 40 dias ao ano a 1630m de altitude) (Segadas-Vianna & Dau 1965; Nimer 1977; Safford 1999).

A água atmosférica pode condensar e adsorver nas folhas e troncos das árvores e escoar para o solo, podendo ser absorvida pelas raízes superficiais ou mesmo rehidratar os tecidos aéreos de forma direta pela absorção foliar, como verificado nas Florestas de Sequóia californianas (Dawson 1998; Burgess & Dawson 2004; Simonin, Santiago & Dawson 2009). A interceptação da neblina chegou a contribuir com até mais de 66% do aporte de água mensal nas florestas tropicais australianas a 1000 m de altitude (McJannet *et al.* 2007). Inclusive, a precipitação por neblina pode tornar-se mais frequente e intensa durante a estação seca, como se observou nas florestas tropicais nebulares da Guatemala, contribuindo com cerca de 1 mm por dia para o ciclo hidrológico de floresta a 2550 m, o dobro em relação a estação chuvosa (Holder 2004). Diversos fatores locais influenciam a quantidade de neblina que é retida nos ecossistemas, como a altura e a arquitetura do dossel (Kittredge 1948; Kimmins 1987; Hutley *et al.* 1997), a velocidade e frequência dos ventos (Lovett *et al.* 1982; McJannet *et al.* 2007), a declividade do terrenos (Ellis 1971; Zadroga 1981), a natureza das superfícies foliares (Smith & McClean 1989) e a orientação dos ramos e folhagens (Cavelier & Goldstein 1989).

A formação frequente de neblina durante as estações secas afetam positivamente o balanço hídrico da vegetação, pois essa umidade retida sobre as folhas pode reduzir ou prevenir a transpiração e até servir como fonte alternativa de água em situações de estiagem prolongada em diversos ecossistemas, mesmo sendo baixas as quantidades de água interceptadas e absorvidas

pelas folhas (Slatyer 1960; Rundel 1982; Burgess & Dawson 2004; Oliveira *et al.* 2005; Breshears *et al.* 2008; Simonin *et al.* 2009; Limm *et al.* 2009). Nem todos os eventos de precipitação chegam a aumentar significativamente o conteúdo de água no solo, o que faz da absorção de água pelas folhas uma estratégia ecologicamente relevante, podendo ocorrer em grande parte da comunidade (Limm *et al.* 2009). Maior conservação de água pela supressão da transpiração e maior absorção de água pelas folhas podem ocorrer quanto mais intensa e prolongada for a seca, como se observou em *Juniperus monosperma* (Breshears *et al.* 2009). No entanto, o papel ecológico desses eventos ainda é desconhecido para as vegetações brasileiras. Resultados de análise isotópica de  $^{18}\text{O}$  das fontes de água no ambiente de Florestas Ombrófilas Montanas da Serra do Mar e da água do xilema de algumas espécies revelaram um enriquecimento após o evento natural de neblina, sugerindo que a absorção direta de neblina pelas folhas pode ser uma importante via de aporte hídrico para as espécies desse ecossistema (Oliveira *et al.* 2007).

A absorção de água pelas folhas ocorre quando gotas de água atmosférica são retidas na parte aérea da planta e se movem através do gradiente de pressão hídrica (Rundel 1982), passando do exterior para dentro do tecido foliar. Dessa forma, a hidratação do tecido foliar ocorre imediatamente, aumentando o conteúdo de água e o potencial hídrico foliar (Grammatikopoulos & Mannetas 1994; Bourcher *et al.* 1995; Yates & Hutley 1995; Gouvra & Grammatikopoulos 2003; Breshears *et al.* 2008; Limm *et al.* 2009). Além de contribuir para a recuperação do *status* hídrico dos tecidos locais e adjacentes, a água absorvida pelas folhas pode beneficiar o desempenho ecofisiológico proporcionando maiores trocas gasosas (Grammatikopoulos & Mannetas 1994; Martin & von Willert 2000; Simonin *et al.* 2009), crescimento e sobrevivência (Stone 1957b; Bourcher *et al.* 1995).

Há previsões de que a neblina se tornará menos frequente em climas futuros, o que nos remete ao grande desafio atual de entender como florestas tropicais montanas responderão a climas cada vez mais secos (Still, Foster & Schneider 1999; Pounds *et al.* 1999; Foster 2001; Colwell *et al.* 2008). Pouco se sabe sobre as respostas da vegetação a mudanças na qualidade e na forma de água disponível nos ecossistemas tropicais pelas alterações climáticas (McJannet *et al.* 2007). No entanto, esse conhecimento é fundamental para o desenvolvimento de modelos de

previsão mais robustos (McJannet *et al.* 2007). É possível que a contínua deposição de água da atmosfera saturada sobre as superfícies sólidas durante períodos de seca possam influenciar os ciclos hidrológicos e as relações hídricas da vegetação também das matas de altitude atlânticas. Nesses ecossistemas, a absorção da água diretamente pelas folhas pode desempenhar um papel ecológico importante para a manutenção das espécies. Logo, a redução dos eventos da neblina pode levar à mortalidade e à extinção parte da flora local em cenários climáticos futuros, que já é, reconhecidamente, de refúgio (Veloso *et al.* 1991; Falkenberg & Voltolini 1995; Foster 2001).

Nesse contexto, estudamos o papel da neblina no desempenho ecofisiológico de três espécies lenhosas comuns nas matas nebulares de Campos do Jordão, situadas na Serra da Mantiqueira: *Drimys brasiliensis* (Winteraceae), *Eremanthus erythropappus* (Asteraceae) e *Myrsine umbellata* (Myrsinaceae). Por meio de experimentos de borrifação e nebulização avaliamos a capacidade de absorção de água pelas folhas e sua contribuição ao desempenho ecofisiológico em relação às plantas controle. Sendo a neblina uma importante fonte de água para plantas de matas de altitude, é possível que essas espécies sejam favorecidas quanto ao *status* hídrico e às trocas gasosas pelo uso direto dessa fonte alternativa de água, beneficiando o crescimento e a sobrevivência dessas espécies quando em secas prolongadas.

## **Material e métodos**

### *Experimento de borrifação de curta duração*

O objetivo desse experimento foi avaliar o benefício da borrifação de água nas folhas sobre o *status* hídrico foliar das três espécies. Medimos o conteúdo de água foliar de 10 amostras de folhas maduras e completamente expandidas e o potencial hídrico de duas ou três folhas destacadas de ramos cortados aos pares de 10 a 13 indivíduos de cada espécie no ambiente natural. Esses ramos foram igualmente condicionados em sacos plásticos e no escuro até o início do experimento. Realizamos esse experimento para cada espécie em dias diferentes entre outubro e novembro de 2008. Todos os ramos apresentavam-se sob as mesmas condições de exposição ao sol no período das coletas entre 8h e 11h. Um ramo de cada par foi submetido à borrifação

(*spray*, Tratamento SP) e o outro foi mantido como controle, a seco (Tratamento CT), depois de serem cortados para impedir a reidratação pelo xilema (Breshears *et al.* 2008). Ambos foram condicionados à sombra em sacos plásticos pretos para evitar perdas excessivas por transpiração por 1 a 2 horas (adaptado de Breshears *et al.* 2008).

O conteúdo de água foliar (*foliar water content* – FWC), em %, foi obtido apenas depois do período de ensacamento para compararmos se houve incremento ou perda de água no tecido foliar de forma relativa entre o tratamento de borrifação (SP) e controle (CT) utilizando folhas destacadas e secas com papel e toalha de algodão no laboratório do Departamento de Biologia Vegetal/ UNICAMP. O cálculo do FWC seguiu a equação utilizada por Chen *et al.* (2005):  $FWC(\%) = [\text{peso da folha fresca} - \text{peso da folha seca} / \text{peso da folha fresca}] \times 100$ , para 10 folhas do par de ramo submetido ou não a borrifação.

Embora o FWC indique a quantidade de água total no tecido, o parâmetro que reflete o *status* hídrico da planta é o potencial hídrico, sendo esse coletado imediatamente após os tratamentos em campo. Esta variável é determinada pelo balanço entre a perda de água por transpiração, a disponibilidade de água no solo (potencial de água do solo) e a arquitetura hidráulica da planta (Bhaskar & Ackerly 2006). Assim, a fim de avaliar os efeitos da borrifação registramos de duas a três medidas do potencial hídrico foliar ( $\Psi_L$ ) em cada ramo, em unidade de pressão MPa, antes e depois do ensacamento usando uma Bomba de Scholander (*Model 1000, PMS, USA*). Os dados foram apresentados em quatro categorias: Borrifação antes do ensacamento (*SP-before*), Controle antes do ensacamento (*CT-before*), Borrifação depois do ensacamento (*BO-after*) e Controle depois do ensacamento (*CT-after*). Amostras de cada espécie utilizadas nesse experimento foram herborizadas e armazenadas no Herbário UEC (Nº de tomo 151945/46/50/52/53).

Os dados do conteúdo de água foliar (FWC) e do potencial hídrico foliar ( $\Psi_L$ ) das três espécies não apresentaram distribuição normal, pelos Testes Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Os dados do FWC não apresentaram homocedasticidade dos valores de resíduos pelos Testes de Levene e Bartley e, assim, optamos pela ANOVA de medidas repetidas em bloco (considerando o indivíduo), usando dados ranqueados no software R 2.10.1. Os dados de  $\Psi_L$  apresentaram homocedasticidade dos valores de resíduos pelos mesmos testes, e optamos pela

ANOVA de medidas repetidas para os dois fatores: tratamento (CT e SP) e período (antes e depois), seguido do teste de Bonferroni para comparar o efeito da borrifação em relação aos ramos controle após o condicionamento. As análises descritivas e os gráficos foram realizados no *Systat 11* (Systat Software Inc., Point Richmond, CA).

### *Experimento de longa duração*

Instalamos um experimento em casa de vegetação visando avaliar os efeitos da absorção de água de neblina pelas folhas sobre a fotossíntese, condutância estomática, eficiência do uso da água, potencial hídrico, longevidade foliar, crescimento e sobrevivência. Ao longo de dois meses acompanhamos indivíduos submetidos a três tratamentos: 1. Irrigação, com regas diárias do solo; 2. Seca, com exclusão total de água; e 3. Neblina, com exposição exclusiva da parte aérea à neblina artificial.

Os indivíduos de *E. erythropappus* e *M. umbellata* utilizados nesse experimento foram trazidos da casa de vegetação do PECJ (a 1500 m de altitude) em junho de 2009, com aproximadamente dois anos e meio de vida. Os indivíduos de *D. brasiliensis* foram coletados do subosque de uma mata dentro do parque e não pudemos determinar suas idades. Todas as plantas foram transferidas para sacos de mudas padronizados de 48 X 64 cm com solo homogeneizado da mistura de 2/3 de terra vegetal e 1/3 de areia e, aclimatadas por um mês na casa de vegetação do Departamento de Biologia Vegetal IB/ UNICAMP até o início do experimento.

Ao longo do experimento, realizamos oito medições consecutivas de fotossíntese, condutância estomática, transpiração, potencial hídrico de madrugada e ao meio dia em cinco a oito indivíduos de cada espécie por tratamento. Ainda acompanhamos a dinâmica de área foliar (pela estimativa da área foliar total inicial e final), o diâmetro do caule, altura máxima e a taxa de mortalidade dos indivíduos em cada tratamento. Paralelamente, submetemos cinco a seis indivíduos de porte maior (acima de 60 cm) de *M. umbellata* para avaliarmos os efeitos dos tratamentos no crescimento (área foliar total, diâmetro do caule, altura) e mortalidade em plantas maiores.

Antes de iniciar o experimento, todas as plantas foram irrigadas até a saturação completa do solo. Fechamos completamente a porção inferior das plantas a serem nebulizadas, após uma semana sem receber água no solo, em seus respectivos vasos com sacos de plásticos resistentes, fitas adesivas e aplicamos parafilme ao redor do tronco, impedindo a entrada de água por escoamento. Fizemos o mesmo isolamento do solo nas plantas do tratamento de seca, no entanto, sem aplicar o parafilme para não impedir completamente a transpiração do solo na simulação mais próxima à situação de estiagem. Reformamos semanalmente as embalagens de isolamento, evitando-se assim a infiltração da água nebulizada por danos na vedação e proporcionando aeração ao solo.

Iniciamos os tratamentos dia 15/08/2009, data categorizada como dia zero, a partir do qual realizamos uma série de oito medições ao longo dos dois meses dos parâmetros que refletem o desempenho ecofisiológico. Essas medições foram obtidas no dia zero e no 6°, 19°, 31°, 39°, 45°, 51° e 59° dia após o início dos tratamentos. As plantas nebulizadas (Tratamento Neblina) foram distribuídas assistematicamente em três câmaras de nebulização montadas em estrutura de PVC (1,5 X 1,0 X 0,8 m), para que pudessem ser submetidas a uma atmosfera saturada. Para a nebulização, utilizamos um umidificador ultra-sônico que emite 80% de partículas de água menores que 10 µm por processo de cavitação por som (*Waterclear Premium, Soniclear, SP - Brasil*). A exposição à neblina era realizada três vezes por semana durante as 12 horas noturnas. Pela manhã, retornávamos os vasos às bancadas onde eram distribuídos assistematicamente junto às plantas de irrigação e seca, evitando-se assim efeitos de uma potencial heterogeneidade microclimática dentro da casa de vegetação.

Utilizando a Bomba de Scholander (*Model 1000, PMS, USA*) (Scholander *et al.* 1965) obtivemos o potencial hídrico da madrugada (*Water potential at predawn,  $\Psi_{PD}$* ) e o potencial hídrico ao meio dia (*Water potential at midday,  $\Psi_{MD}$* ) (em unidade de pressão MPa) em cada um dos oito dias de medições utilizando uma folha para cada medição em cinco indivíduos separados apenas para obtenção do potencial hídrico. O  $\Psi_{PD}$  e o  $\Psi_{MD}$  são medidas da tensão de água nos vasos do xilema.  $\Psi_{PD}$  expressa o *status* hídrico da planta quando os tecidos estão supostamente reidratados e  $\Psi_{MD}$  no período em que o déficit de pressão atmosférica é máximo no dia (Bhaskar & Ackerly 2006). As medidas de potencial hídrico foram realizadas em cinco

indivíduos por tratamento, sorteados de um conjunto de 13 a 18 indivíduos de cada espécie por tratamento, reservados apenas para medições com a Bomba de Scholander. Como são medidas destrutivas, optamos por reservar um número maior de indivíduos para as medidas de potencial hídrico, para minimizar reduções drásticas na área foliar das plantas analisadas quanto às trocas gasosas e à eficiência do uso de água.

As medidas de trocas gasosas foram realizadas, sempre que possível, nas mesmas folhas maduras, totalmente expandidas (não tenras), previamente marcadas em cada indivíduo, utilizando um analisador de gás por infravermelho (IRGA) (*Analytical Development Company Limited, ADC BioScientific LCpro<sup>+</sup>*), nas condições de temperatura e umidade da casa de vegetação. Registramos a taxa fotossintética (A) que indica a taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> por unidade de área foliar ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de CO<sub>2</sub>), condutância estomática (gs) ( $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de H<sub>2</sub>O) e a taxa de transpiração (E) ( $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) em cada dia de amostragem na folha marcada dos mesmos cinco a oito indivíduos também utilizados para obtenção dos parâmetros de crescimento. Em cada dia de amostragem, obtivemos três a seis medidas dos parâmetros de trocas gasosas entre 8h00 e 9h30 para *D. brasiliensis* e entre 10h e 12h30 para *E. erythropappus* e *M.umbellata*. Esse intervalo do dia foi previamente determinado para cada espécie por uma curva diária de fotossíntese, por representar o período de maior atividade fotossintética. Curvas de resposta à luz também foram feitas para determinar qual o intervalo de radiação fotossinteticamente ativa corresponde à fotossíntese máxima para cada espécie. Assim, utilizamos uma fonte luminosa externa acoplada a câmara foliar para padronizar a radiação fotossinteticamente ativa (*Photosynthetically active radiation*, PAR em  $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) em 900  $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$  para as medições de *D. brasiliensis* e 600  $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  para *M.umbellata* e *E. erythropappus*. Para comparação dos dados adquiridos pelo IRGA, realizamos quatro medições da condutância estomática (também em folhas marcadas) ao longo dos dois meses com o porômetro de equilíbrio dinâmico (*LI1600 Steady State Porometer, Licor Inc.*). Esse equipamento calcula a taxa de transpiração (E, em  $\mu\text{g cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e a resistência estomática ao fluxo de difusão do vapor de água (rs, em cm/s) com base no monitoramento contínuo da temperatura, umidade relativa e fluxo de ar seco. A partir dos dados de A e E calculamos a eficiência do uso de água (*water-use efficiency*, WUE) ao longo do experimento nas três espécies. WUE é

representa o ganho de carbono durante a fotossíntese por perda de água na transpiração (A/E) (Lambers *et al.* 2006). A WUE expressa quantitativamente o comportamento momentâneo das trocas gasosas na folha e varia entre e dentro das espécies vegetais (Larcher 2006).

Avaliamos os seguintes parâmetros de crescimento: 1) área foliar total (LA) (em cm<sup>2</sup>); 2) altura (h), comprimento da base do tronco previamente marcado até o ápice (em cm) e 3) diâmetro do caule ( $\Theta_{St}$ ) (mm) (apenas na região da base marcada) por serem sensíveis a variações da quantidade de água, especialmente em plantas jovens e pequenas. Para estimar a área foliar total das plantas obtivemos inicialmente a área foliar real de 10 folhas de *M. umbellata* e 25 folhas de *D. brasiliensis* e *E. erythropappus* pelo programa *ImageJ*, a partir de imagens digitalizadas dessas amostras. Em seguida, medimos o comprimento e a largura foliar dessas folhas para multiplicá-los e obter o produto para ser relacionado aos valores a área foliar real anteriormente obtidos. A relação foi dada pela equação de uma regressão linear simples para cada espécie, onde a variável  $x$  é o produto entre comprimento e largura foliar e, a variável  $y$  é a área foliar real. Obtivemos as seguintes equações: *D. brasiliensis*:  $y = 0,909x + 0,7504$ ,  $R^2 = 0,9721$ ,  $N=25$ ; *E. erythropappus*:  $y = 0,9101x + 0,2804$ ,  $R^2 = 0,9894$ ,  $N=25$ ; e *M.umbellata*:  $y = 1062,6x - 2448,6$ ,  $R^2 = 0,9938$ ,  $N=10$ . Assim, estimamos a área foliar total (LA) somando os valores das áreas calculadas pelas equações de cada espécie a partir do produto entre comprimento e largura foliar, compondo assim a variável  $x$ , obtida para todos os indivíduos avaliados quanto ao crescimento.

Taxas de mortalidade foram determinadas para cada espécie para os 18 a 25 indivíduos submetidos a cada tratamento utilizados para as medições do potencial hídrico e para as medições do crescimento e trocas gasosas no final do experimento (dois meses). Também verificamos as taxas de mortalidade para os cinco indivíduos maiores de *M. umbellata* de cada tratamento. Os seguintes critérios foram utilizados para considerar um indivíduo morto: ausência de rebrota após rehidratação no final do experimento; além de perda total ou dessecação completa das folhas, caule seco, apresentando mudança de coloração, especialmente da base para o ápice (de verde para marrom escuro), para *D. brasiliensis*; dessecação completa das folhas com perda parcial, escurecimento do ápice caulinar, seguido de murcha e seca, mudança na coloração do caule (de cinza a preto) para *E.erythropappus*; folhas completamente secas aderidas ao caule,

perda parcial de folhas e caule seco mudando de coloração, do verde para o marrom, para *M. umbellata*.

Temperatura e umidade relativa do ar foram obtidas durante o experimento por sensores *HOBO® Pro Series™ Weatherproof Loggers* e usados para calcular o déficit de pressão de vapor (*Vapour pressure deficit*, VPD em KPa) (Wright *et al.* 2005). Radiação fotossinteticamente ativa (PAR em  $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e umidade foliar (*leaf wetness* em %, apenas nas últimas semanas) também foram obtidas com sensores conectados a um armazenador de dados (*HOBO Micro Station*). O conteúdo relativo de água no solo (*Soil water content*, SWC em %) foi determinado por gravimetria (massa fresca e seca de solo de três amostras assistematicamente coletadas por tratamento), sendo as primeiras medições representativas do solo irrigado até a saturação de cada espécie. As amostras de solo foram removidas dos vasos utilizando um cilindro de PVC e armazenadas em sacos de papel para pesagem imediata. Construimos um gráfico do VPD durante os intervalos das medições dos parâmetros de trocas gasosas das 8h00 às 12h30 e analisamos as variações no VPD entre os dias de medições para os intervalos de cada espécie por Kruskal-Wallis (KW), uma vez que os dados não apresentaram distribuição normal (Teste de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk com  $p < 0,05$ ) e os valores dos resíduos não são homocedásticos (Teste de Levene com  $p < 0,05$ ). Comparamos as categorias pelo método *post hoc* de Tukey utilizando os dados ranqueados para identificar os dias com VPD significativamente diferentes.

Para avaliar o efeito do tempo e dos tratamentos nas variáveis  $\Psi_{PD}$ ,  $\Psi_{MD}$ , A,  $g_s$ , E, WUE e na variável ambiental SWC, usamos ANOVA de medidas repetidas pelo software R versão 2.10.1. Priorizamos apresentar os valores da análise da interação entre os dois fatores (tratamento e os dias de medições da série temporal), pois refletem melhor as condições do desenho experimental; e apresentamos os resultados da análise exclusiva do efeito do tratamento apenas quando os resultados da interação dos dois fatores não foram significativos. Devido ao grande número de combinações, realizamos o teste *post hoc* de Bonferroni apenas nas comparações mais relevantes. Realizamos correlações de Pearson entre os parâmetros ecofisiológicos A e  $g_s$ , por meio do software Systat 11 (*Systat Software Inc., Point Richmond, CA*).

Para as análises dos parâmetros de crescimento, consideramos a diferença entre valores finais e iniciais dos mesmos indivíduos: variação da área foliar total (*Change in LA*), do diâmetro do tronco (*Change in  $\Theta_{st}$* ) e da altura (*Change in h*). Os dados apresentaram distribuição normal (com  $p > 0,05$  pelo Teste de Shapiro-Wilk), exceto *Change in LA* de *M. umbellata*. No entanto, demonstraram homocedasticidade ( $p > 0,05$  pelo teste de Levene) e optamos padronizar todas as análises por ANOVA de um fator, seguido do teste de Bonferroni para o reconhecimento das categorias que diferem utilizando o *Systat 11*. Verificamos a mortalidade de todos os indivíduos expostos aos tratamentos e analisamos as diferenças entre os números de mortos e o número de vivos dos tratamentos de cada espécie utilizando o Teste Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ) no mesmo software. Todos os gráficos gerados nesse experimento foram construídos no *Systat 11* e agrupados no *CorelDRAWN 11* (2002).

## **Resultados**

### *Respostas de curto prazo das espécies à borrifação*

O conteúdo de água foliar (FWC) e o potencial hídrico foliar ( $\Psi_L$ ) aumentaram significativamente em resposta à borrifação nas três espécies (Figura 1 e 2). *D. brasiliensis* apresentou aumento de 2,1% do FWC dos ramos borrifados em relação aos ramos controle (N=13; F=8,303; G.L.=1;  $p=0,001$ ; Figura 1), o que refletiu no aumento do  $\Psi_L$  em 0,39 MPa (N=13; F=71,297; GL=1;  $p < 0,001$ ; Figura 2). Embora *D. brasiliensis* tenha apresentado a maior magnitude de aumento do  $\Psi_L$ , o maior aumento do FWC ocorreu em *E. erythropappus* com incremento médio de 5,9% (N=8; F=3,665; G.L.=1;  $p=0,057$ ; Figura 1), com aumento de 0,24 MPa do  $\Psi_L$  (N=11; F=14,004; GL=1;  $p < 0,001$ ; Figura 2). Todos os ramos apresentavam o mesmo potencial hídrico antes de serem expostos aos tratamentos de borrifação (Bonferroni: *D. brasiliensis*:  $p=0,87$ ; *E. erythropappus*:  $p=0,34$ ; *M. umbellata*:  $p=0,86$ ; G.L=1 para todas as análises; Figura 2).

### *Respostas de longo prazo das espécies à nebulização da parte área*

A nebulização da parte aérea proporcionou melhora do desempenho ecofisiológico em relação à seca, pelo aumento da fotossíntese, condutância estomática, transpiração e do potencial hídrico nas três espécies. Os benefícios foram evidentes também no crescimento e na sobrevivência dos indivíduos nebulizados de *D. brasiliensis* e *M. umbellata* conforme detalhamos a seguir:

#### 1. Potencial hídrico foliar e água no solo em *D. brasiliensis*

A exposição exclusiva da parte aérea à neblina hidratou as folhas, pois os  $\Psi_{PD}$  das plantas nebulizadas foram maiores que os da seca, e semelhantes aos da irrigação em quase todas as medições (Figura 3). Mesmo que não tenhamos encontrado para os valores do  $\Psi_{PD}$  e do  $\Psi_{MD}$  uma interação significativa entre os tratamentos e o tempo decorrido (Tabela 1), o  $\Psi_{PD}$  foi significativamente menor no tratamento de seca quando a série temporal não é considerada na análise (Tabela 1, Bonferroni: entre Seca *versus* Irrigação:  $p=0,029$ ; entre Seca *versus* Neblina:  $p=0,008$ ; não diferindo entre Neblina e Irrigação:  $p=1,00$ ). O *status* hídrico foliar de *D. brasiliensis* foi afetado já no primeiro mês em seca e diferente das outras espécies apresentou, além da redução do potencial hídrico foliar, necrose, perda das folhas mais velhas e mortalidade. A perda de folhas e a mortalidade impossibilitaram a coleta de dados ecofisiológicos em vários indivíduos sob seca após o 39º dia, o que justifica a grande variação e a lacuna dos dados dos potenciais hídricos finais (Figura 3). As folhas que perderam o turgor, mesmo as que apresentavam porções fotossinteticamente ativas, baixaram o potencial a um ponto em que não foi possível obter as medidas de potencial hídrico com a Bomba de Scholander, pois o pecíolo de *D. brasiliensis* colapsa a pressões maiores que -2,5 MPa. As folhas em que eventualmente registramos valores dessa ordem já demonstravam danos por seca irreversíveis com necroses parciais.

As plantas nebulizadas também mantiveram o conteúdo relativo de água no solo (SWC) em níveis significativamente maiores que o tratamento de seca apenas a partir do 39º dia (ANOVA de medidas repetidas  $F=1,95$ ; G.L=14;  $p=0,031$ ; Bonferroni: apenas a seca difere dos dois tratamentos com  $p<0,001$ ; Bonferroni para as medições no primeiro mês:  $p>0,05$  entre todas as comparações; a partir do 39º dia manteve o mesmo padrão: Seca *versus* Neblina  $p<0,001$ ;

Neblina *versus* Irrigação  $p < 0,001$ ; Figura 4). O SWC das plantas nebulizadas não diferiu em nenhum momento dos valores obtidos para as plantas irrigadas (Bonferroni: Neblina *versus* Irrigação  $p = 1,00$ ; Figura 3), enquanto as plantas em seca têm o SWC reduzindo gradualmente no segundo mês até aos valores finais próximos de 15% coincidindo ao período de maior mortalidade na espécie (Figura 3).

## 2. Trocas gasosas e eficiência do uso de água em *D. brasiliensis*

Observamos redução de 30% na fotossíntese (A), 43% na condutância estomática (gs) e 64% na transpiração (E) após um mês no tratamento de seca (Figura 3, Tabela 1). No entanto, a nebulização favoreceu as trocas gasosas em *D. brasiliensis*, especialmente após um mês de experimento. A partir do 31º dia as diferenças entre o tratamento de seca e os demais tratamentos acentuam-se gradualmente até o fim do experimento (Figura 3). Enquanto os parâmetros A, gs e E reduzem a valores próximos de zero no tratamento de seca, estes são mantidos em taxas significativamente maiores ao longo do experimento nas plantas nebulizadas, inclusive algumas medições tiveram valores semelhantes aos das plantas irrigadas, por exemplo, E e gs até o 51º dia (Figura 3). No entanto, as semelhanças observadas entre neblina e irrigação em algumas medições de A, gs e E não são significativas, pois os três tratamentos diferem entre si (Bonferroni:  $p < 0,001$  para todas as comparações). As plantas irrigadas demonstram valores maiores ao longo do experimento, evidência de que a água disponível no solo é um fator limitante para o desempenho ecofisiológico da espécie.

Os estômatos de *D. brasiliensis* são muito sensíveis a variações no VPD, pois observamos grande redução na gs sob altos VPDs, independente da disponibilidade de água no solo (Figura 3, 4, 5). O VPD foi significativamente diferente principalmente devido aos valores extremos do VPD (KW=39,583, G.L.=7;  $p < 0,001$ ; Figura 5). As reduções na A foram causadas, principalmente, por reduções na gs e não por danos no aparato fotossintético segundo análises de correlação entre os dois parâmetros das plantas em seca ( $R^2 = 0,79$ ; G.L.=1;  $p < 0,001$ ), irrigação ( $R^2 = 0,63$ ; G.L.=1;  $p < 0,001$ ) e nebulização ( $R^2 = 0,57$ ; G.L.=1;  $p < 0,001$ ).

A WUE variou entre os tratamentos ao longo do tempo em *D. brasiliensis* (Tabela 1) devido, principalmente, às mudanças ambientais dos dias de medições (Figura 5), uma vez que o fator tratamento não apresentou diferenças significativas quando analisado de forma exclusiva ( $p=0,81$ ) (Tabela 1). Verificamos que as plantas irrigadas apresentaram valores maiores da WUE em relação aos outros tratamentos no 39º dia (Bonferroni: Irrigação *versus* Neblina:  $p=0,0017$ ; Irrigação *versus* Seca:  $p=0,0669$ ); e no 45º dia, as plantas de seca apresentaram valores significativamente menores do WUE (Bonferroni Seca *versus* Irrigação:  $p=0,015$ ; Seca *versus* Neblina:  $p=0,026$ ), enquanto neblina e irrigação não diferiram ( $p=1,00$ ). Considerando apenas o dia de maior VPD, fica evidente o benefício direto da nebulização à WUE em *D. brasiliensis*.

### 3. Potencial hídrico foliar e água no solo em *E. erythropappus*

Os valores dos  $\Psi_{PD}$  e  $\Psi_{MD}$  das plantas nebulizadas não diferiram significativamente das plantas irrigadas (respectivamente  $p=0,545$ ;  $p=1,00$ ) (Figura 3). Apenas os valores dos  $\Psi_{PD}$  e  $\Psi_{MD}$  das plantas de seca foram significativamente menores em relação aos demais tratamentos (Irrigação *versus* Seca:  $p=0,023$ ;  $p=0,021$  e Neblina *versus* Seca:  $p<0,001$ ;  $p=0,010$ ), embora os valores do  $\Psi_{PD}$  e  $\Psi_{MD}$  não difiram entre os tratamentos de forma marcada ao longo do tempo em *E. erythropappus* (Tabela 1). Isso porque a redução do potencial hídrico foliar das plantas sob seca foi evidente apenas a partir do 45º dia, nas últimas medições (Figura 3).

O SWC diferiu entre os tratamentos ao longo do tempo especialmente no 59º dia ( $F=1,94$ ; G.L= 14;  $p=0,033$ , Figura 4, Bonferroni:  $p<0,001$  para todas as comparações). Os valores do SWC do tratamento de seca partem de valores similares do início até o 31º dia (Bonferroni  $p>0,05$ , para todas as comparações) e reduzem gradativamente de forma significativa ao longo do tempo até o valor final de 11% na seca (Figura 4). O SWC das plantas em seca reduz de forma irreversível a partir do 39º dia (Bonferroni  $p<0,05$  entre os demais tratamentos em todos os tempos), enquanto que o SWC das plantas nebulizadas não difere até o final do experimento (Bonferroni:  $p>0,05$ ), o que indica que a neblina prolonga a manutenção da umidade do solo por um longo período.

#### 4. Trocas gasosas e eficiência do uso da água em *E. erythropappus*

*E. erythropappus* demonstrou grande resistência à seca no solo, possivelmente em decorrência do forte controle estomático, como o observado em situação de alto VPD (Figura 3, 5). Os parâmetros relacionados às trocas gasosas oscilaram ao longo do tempo em todas as espécies, mas especialmente em *E. erythropappus* (Figura 3; Tabela 1).

As curvas de A e gs dessa espécie respondem mais intensamente às mudanças do VPD independente do tratamento (Figura 3, 5). As taxas de fotossíntese apresentam forte correlação positiva com a condutância nos indivíduos de seca ( $R^2= 0,79$ , G.L=1,  $p<0,001$ ), nebulizados ( $R^2= 0,68$ ,  $p<0,001$ ) e irrigados ( $R^2= 0,70$ ,  $p<0,001$ ). Os valores de gs até o 45º dia estavam entre 0,06 e 0,21 mol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O e reduziram de forma irreversível para valores próximos a 0,03 mol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> nos indivíduos da seca nas duas últimas medições. Essa espécie foi a única que não apresentou danos irreversíveis por seca nos dois meses de experimento. As plantas do tratamento de seca apresentaram apenas murcha foliar, o que não prejudicou as medições ao longo do experimento.

As plantas sob seca apresentaram queda significativa da A, gs e E nas duas últimas medições (51º e 59º dias) (Tabela 1, Figura 3), enquanto as plantas nebulizadas mantiveram esses parâmetros próximos ao das plantas irrigadas ao longo de todo o experimento, inclusive nas medições finais (Figura 3). A redução significativa de gs do tratamento de seca na medição final foi o principal responsável pelas diferenças na WUE entre os tratamentos ao longo do tempo (Tabela 1). A WUE foi significativamente maior nos tratamentos de irrigação e neblina no 59º dia (Bonferroni Neblina *versus* Irrigação;  $p=0,724$ ; Irrigação *versus* Seca:  $p<0,001$ ; Neblina *versus* Seca:  $p=0,004$ ).

#### 5. Potencial hídrico foliar e água no solo em *M. umbellata*

Plantas nebulizadas mantiveram os valores do  $\Psi_{PD}$  e do  $\Psi_{MD}$  semelhantes aos das irrigadas, apesar da redução significativa do conteúdo de água no solo (Figura 3, 4, Tabela 1,  $\Psi_{PD}$  Bonferroni Neblina *versus* Irrigação:  $p=0,5519$ , Irrigação *versus* Seca:  $p<0,001$ , Neblina *versus* Seca:  $p=0,0018$ ;  $\Psi_{MD}$  Bonferroni  $p=1,00$ ,  $p=0,001$ ,  $p=0,004$ , respectivamente; SWC

Bonferroni:  $p < 0,001$  em todas comparações). Os valores do  $\Psi_{MD}$  foram menores nas plantas de seca em relação às nebulizadas e irrigadas ao longo do experimento (Figura 3, Tabela 1). Já o  $\Psi_{PD}$  foi significativamente menor nas plantas de seca na análise exclusiva do fator tratamento (Figura 3, Tabela 1). O  $\Psi_{PD}$  e  $\Psi_{MD}$  das plantas sob seca ficam menores a partir do 45º dia, chegando ao valor médio final de  $-3,23 \pm 0,80$  e  $-3,34 \pm 0,56$  MPa, respectivamente (Figura 3, Tabela 1). As plantas nebulizadas apresentaram  $\Psi_{PD}$  médio de  $-0,85 \pm 0,75$  e  $\Psi_{MD}$  de  $-2,17 \pm 0,65$  MPa, indicando que essa espécie se beneficia da absorção de água pelas folhas na recuperação do *status* hídrico. Inclusive, as plantas sob seca de *M. umbellata* apresentaram os menores valores de potencial hídrico foliar (abaixo de -3 MPa) entre as espécies e também os menores valores do conteúdo de água do solo (SWC) ( $F = 3,73$ ; G.L=14;  $p < 0,001$ ; Figura 4).

O SWC não diferiu significativamente entre os tratamentos nas três primeiras medições em *M. umbellata* (Bonferroni:  $p > 0,05$  para todas as comparações; Figura 4). A partir do 31º dia, o SWC das plantas nebulizadas e de seca reduzem em relação às plantas irrigadas, mas não diferem entre si (Bonferroni: Irrigação *versus* Neblina  $p = 0,05$ ; Irrigação *versus* Seca  $p = 0,011$ ; Neblina *versus* Seca  $p = 0,589$ ). Apenas no 51º e 59º dia o SWC das plantas nebulizadas apresentam níveis significativamente mais altos do que as plantas de seca (59º dia: Neblina *versus* Irrigação  $p < 0,001$ ; Seca *versus* Irrigação  $p < 0,001$ ; Seca *versus* Neblina  $p = 0,011$ ). O tratamento de neblina apresentou SWC médio no início de 40% e reduziu para 14,5% no final do experimento. Esse valor final representou o maior uso de água do solo pelas plantas nebulizadas entre as espécies, pela redução em 63% do valor médio inicial da água do solo. Esses valores do SWC do tratamento de neblina foram mais equiparáveis aos valores do tratamento de seca (com redução de 78% do SWC inicial) do que os valores obtidos nas outras espécies. Os valores dos potenciais hídricos das plantas irrigadas e nebulizadas são aproximados ao longo do experimento Independentemente da disponibilidade de água no solo. Essa evidência demonstra certo desacoplamento das relações hídricas da parte aérea das relações hídricas do solo nas espécies, principalmente em *M. umbellata* (Figura 3, 4).

## 6. Trocas gasosas e eficiência do uso da água em *M. umbellata*

As plantas nebulizadas apresentaram taxas significativamente maiores de A, gs e E, que as de seca ao longo de todo o experimento (Figura 3, Tabela 1). Alguns parâmetros do tratamento de neblina até mesmo ultrapassaram os valores das plantas irrigadas, como A no 39º dia e E no 31º e 39º dias (Figura 3). No entanto, os parâmetros das plantas nebulizadas não superaram o das plantas irrigadas nas medições finais (Figura 3). Nas plantas de seca, a fotossíntese (A) e a condutância (gs) reduzem de forma irreversível a partir do 19º dia (Figura 3, Tabela 1), enquanto a transpiração (E) diminui significativamente apenas a partir do 39º dia nesse tratamento. Para essa espécie, a fotossíntese está fortemente correlacionada com a condutância estomática (Seca:  $R^2=0,87$ ,  $p<0,001$ ; Irrigação:  $R^2=0,79$ ,  $p<0,001$ ; Neblina:  $R^2=0,70$ ,  $p<0,001$ ; G.L=1 para todos).

Observamos diferenças significativas na WUE entre os tratamentos ao longo do tempo em *M. umbellata* (Tabela 1). No entanto, essa diferença se deu em função da maior eficiência do uso (WUE) de água das plantas irrigadas em relação às nebulizadas e de seca, não havendo efeitos diretos da nebulização nessa taxa (Bonferroni: Irrigação *versus* Neblina:  $p<0,001$ ; Irrigação *versus* Seca:  $p<0,001$ ; Neblina *versus* Seca:  $p=1,00$ ). As trocas gasosas oscilaram ao longo do tempo também em *M. umbellata*, devido à resposta de fechamento estomático sob altos VPDs, levando a redução brusca de A e gs em todos os tratamentos especialmente no 45º dia (de VPD significativamente maior), ocorrendo em maior magnitude no tratamento de seca (Figura 3, 5).

Como nas outras espécies, os resultados obtidos de A, gs e E pelo IRGA assemelham-se aos valores de resistência estomática e de transpiração obtidos paralelamente com o porômetro ao longo do experimento, demonstrando que as respostas ocorrem em função dos tratamentos, independentemente das variações nos equipamentos. As plantas sob seca diferem drasticamente dos outros tratamentos especialmente nas últimas medições, pois transpiração foi reduzida a valores próximos a zero e a resistência estomática aumentou para valores próximos ou superiores a 30 cm/s em *M. umbellata* (e 50 cm/s em *D. brasiliensis* e *E. erythropappus*) contrastando aos valores próximos de 10 cm/s das plantas nebulizadas e irrigadas das três espécies.

## 7. Efeito da nebulização no crescimento e na sobrevivência em *D. brasiliensis*

A nebulização favoreceu o crescimento de *D. brasiliensis*, evidenciado principalmente pelo incremento no diâmetro do caule ( $\Theta_{St}$ ) em relação às plantas do tratamento de seca ( $F=9,74$ ;  $G.L=2$ ;  $p=0,002$ ; Bonferroni Neblina *versus* Seca  $\Theta_{St}$ :  $p=0,006$ ; Figura 6). Verificamos diferença significativa também na área foliar (LA) e na altura (h) das plantas entre os tratamentos (LA:  $F=5,83$ ;  $p=0,014$ ; h:  $F=6,04$ ;  $p=0,013$ ;  $G.L=2$  para as duas análises; Figura 6). No entanto, LA e h das plantas nebulizadas não diferiram significativamente entre as plantas irrigadas e as plantas de seca, mesmo havendo uma tendência para a semelhança entre a LA das plantas nebulizadas às irrigadas (Bonferroni Neblina *versus* Irrigação:  $p=0,059$ ) (Figura 6). Dessa forma, embora LA e h não tenham sido significativamente diferentes entre as plantas de neblina e de seca, as plantas do tratamento de seca apresentaram uma proporção muito maior de valores negativos, o que indica não apenas a ausência de crescimento, mas a perda de folhas e da redução do comprimento até o ápice. Além disso, o número de folhas murchas foi muito maior na seca, sendo o único tratamento em que houve perdas de folhas, apresentando padrão de ressecamento do tecido (com escurecimento e enrijecimento) e necrose parcial ou total. As folhas das plantas nebulizadas que senesceram apresentaram um padrão diferente, caindo ainda íntegras com o simples movimento das mudas.

A taxa de mortalidade de *D. brasiliensis* não diferiu entre irrigação e neblina e foi muito maior no tratamento de seca (94,74%) ( $\chi^2= 54,53$ ,  $G.L=2$ ,  $p<0,001$ ; Figura 7).

## 8. Efeito da nebulização no crescimento e na sobrevivência em *E. erythropappus*

O crescimento de *E. erythropappus* foi semelhante em todos os tratamentos, pois nenhum dos parâmetros morfológicos diferiu significativamente nos dois meses em tratamento (LA:  $F=1,01$ ;  $p=0,386$ ;  $\Theta_{St}$ :  $F= 2,15$ ;  $p=0,149$ ; h:  $F=1,27$ ;  $p=0,308$ ;  $G.L=2$  para todas as análises; Figura 6). *E. erythropappus* é uma espécie muito resistente, evidenciado pela baixa taxa de mortalidade no tratamento de seca (8%). Não houve mortalidade de plantas sob irrigação e neblina ( $\chi^2= 3,87$ ,  $G.L=2$ ,  $p=0,145$ ; Figura 7).

## 9. Efeito da nebulização no crescimento e na sobrevivência em *M. umbellata*

Nebulização favoreceu o crescimento de *M. umbellata* mesmo com a grande redução no conteúdo de água do solo, o que foi evidenciado pelo aumento na área foliar e no diâmetro do caule em níveis iguais às plantas irrigadas (LA:  $F=18,68$ ;  $p<0,001$ ;  $\Theta_{St}$ :  $F=11,71$ ;  $p=0,001$ ; G.L=2 para as duas análises; Bonferroni:  $p<0,001$  apenas nas comparações dos dois parâmetros com o tratamento de Seca; Figura 6). Os indivíduos maiores também apresentaram diferenças significativas nesses dois parâmetros, também devido principalmente aos valores menores obtidos para as plantas secas (LA:  $F=9,12$ ;  $p=0,003$ ;  $\Theta_{St}$ :  $F=15,63$ ;  $p<0,001$ ; G.L=2 para as duas análises). No entanto, nos indivíduos maiores a LA das plantas nebulizadas foi significativamente menor que a LA das plantas irrigadas (Bonferroni:  $p=0,007$ ).

Já a altura diferiu significativamente entre os tratamentos das duas classes de tamanho, devido principalmente à diferença entre seca e irrigação (h:  $F=7,52$ ;  $p=0,005$ ; h dos indivíduos maiores:  $F=7,53$ ;  $p=0,005$ ; G.L=2 para as duas análises; Bonferroni:  $p=0,004$ ; para as comparações entre seca e irrigada das duas classes de tamanho). A altura das plantas nebulizadas embora não tenha se distinguido de forma direta à das plantas irrigadas (Bonferroni:  $p=0,42$ ;  $p=0,88$  dos indivíduos maiores), também não se distinguiu à das plantas em seca (Bonferroni:  $p=0,088$ ). De forma geral, observamos o mesmo padrão de respostas aos tratamentos em todos os parâmetros tanto nos indivíduos menores e maiores de *M.umbellata*.

Nas duas classes de tamanho, observamos maior número de folhas murchas, até mesmo em ponto de murcha irreversível, nas plantas em seca, sendo o único tratamento que apresentou folhas completamente secas. Além disso, observamos que as folhas dos indivíduos maiores submetidos à neblina perderam a atividade fotossintética e, abruptamente, secaram somente após duas semanas com a interrupção da nebulização e permanência da falta de água no solo (no intervalo que seria o 89º dia). Em contrapartida, as plantas do tratamento de seca já estavam mortas antes de concluir os dois meses de experimento.

Também em *M. umbellata* a exposição à neblina favoreceu a sobrevivência dos indivíduos (Figura 7). O número de mortos foi significativamente maior no tratamento de seca tanto nos indivíduos menores (com 20% de mortalidade) ( $\chi^2= 9,69$ , G.L=2,  $p= 0,008$ ) quanto nos

maiores (com 100%) ( $\chi^2=12,44$ , G.L=2,  $p=0,002$ ). Não houve indivíduos menores mortos nos tratamentos de irrigação e neblina. Nos indivíduos maiores de a morte por seca foi mais frequente, não havendo sobreviventes no tratamento de seca e 16,7% de mortos no tratamento de exposição à neblina (Figura 7).

## Discussão

### *Neblina e relações hídricas*

A absorção de água pelas folhas resultou na melhora imediata e em longo prazo do *status* hídrico foliar pela borrifação e nebulização da parte aérea nas três espécies (Figura 1, 2, 3). Padrão semelhante de aumento do conteúdo de água foliar e do potencial hídrico após a umidificação de folhas foi observado em espécies de diversos ecossistemas (Grammatikopoulos & Manetas 1994; Yates & Hutley 1995; Munne-Bosch, Nogues & Alegre 1999; Gouvra & Grammatikopoulos 2003) inclusive em espécies lenhosas comuns de ambientes temperados e áridos como *Pinus strobus* (Boucher *et al.* 1995) e *Juniperus monosperma* (Breshears *et al.* 2008). O aumento do potencial hídrico após borrifação de ramos cortados em *Juniperus monosperma* e nas espécies deste estudo é uma forte evidência que água foi absorvida, pois exclui a possibilidade de rehidratação pelo xilema (Breshears *et al.* 2008).

O maior FWC do experimento de borrifação foi obtido em *E. erythropappus* possivelmente em decorrência da grande adsorção nos tricomas tectores abaxiais que acumularam sais fluorescentes marcadores de via apoplástica (Capítulo I). A água superficialmente retida pode difundir através desses tricomas para as paredes celulares da epiderme e do parênquima, podendo atingir o xilema (Capítulo I), provocando o aumento do potencial hídrico observado. O aumento no FWC de *E. erythropappus* e das outras espécies se aproximam da faixa de aumento do FWC pela absorção foliar em espécies dominantes nas florestas de sequóias na Califórnia, que variaram entre 2 a 11% (Limm *et al.* 2009). Embora o aumento do SWC em *E. erythropappus* seja o maior, foi *D. brasiliensis* que apresentou o maior incremento do  $\Psi_L$ , o que pode estar atrelado à maior susceptibilidade à seca nessa espécie. *D. brasiliensis* foi capaz de absorver a maior quantidade de água pelas folhas (42%) por difusão

direta cuticular e disponibilizá-la imediatamente aos tecidos condutores, como fonte alternativa de rehidratação dos tecidos aéreos, proporcionando até mesmo fluxo reverso da seiva em taxas que se aproximaram das observadas em sequóias (Burgess & Dawson 2004) (Capítulo I).

O aumento do  $\Psi_L$  dos ramos de *M. umbellata* no experimento de borrifação ocorreu em menor magnitude quando comparados a *D. brasiliensis* e *E. erythropappus*. Essa espécie apresenta uma peculiaridade em suas relações hídricas. Substâncias secretadas por *M. umbellata* (hidrogéis) estão presentes no canal central e nos laterais à nervura principal nos pecíolos e também no caule dessa espécie (Freitas 2003). A saída desses hidrogéis sempre antecede à água com a aplicação da pressão pela Bomba de Scholander (obs. pessoal). A presença dessas substâncias dificulta a precisão na determinação da pressão necessária à saída de água sendo possível que haja uma relação hídrica diferenciada em *Myrsine*, na qual a absorção da água foliar pode ocorrer pela agregação de umidade a porções concentradas de açúcares presentes nessas substâncias, a partir do acúmulo da água em compostos ácido-mucopolissacarídicos especialmente na presença de cátions di-(multi-) valentes (Zimmermann *et al.* 2007; Westhoff *et al.* 2009). Assim, diante dessas observações, sugerimos estreita relação das mucilagens e os hidrogéis com estratégias de uso e retenção de água, pois canais secretores, glândulas e células mucilaginosas são bastante comuns no gênero *Myrsine* (Freitas 2003). Possivelmente essas estruturas as capacitem a sobreviver em áreas mais secas, como as de transição de campos e florestas de altitude onde esta espécie é bastante abundante (obs. pessoal). *Araucaria angustifolia*, por exemplo, rehidrata os tecidos foliares pela absorção e armazenamento de água nas células mucilaginosas foliares, como se observou com a aplicação da solução contendo sal fluorescente (HPTS) (Mastroberti & Mariath 2008). Dessa forma, a absorção de água pelas folhas pode favorecer a rehidratação estrutural dos tecidos aéreos favorecendo a manutenção de sistema hídrico de “amortecimento” à cavitação (Zimmermann *et al.* 2007; Westhoff *et al.* 2009). Além disso, *plugs* mucilaginosos e camadas ácido-mucilaginosas de espécies arbóreas, além de atuarem como “efeito tampão” de mudanças no *status* hídrico quando a transpiração é alta, também facilitam a absorção de umidade da atmosfera, advindas da neblina, chuva, água de folhas de camadas inferiores transpiradas e evaporação do solo (Zimmermann *et al.* 2007). Inclusive, algumas espécies (incluindo *Drimys winteri*) apresentam *plugs* mucilaginosos epi-estomáticos que parecem envolvidos na absorção de umidade atmosférica (Westhoff *et al.* 2009).

Dessa forma, em situações severas de seca, que reduzem de forma ainda mais crítica a água nos tecidos vegetais, a absorção de água nebulizada pelas folhas confere vantagens diretas para a recuperação do *status* hídrico em espécies dotadas de sistemas hídricos mais ou menos complexos, como vimos em *D. brasiliensis* e *M. umbellata* (Figura 3).

Durante as medições do experimento de curta duração em câmara nebulizadora, observamos o extravasamento de compostos pelas folhas de *M. umbellata*, mais intensamente nas mais murchas, aproximadamente às 10h do primeiro dia de medição. O composto açucarado extravasou através de pontoações escuras, formando aréolas umedecidas. Isso pode ser evidência de que ajustes osmóticos possam desempenhar um papel fundamental na manutenção da espécie quando em seca, promovendo maior absorção de água (Kramer 1983, Taiz & Zeiger 2006). À medida que o solo seca o potencial matricial se torna mais negativo e as plantas só conseguem absorver água enquanto o seu potencial hídrico for mais negativo que o do solo (Taiz & Zeiger 2006). Dessa forma, o acúmulo de solutos pelas células, como açúcares, advindos da hidrólise de carboidratos de cadeias longas, pode proteger os processos de cavitação quando há falta de água nas plantas, pois possibilita a redução do potencial osmótico e preserva a turgidez da parte aérea (Salleo *et al.* 2004). Além disso, os ajustes osmóticos podem modificar a elasticidade dos tecidos e redistribuir a água entre simplasto e apoplasto atuando de forma integrada para a manutenção do turgor, fundamental para o crescimento e a sobrevivência de plantas em falta de água (Grammatikopoulos 1999; Taiz & Zeiger 2006). Pelos ajustes osmóticos, as plantas do gênero *Myrsine* podem retirar água do solo sob potenciais mais negativos, levando às quedas mais acentuadas do SWC em relação às outras espécies, como observamos no primeiro mês no tratamento de seca e neblina (Figura 5, Tabela 1). Dessa forma, além da capacidade de absorção foliar observada em *M. umbellata* (e também em *M. ferruginea*) (dados não mostrados), espécies desse gênero podem absorver mais água do solo, ressecando-o mais rapidamente que outras plantas sem ajustes osmóticos, mesmo quando expostas à neblina (Figura 5).

O aumento dos potenciais hídricos nos indivíduos nebulizados a valores que se assemelham aos de plantas irrigadas em comparação aos de seca, indica o desacoplamento das relações hídricas da parte aérea das relações hídricas do solo. O desacoplamento, pelo aumento do potencial hídrico foliar independente da reposição de água no solo, ocorre como efeito

exclusivo da absorção de água pelas folhas em *M. umbellata*, que apresentou maior redução do SWC no tratamento neblina em relação às outras espécies (Figura 3, 5). Em *M. umbellata*, a água adsorve nas porções externas da cutícula e dos tricomas por onde é absorvida para os tecidos internos (epiderme, parênquima e células coletoras) (Capítulo I) podendo ser a principal fonte de água para a transpiração. O benefício na recuperação do *status* hídrico pela absorção direta é tão evidente nessa espécie que o potencial do meio dia nem se distingue entre o tratamento de neblina e irrigação até o 51º dia, diferente dos valores do tratamento de seca, que foram menores a partir do 39º dia. É possível que espécies de *Myrsine* possam desacoplar mais facilmente o funcionamento hídrico da parte aérea em relação ao solo por ser menor a resistência ao transporte de água pela presença abundante de hidrogéis e mucilagens (Capítulo I) ou por terem reservas de água que podem ser reguladas por ajustes osmóticos. Simonin *et al.* (2009) acompanhou o desempenho ecofisiológico de *Sequoia sempervirens* em um experimento conduzido em casa de vegetação por um mês utilizando os mesmos tratamentos. Os autores verificaram incremento nas trocas gasosas e no potencial hídrico nas plantas nebulizadas comparadas às de seca e os valores do potencial hídrico das sequóias nebulizadas não refletiram o potencial matricial do solo, mais negativo que o das folhas. Dessa forma, reconheceram o desacoplamento das relações hídricas foliares em relação ao solo e sugeriram novas variáveis ao modelo do contínuo solo-planta-atmosfera, como a eficiência absorptiva da folha e o gradiente de potencial hídrico entre a água interceptada pelo dossel e a folha. Nesse sentido, nossas evidências também contribuíram ao reconhecimento do movimento bidirecional de água (da folha para os ramos), atribuindo-lhe, inclusive, um papel ecológico importante para a manutenção do *status* hídrico em espécies tropicais.

O conteúdo de água no solo dos indivíduos nebulizados de *D. brasiliensis* e *E. erythropapus* manteve-se constante ao longo do experimento. Ao contrário de *Myrsine*, a manutenção do potencial hídrico foliar de plantas nebulizadas em níveis semelhantes aos das plantas irrigadas, pode ter sido uma simples consequência da ausência de queda do potencial hídrico do solo. Nebulizações frequentes podem ter minimizado variações no conteúdo de água no solo por três mecanismos: 1) redução da transpiração noturna durante a nebulização, que reduz o transporte da água da raiz para a parte aérea, e conseqüentemente a demanda da água do

solo torna-se menor; 2) redução da água proveniente do solo transpirada durante o dia, pois a planta pode transpirar mais prontamente a água absorvida pela via foliar por estar mais disponível, reduzindo a demanda do solo; e 3) redistribuição hidráulica da água interceptada, que é absorvida e direcionada pelo fluxo reverso da seiva para o caule e raízes, e dessas para o solo. A redistribuição hidráulica entre raízes foi verificada inclusive em árvores amazônicas, que podem passar até três meses de seca sem sofrer estresse hídrico, deixando de ser um mecanismo exclusivo de espécies em ambientes áridos ou extremamente sazonais (Oliveira *et al.* 2005). Em *D. brasiliensis* pudemos registrar a inversão do fluxo de seiva, tornando ainda mais possível a ocorrência de redistribuição hidráulica nessa espécie. A redistribuição hidráulica também deve ocorrer em *E. erythropappus* pois observamos acúmulo da solução absorvidas pelas folhas contendo sais fluorescentes no xilema (Capítulo I). Inclusive, *D. brasiliensis* e *E. erythropappus* foram as duas espécies que apresentaram menor oscilação do SWC ao longo do tempo no tratamento de neblina (Figura 5).

Das três espécies, *D. brasiliensis* foi a mais susceptível a seca do solo e foi a que mais se beneficiou da aquisição direta de água pelas folhas. Essa espécie não é capaz de baixar o potencial hídrico foliar para valores abaixo -2 MPa sem que danos irreversíveis pela seca sejam evidentes nas folhas. Abaixo desses valores críticos, os ápices e os bordos foliares rapidamente necrosam, dando início à mortalidade precoce logo no primeiro mês em seca, que coincide com a redução de 50% do conteúdo de água no solo (Figura 5). Como o potencial hídrico crítico é bem maior em *D. brasiliensis* do que nas outras espécies, a absorção de neblina interceptada teria um papel ainda mais relevante nessa espécie típica de floresta nebulares (Falkenberg & Voltolini 1995; Safford 1999; Falkenberg 2003; Meireles, Shepherd & Kinoshita 2008).

Espécies distinguem-se nas suas propriedades hidráulicas e nas formas de uso e armazenamento de água e por isso diferem quanto aos valores de seus potenciais hídricos mínimos (Bhaskar & Ackerly 2006). Quanto mais tolerante a seca, mais negativa pode ser a pressão no xilema na espécie sem que ocorra cavitação. Além disso, plantas podem regular ativamente o fluxo interno de água usando hidrogéis (Meidner & Sherrif 1976; Zwieniecki *et al.* 2008), o que pode ocorrer em *M. umbellata* proporcionando valores extremamente negativos do potencial hídrico (até abaixo de -3MPa) sem comprometer de forma irreversível a condutividade

hidráulica da planta. Observamos a formação de bainha perivascular esclerenquimática nos feixes vasculares de *M. umbellata* (não demonstrado), o que restringe ainda mais a formação de embolia (Carmello-Guerreiro, com. pessoal), podendo justificar a grande capacidade dessa espécie em manter o turgor em falta de água.

#### *Neblina e trocas gasosas*

A absorção de água pelas folhas resultou no aumento das trocas gasosas ao longo dos dois meses de exposição noturna à neblina (pelo incremento de A, gs e E) em relação às plantas de seca nas três espécies (Figura 3, Tabela 1). Esses parâmetros não diferiram entre as plantas irrigadas e nebulizadas em grande parte das medições, a melhora no desempenho devido à nebulização não chega a se equiparar aos benefícios da hidratação radicular, pois os valores de A, gs e E ao final do experimento foram maiores para as plantas irrigadas. Isso indica que a disponibilidade de água no solo pode limitar o desempenho ecofisiológico em longo prazo nas três espécies.

A nebulização atenuou os efeitos deletérios da falta de água no solo principalmente em *D. brasiliensis*, que após um mês em seca começou a manifestar uma série de danos irreversíveis como necrose parcial ou total dos tecidos aéreos e morte. A maioria dos indivíduos sob seca ao final dos dois meses já haviam perdido as atividades funcionais foliares, reduzindo a fotossíntese e as trocas gasosas a zero, o que não ocorreu nas plantas nebulizadas. Esse padrão é semelhante ao observado por Munne-Bosch *et al.* (1999), em que a deposição de orvalho favoreceu a manutenção dos fotossistemas em uma espécie de arbusto no Mediterrâneo.

A absorção de água pelas folhas beneficiou as trocas gasosas nas espécies. No entanto, alguns estudos sugerem que a presença de um filme de água sobre as folhas pode reduzir a fotossíntese. Smith & McClean (1989), por exemplo, observaram maiores taxas de fotossíntese (em até 34%) pelo aumento da abertura estomática em três das cinco espécies que repeliram água das folhas. Nesse caso, discutem que quanto maior a repelência da umidade pelas folhas maior é a eficiência no uso de água. Smith & McClean (1989) e Brewer, Smith & Volgelmann (1991) hipotetizaram que há uma forte pressão seletiva para a repulsão de água foliar especialmente em

locais com eventos meteorológicos que possibilitam a formação constante de película de água sobre as superfícies foliares. No entanto, os trabalhos que demonstraram efeitos negativos da umidade sobre as folhas, como redução no ganho de carbono devido à formação do filme de água por diminuir em até  $10^4$  a difusão do  $\text{CO}_2$ , foram realizados em solos bem irrigados, não representando condições de seca de solo em que a absorção de água pelas folhas pode conferir vantagens (Simonin *et al.* 2009). Além disso, qualquer evento climático que produz saturação atmosférica pode reduzir a incidência direta de fótons, reduzindo a fotossíntese. No entanto, após o retorno da incidência solar direta, a absorção da água coalescente na superfície foliar favorecerá a fotossíntese pela melhora do *status* hídrico da planta. Mesmo estudos realizados durante a ocorrência de neblina demonstraram efeitos positivos para o balanço hídrico de algumas espécies. Duas espécies das montanhas Apalaches dos EUA e outras três espécies nas florestas nebulares na Espanha, por exemplo, reduziram a transpiração durante a imersão na neblina (Johnson & Smith 2008; Ritter, Regalado & Aschan 2009). Eventos que possibilitam a deposição de água nas folhas podem beneficiar o desempenho ecofisiológico, inclusive promovendo o incremento das trocas gasosas, em espécies capazes de absorver água pelas folhas de diferentes ecossistemas (Wilson 1948 *apud* Gaertner 1964; Munné-Bosch, Nogues & Alegre 1999; Martin & von Willert 2000; Simonin *et al.* 2009; Qiu *et al.* 2010).

Todas as espécies reduziram  $g_s$  e  $A$  com a redução do conteúdo de água do solo (como observamos nas últimas medições) e com o aumento do déficit de pressão de vapor atmosférico (VPD) (como no 45º dia) (Figura 3, 4, 5). Durante a abertura estomática para a aquisição de carbono, e incremento de  $A$ , as perdas de água são maiores (Schulze 1986; Kaiser 1987; Chaves 1991; Taiz & Zeiger 2006). O fechamento estomático preserva água nos tecidos foliares e favorece a manutenção de uma condição hídrica mínima para a sobrevivência até que aumente a disponibilidade de água (Schulze 1986). Os valores de  $g_s$  e  $E$  reduzem principalmente após o primeiro mês de seca em *D. brasiliensis* (Figura 3). *M. umbellata* é ainda mais conservativa, reduzindo as taxas de trocas gasosas logo no início do experimento quando em seca (no 19º dia). Os valores de  $E$  nessa espécie apresentaram uma redução mais acentuada após o 31º dia possivelmente devido à regulação ainda mais intensa da abertura estomática (com  $g_s$  menores) pela queda acentuada na disponibilidade de água do solo nesse período (Figura 3, 5). Assim, os

benefícios conferidos pela exposição das folhas à neblina são mais evidentes nessas duas espécies, pois os indivíduos nebulizados mantêm taxas de trocas maiores que os de seca ao longo da maior parte do experimento, superando em algumas ocasiões, os parâmetros médios das plantas irrigadas (Figura 3). Já as plantas sob seca apresentam, além das reduções das trocas, perda completa da atividade fotossintética e do turgor levando à seca irreversível das folhas.

Em *E. erythropappus*, por sua vez, as diferenças entre os tratamentos passam a se acentuar muito mais tardiamente (após o 51º dia em experimento). Os parâmetros ecofisiológicos dos indivíduos nebulizados e irrigados se distinguiram apenas nas medições finais do experimento, exceto quanto ao valor de E no 45º dia. Nesse dia, os indivíduos nebulizados apresentaram valores baixos tais como os de seca, possivelmente como consequência do alto VPD (Figura 4). Isso porque os indivíduos nebulizados recuperaram os valores de E, enquanto os indivíduos de seca mantiveram valores abaixo dos  $0,9 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . A distinção dos valores de E sob alto VPD entre neblina e irrigação deve ter ocorrido em decorrência da rehidratação parcial dos tecidos aéreos garantida pela absorção foliar. Quando a demanda atmosférica é muito alta ocorre transpiração excessiva (Schulze 1986) e assim, os indivíduos nebulizados tendem a conservar mais a água do que aqueles sem limitações na disponibilidade de água no solo. A redução de  $g_s$  no tratamento de seca foi bastante acentuada nas duas últimas medições, o que justifica a diminuição subsequente de A e E, pois há depressão da taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$  pelo fechamento estomático (Schulze 1986; Kaiser 1987; Chaves 1991).

Os estômatos das espécies estudadas foram bastante sensíveis às variações no déficit de pressão de vapor atmosférico independente da umidade do solo. Sob altos VPDs, as três espécies reduzem  $g_s$  (Figura 3, 4). A e  $g_s$  aumentam quando os valores de VPD são menores, como se observa no 06º, 39º e 51º dias, especialmente em *D. brasiliensis* e *M. umbellata*. Todas as espécies respondem ao aumento do VPD em todos os tratamentos, mas é muito mais intenso no tratamento de seca possivelmente em decorrência do controle estomático (uma vez que  $g_s$  caem para perto de zero). O fato das plantas irrigadas também limitarem as trocas gasosas em alto VPD (como no 45º dia) demonstra que são bastante sensíveis a seca atmosférica mesmo quando não há falta de água no solo. As três espécies podem apresentar o mecanismo recentemente proposto de resposta estomática ativada pelo fluxo de água por capilaridade entre as células da

epiderme, levando ao fechamento estomático na planta como um todo quando a umidade relativa é muito baixa (Burkhardt 2010). Assim, as taxas de água perdida na transpiração, nessas espécies, também podem ser determinadas pela interação entre o VPD e a  $g_s$  (Meidner & Sherrif 1976; Schulze 1986; Sperry *et al.* 2002; Schulze 1975, 1986; Young *et al.* 1997; Fisher *et al.* 2006; Bhaskar & Ackerly 2006). O aumento do VPD leva ao aumento da transpiração (Meidner & Sherrif 1976, Schulze 1986, Menucci Grace 1995, Lambers *et al.* 2006) e quando atinge valores extremos, é possível que a perda de água ocorra em taxas maiores do que as de absorção pelas raízes nos períodos mais quentes do dia, levando a um desequilíbrio hídrico (Schulze 1986). A transpiração quando não é limitada pelos estômatos e pela camada de ar limítrofe pode levar a perda excessiva de água, o que pode danificar o sistema hidráulico nas três espécies (Schulze 1986; Mansur & Barbosa 2000; Taiz & Zeiger 2006).

É possível também que as células guarda reajam a diferenças de umidade do ambiente rapidamente nessas espécies, como identificado em outros estudos onde a abertura estomática diminui quanto menor a umidade relativa (Kramer & Boyer 1995). A condutância estomática reduz em resposta ao aumento da pressão de vapor entre ar e folha (Monteith 1995) por possível mecanismo de *feedback* com a transpiração foliar entre células guardas e outras células epidérmicas (Schulze *et al.* 1972; Schulze 1986; Young *et al.* 1997), sendo então regulado pelas relações hídricas epidérmicas como transpiração e potencial hídrico (Young *et al.* 1997). A relação de resposta estomática à seca atmosférica ainda é pouco conhecida devido à dificuldade de se isolar os fatores de seca de solo e demanda evaporativa (Zweifer *et al.* 2005; Bhaskar & Ackerly 2006). Mas, independente dos mecanismos, torna-se evidente que o alto VPD representa um fator gerador de estresse hídrico nessas espécies que ocupam ambientes com grandes oscilações diárias e sazonais do VPD. Naves-Barbiero *et al.* (2000) observaram rígido controle estomático em relação a alta demanda evaporativa da atmosfera em outras espécies de *Myrsine* (*Rapanea*) em ambiente de Cerrado, sugerindo essa dependência da abertura estomática com o *status* hídrico das folhas e com o VPD. Os modelos de Sarmiento *et al.* (1985) levam à conclusão de que a transpiração das espécies lenhosas depende mais das condições atmosféricas do que da disponibilidade de água no solo, o que se refletiu no nosso estudo pela queda abrupta de todos os tratamentos no 45º dia.

A condutância estomática de *D. brasiliensis* não excede  $0,18 \text{ mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  mantendo os menores valores próximos de  $0,06 \text{ mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  sob altos VPDs no tratamento de neblina. Os valores de *g<sub>s</sub>* aproximam de zero apenas na falta extrema de água (a partir do primeiro mês do tratamento de seca e alto VPD) (Figura 3, 4). No entanto, estudos em outras espécies de *Drimys* (*D. winteri* e *D. granadensis*) verificaram insensibilidade de resposta estomática a alguns fatores, inclusive VPD (Feild & Hoodbrook 2000). Feild *et al.* (1998) demonstrou que folhas *D. winteri* não fecham os estômatos nem quando expostos a altos VPDs, devido ao acúmulo de cutina e cera sobre as células guarda que formam *plugs* granulares hidrofóbicos. Esse material pode se estender até o átrio externo estomático e impedir as células guardas de fecharem completamente. Na caracterização anatômica da espécie, previamente realizada (Capítulo I), realmente verificamos a intrusão do material cuticular em alguns estômatos, mas definitivamente não é um padrão difundido em todos os estômatos em *D. brasiliensis*, o que justifica a abertura estomática mais responsiva às variações do VPD no nosso estudo. Além disso, a absorção de água pelas folhas deve ser maior quanto menor o VPD devido a rearranjos na estrutura cuticular sob maior umidade relativa (Van Hove & Adema 1996) ou pela formação do fluxo contínuo de água pelos poros estomáticos (Burkhardt 2010), o que pode se relacionar ao aumento das trocas gasosas sob baixos VPD devido à melhor hidratação proporcionada pela absorção direta dos tecidos aéreos.

A redução da *g<sub>s</sub>* causa diminuição na assimilação de  $\text{CO}_2$  utilizado na fotossíntese (Krieg 1993, Larcher 2000), e conseqüentemente reduz a fotossíntese (A) e a transpiração (E), o que inicialmente provoca um aumento da eficiência no uso de água (WUE) nos indivíduos sob estresse hídrico (Hsiao 1973; Martin & Ruiz-Torres 1992; Gucci *et al.* 1996; Thomas, Eamus & Shanahan 2000; Taiz & Zeiger 2006; Larcher 2006; McDowell *et al.* 2008). A WUE expressa a relação entre a quantidade de  $\text{CO}_2$  absorvido na fotossíntese por vapor de água perdido na transpiração (A/E) e pode aumentar com o fechamento parcial dos estômatos quando esse afeta mais a transpiração do que a absorção do  $\text{CO}_2$  (Jones & Sutherland 1991). Mas à medida que a seca torna-se mais severa, a WUE diminui com a inibição do metabolismo da folha e aumento da transpiração (Taiz & Zeiger 2006). A neblina pode amenizar os efeitos de seca severa nos solos em que grandes concentrações de ácido abscísico se formam nas folhas dificultando a

osmorregulação das células-guarda que reduz a abertura dos poros até o fechamento completo. Na ausência da formação de neblina, as secas prolongadas levam ao fechamento completo e permanente dos estômatos resultando em falta de fotoassimilados (“*carbon starvation*”), o que desencadeia uma cascata de efeitos deletérios, como a redução da resistência a outros fatores, como por exemplo, ataques biológicos (McDowee *et al.* 2008).

As três espécies apresentaram modificações significativas nas taxas de A e E, levando a modificações da eficiência do uso de água (WUE) em situações de VPD extremos de forma associada à disponibilidade de água no solo (Tabela 1). Em *D. brasiliensis* a WUE foi maior nos indivíduos irrigados no 39º dia (de menor VPD) e menor nos indivíduos de seca no 45º dia (de maior VPD), demonstrando sensibilidade da espécie à regulação da perda de água por carbono adquirido em situações ambientais ótimas e adversas. *E. erythroppapus* demonstrou maior WUE nas plantas irrigadas e incremento dessa taxa nas plantas nebulizadas em contraste às de seca no 59º dia, demonstrando que a conservação de água pelo fechamento estomático aumenta em situações de falta de água crítica, tornando-se ainda mais intensa sobre condições de alto VPD.

#### *Efeito da nebulização no crescimento e na sobrevivência*

A absorção de água pelas folhas proporcionou a melhora imediata e em longo prazo do desempenho ecofisiológico pela manutenção do *status* hídrico e das taxas de trocas gasosas das plantas nebulizadas em comparação à seca, o que refletiu em maior crescimento e sobrevivência em *D. brasiliensis* e *M. umbellata* (Figura 6, 7). Valores de SWC abaixo de 30% geralmente conduzem ao fechamento estomático irreversível acentuando ainda mais os danos da seca (Schulze 1986), na qual a falta de fotoassimilados (“*carbon starvation*”) pode afetar o crescimento e a sobrevivência das plantas (McDowell *et al.* 2008). Trabalhos pioneiros descrevem os eventos de neblina e orvalho como fontes importantes de água para a sobrevivência de diversas espécies de coníferas e de lenhosas perenes de regiões áridas, uma vez que a absorção foliar garantiu hidratação direta dos tecidos aéreos em situações experimentais de seca do solo (Stone, Went & Young 1950 *apud* Gaertner 1964; Stone 1957b; Waisel 1958 *apud* Gaertner 1964).

Em *E. erythropappus* os efeitos no desempenho ecofisiológico foram observados tardiamente. Essa espécie demonstrou bastante resistência à seca e assim os benefícios ao desempenho ecofisiológicos relacionados à absorção de água pelas folhas foram mais evidentes apenas a partir do 45º dia. Consequentemente, não houve diferenças significativas no crescimento e na mortalidade nessa espécie no período de experimento. Apenas no final de dois meses observamos indícios de perda do turgor foliar, necrose parcial e mortalidade no tratamento de seca (Figura 7).

A aquisição de água pelas folhas refletiu no aumento do diâmetro do caule em *D. brasiliensis* e na área foliar total de *M. umbellata* em proporções semelhantes às plantas irrigadas (Figura 6, Tabela 1), o que significa um ganho líquido de carbono para a manutenção das estruturas e o crescimento.

Embora a altura não tenha demonstrado nenhum efeito significativo ao tratamento de neblina, notamos valores negativos da mudança na altura (*Change in h*) apenas nos indivíduos sob seca, o que indica retrações no comprimento do eixo principal, reduzindo o tamanho desses em *D. brasiliensis* (Figura 6). Essa espécie parece ter como resposta homeostática à seca, ajustes das suas características hidráulicas através de arranjos em sua altura. Isso porque observamos que o padrão de necrose dos tecidos por seca comumente se iniciam no ápice dos ramos e/ou do tronco principal e nas bordas foliares, concentrando a água nos tecidos centrais. Nesse sentido, o fechamento estomático torna-se muito importante como resposta à seca, pois previne a perda em cascata da condutividade do xilema dos ramos menos calibrosos para os maiores (Zimmermann *et al.* 2004). Além disso, é possível que ocorra ajustes morfo-fisiológicos em *D. brasiliensis* uma vez que demonstra um padrão de necrose peculiar das folhas e dos ramos quando em seca. Em alguns casos, a falta de água afeta mais os parâmetros de crescimento do que a própria fotossíntese, por estes serem mais sensíveis a queda do potencial hídrico, pois para a alongação dos tecidos aéreos e o desenvolvimento das folhas a manutenção do turgor torna-se essencial para a expansão celular (Boyer 1970; Hsiao & Bradford 1983). Nesse contexto, a absorção de água pelas folhas pode levar ao maior ganho de carbono e crescimento tanto das folhas interceptadoras quanto nos tecidos aéreos distantes (Martin & von Willert 2000).

A área foliar total (LA), que traduz toda a área fotossinteticamente ativa, também aumentou em *M. umbellata*, inclusive nos indivíduos maiores (Figura 6). O único trabalho até o presente que demonstrou efeito direto no crescimento pela absorção de água pelas folhas foi realizado em *Pinus strobus* para o qual se reconheceu aumento em 45% na massa seca das raízes de plantas submetidas ao orvalho artificial em relação ao controle e uma tendência de aumento no diâmetro do hipocótilo e na massa seca da parte aérea, com 7% e 18% de aumento, respectivamente (Boucher *et al.* 1995). Inclusive, esse trabalho também verificou melhora no desempenho ecofisiológico geral, relativo ao  $\Psi_{MD}$ , gs e ao conteúdo relativo de água da parte aérea nos indivíduos submetidos à umidade foliar de orvalho em experimento de longa duração (10 semanas). Também Wilson (1948) (*apud* Gaertner 1964) conclui que a neblina favorece o ganho de carbono em 20 a 25% favorecendo o crescimento em *Camellia japonica* e *Ligustrum lucidum*.

Embora apenas *M. umbellata* tenha demonstrado efeito direto da nebulização na manutenção da área foliar, notamos que as folhas dos indivíduos nebulizados de todas as espécies apresentavam maior turgor em relação à seca. Folhas murchas e secas foram mais frequentes nas plantas de seca completa e isso pode ser determinante para deflagrar os danos em cascata, que são irreversíveis após secas severas. A neblina, como fonte alternativa de água, pode reduzir a intensidade dos danos, adiando a ocorrência de grandes perdas de folhas advindas após murcha e seca, que se tornam generalizadas e podem ocasionar morte. Embora ocorra perda parcial de folhas também no tratamento de neblina, como vimos em *D. brasiliensis*, ao fim dos dois meses em seca os indivíduos nebulizados mantinham integridade do ramo principal e um número considerável de folhas (que justifica a igualdade de LA entre irrigadas e as nebulizadas). Esse fato difere do tratamento de seca, em que além de perda severa de folhas houve mortalidade generalizada.

Um dos efeitos ecológicos mais relevantes da exposição da parte aérea das plantas à neblina foi o aumento da sobrevivência de indivíduos após os dois meses de experimento. Todas as plantas nebulizadas de *D. brasiliensis* e *M. umbellata* sobreviveram, enquanto houve altas taxas de mortalidade no tratamento de seca, especialmente em *D. brasiliensis*. Mesmo *E. erythroppapus*, que não apresentou diferenças significativas no número de mortos no tratamento

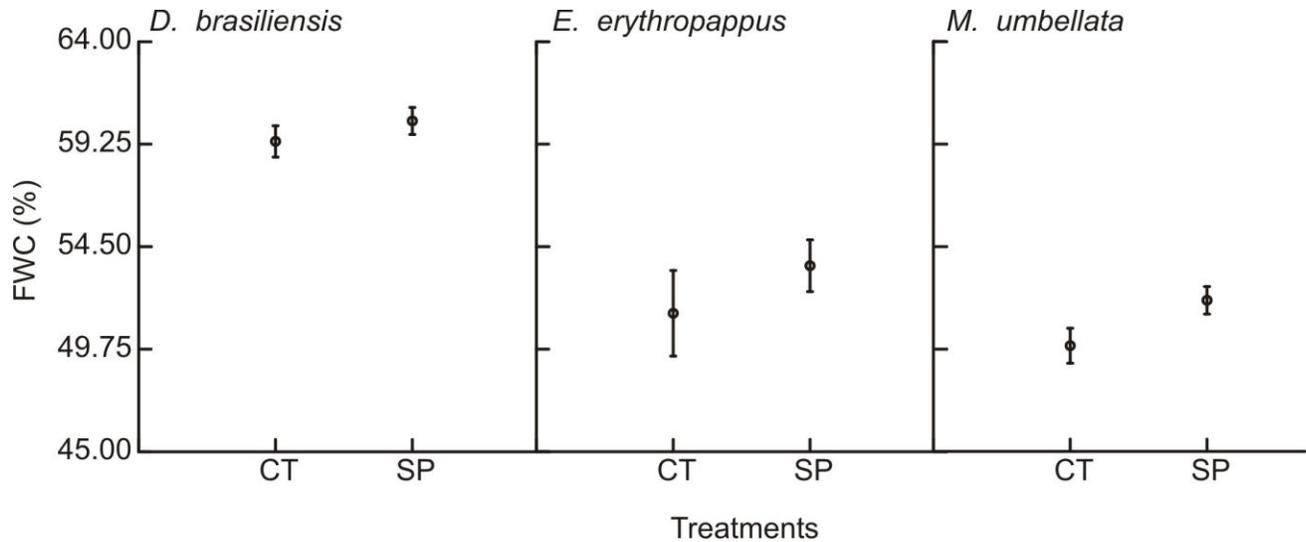
de seca em relação aos outros tratamentos, apresentou duas mortes no tratamento de seca. Esse número poderia aumentar se o experimento fosse prolongado. Anteriormente a esse estudo, apenas espécies de gimnospermas, entre as traqueófitas arbóreas, tiveram a sobrevivência relacionada à absorção de água pelas folhas, como *Pinus ponderosa* que tiveram maior taxa de sobrevivência no tratamento de exposição exclusiva da parte aérea à umidade (Stone 1957b). Assim, a absorção de água pelas folhas pode amenizar inclusive os mecanismos que causam morte em espécies vegetais sob falta de água no solo. Esse benefício pode ser tanto maior quanto mais prolongado e intenso for o estresse hídrico, especialmente em ecossistemas com frequentes períodos de seca do solo onde ocorrem neblina, orvalho ou fracos eventos de chuva (Stone 1957a, 1958; Yates & Hutley 1995; Breshears *et al.* 2008). Secas extremas podem causar altas taxas de mortalidade em árvores (Allen & Breshears 1998; Breshears *et al.* 2005), principalmente quando ocorrem no início do estabelecimento das plantas (Kapos 1989; Whitmore 1998; McDowell *et al.* 2008).

Os modelos que prevêm as alterações climáticas para os próximos 50 anos demonstram que o aumento das temperaturas globais reduzirá os índices de pluviosidade, resultando em secas mais severas e frequentes (Cook *et al.* 2004; IPCC 2007; Seager *et al.* 2007). Eventos de mortalidade na vegetação ao redor do mundo têm sido observados devido às secas cada vez mais severas (Allen & Breshears 1998; Suarez *et al.* 2004; Breshears *et al.* 2005; Ciais *et al.* 2005; Jurskis 2005; Breda *et al.* 2006; Gitlin *et al.* 2006;). Com o aumento da temperatura do ar, as perdas de água na vegetação são maiores com a elevação do VPD. Esse impacto sobre a vegetação pode resultar em maiores taxas de mortalidade por perda de condutividade hidráulica ou por falta de assimilados de carbono nos tecidos (*carbon starvation*) (McDowell *et al.* 2008). Além das secas sazonais ou decorrentes das alterações climáticas, há outros eventos fortuitos de veranicos que se tornam ainda mais frequentes, por exemplo, nos anos de El Niño que inclusive já foram relacionados ao aumento da mortalidade de plântulas (McDowell *et al.* 2008).

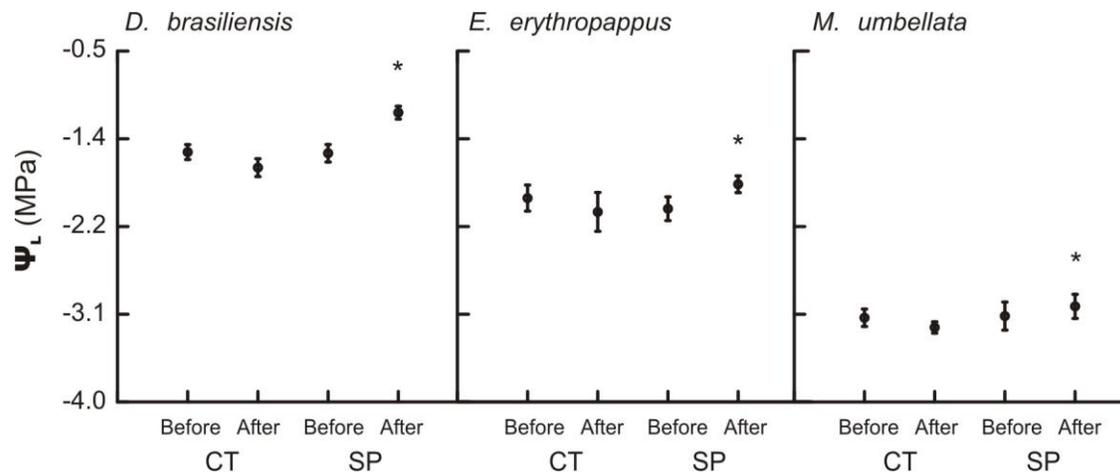
As populações das matas de altitude podem ser bastante afetadas em qualquer um dos cenários previstos de mudanças climáticas futuras. *D. brasiliensis*, por exemplo, são extremamente sensíveis à seca e, como nas demais espécies, a neblina pode servir como fonte alternativa de água, inclusive podendo ser absorvida de forma direta pelas folhas. A absorção da

neblina pode favorecer o desempenho ecofisiológico geral nos indivíduos, inclusive de espécies lenhosas, expostos a essa fonte de água. A melhora na manutenção dos processos fisiológicos causada pela neblina pode contribuir para o crescimento e a sobrevivência em condições de falta de água no solo. Cenários de climas futuros sugerem que a formação de neblina em montanhas tropicais ocorrerá apenas em altitudes mais elevadas (Still *et al.* 1999; Reinhardt & Smith 2008), ou mesmo deixar de ocorrer. Mudanças no padrão de formação de neblina podem causar um aumento nas taxas de mortalidade nas populações de espécies de matas nebulares mais sensíveis à seca (Still *et al.* 1999; Pounds *et al.* 1999).

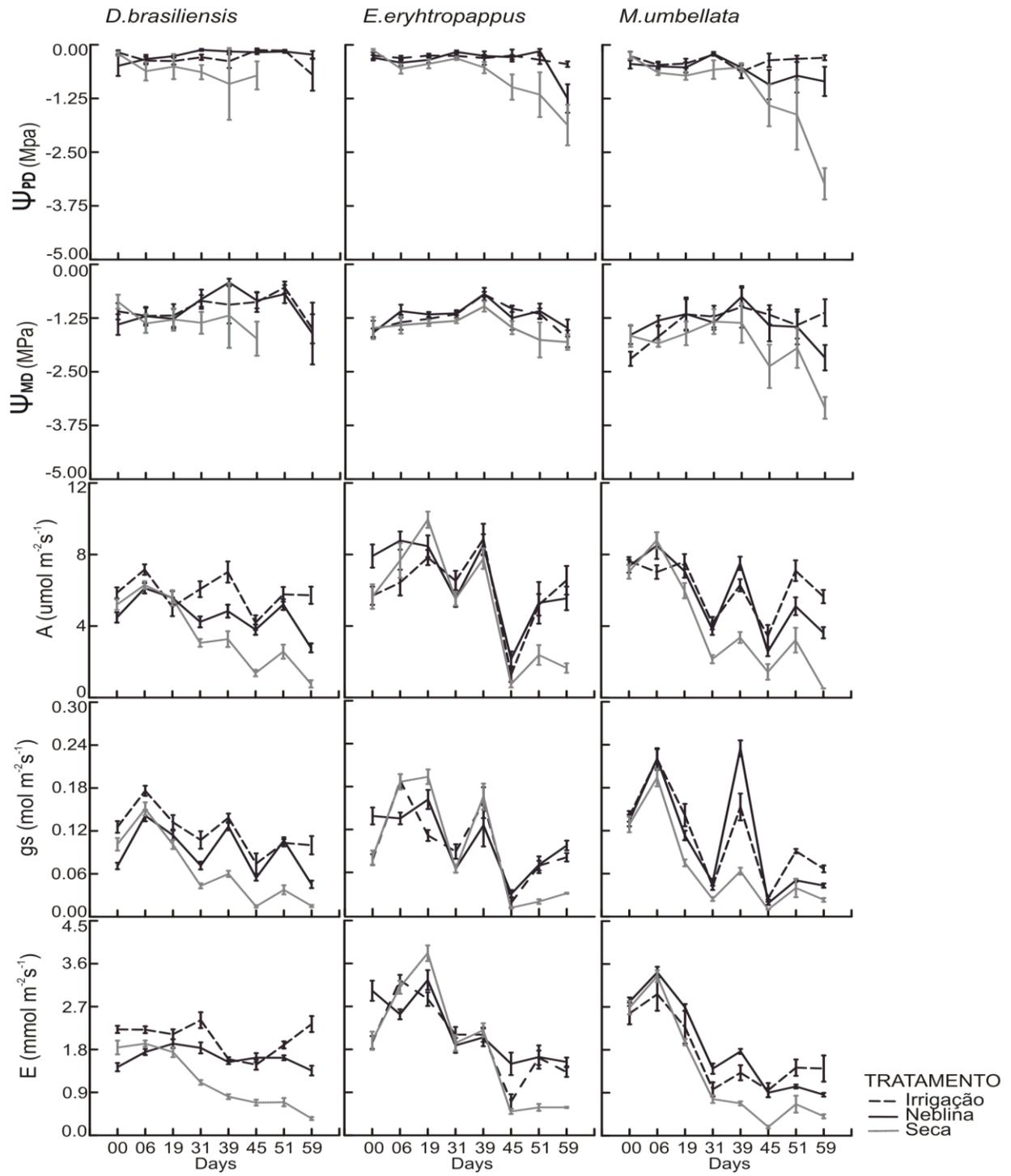
## Figuras



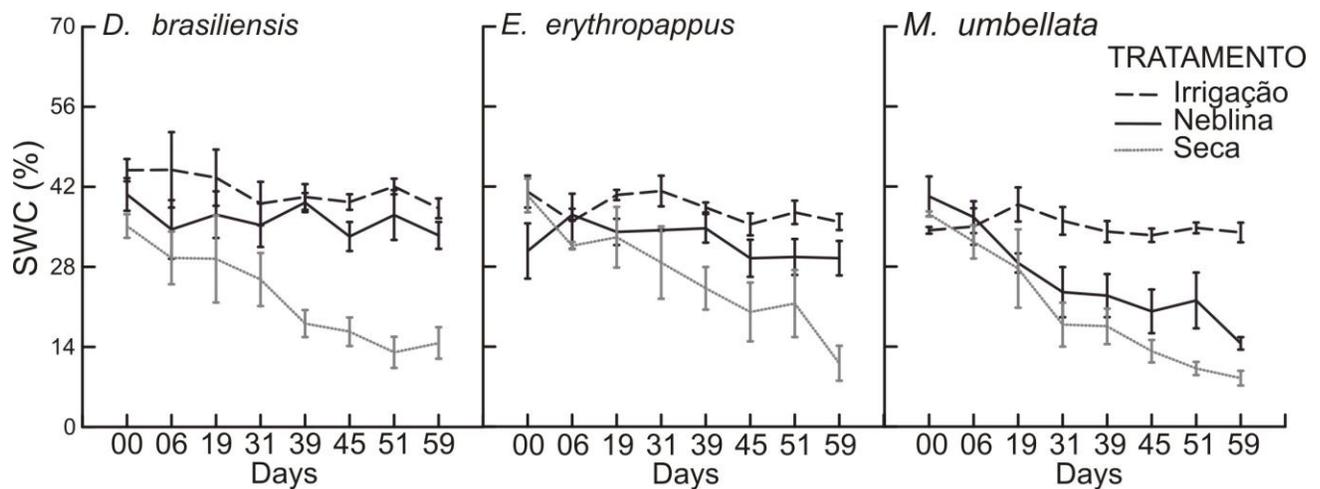
**Figura 1. Conteúdo de água foliar (FWC em %) dos ramos submetidos ao experimento de borrifação das três espécies.** Cada tratamento Borrifação (SP) e Controle (CT) com mesmo número de amostras (N). ANOVA de medidas repetidas em bloco (considerando o indivíduo), usando dados ranqueados: *D. brasiliensis*: N=13; F=8,303; p=0,001;. *E. erythropappus*: N=8; F=3,665; p=0,057; *M. umbellata*: N=10; F=20,956; p<0,001; G.L.=1 em todas as análises. Os pontos representam as médias e, as linhas verticais, os respectivos erros padrão.



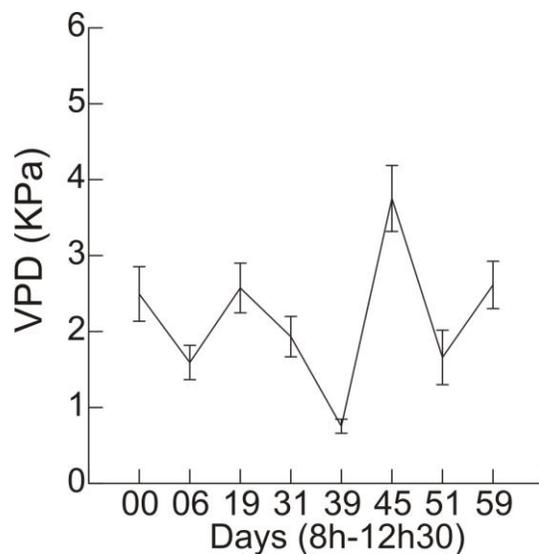
**Figura 2. Potencial hídrico foliar ( $\Psi_L$  em MPa) dos ramos submetidos ao experimento de borrição das três espécies.** Tratamentos: Controle (CT) e Borrição (SP) antes (*before*) e depois (*after*) de serem condicionados no escuro por um período entre uma a duas horas. Cada categoria com número de amostras (N). ANOVA de medidas repetidas para os fatores tratamento e período, seguido pelo teste de Bonferroni: *D. brasiliensis*:  $F=71,297$ ;  $p<0,001$ ; antes da borrição potenciais não diferiram entre SP e CT ( $p=0,87$ ) e aumentam quando borrifados ( $p<0,001$ ) (N=13). *E. erythropappus*:  $F=14,004$ ;  $p<0,001$ ; antes da borrição os potenciais foliares não diferiram entre SP e CT (Bonferroni:  $p=0,34$ ) e aumentam significativamente quando borrifados ( $p= 0,022$ ) (N=11). *M. umbellata*:  $F=3,992$  GL=1  $p=0,048$ ; antes da borrição potenciais não diferiram entre SP e CT ( $p=0,86$ ) e aumentam quando borrifados ( $p=0,013$ ) (N=11); G.L.=1 em todas as análises. Os pontos representam as médias e, as linhas verticais os respectivos erros padrão; asteriscos (\*) indicam as categorias que se distinguem.



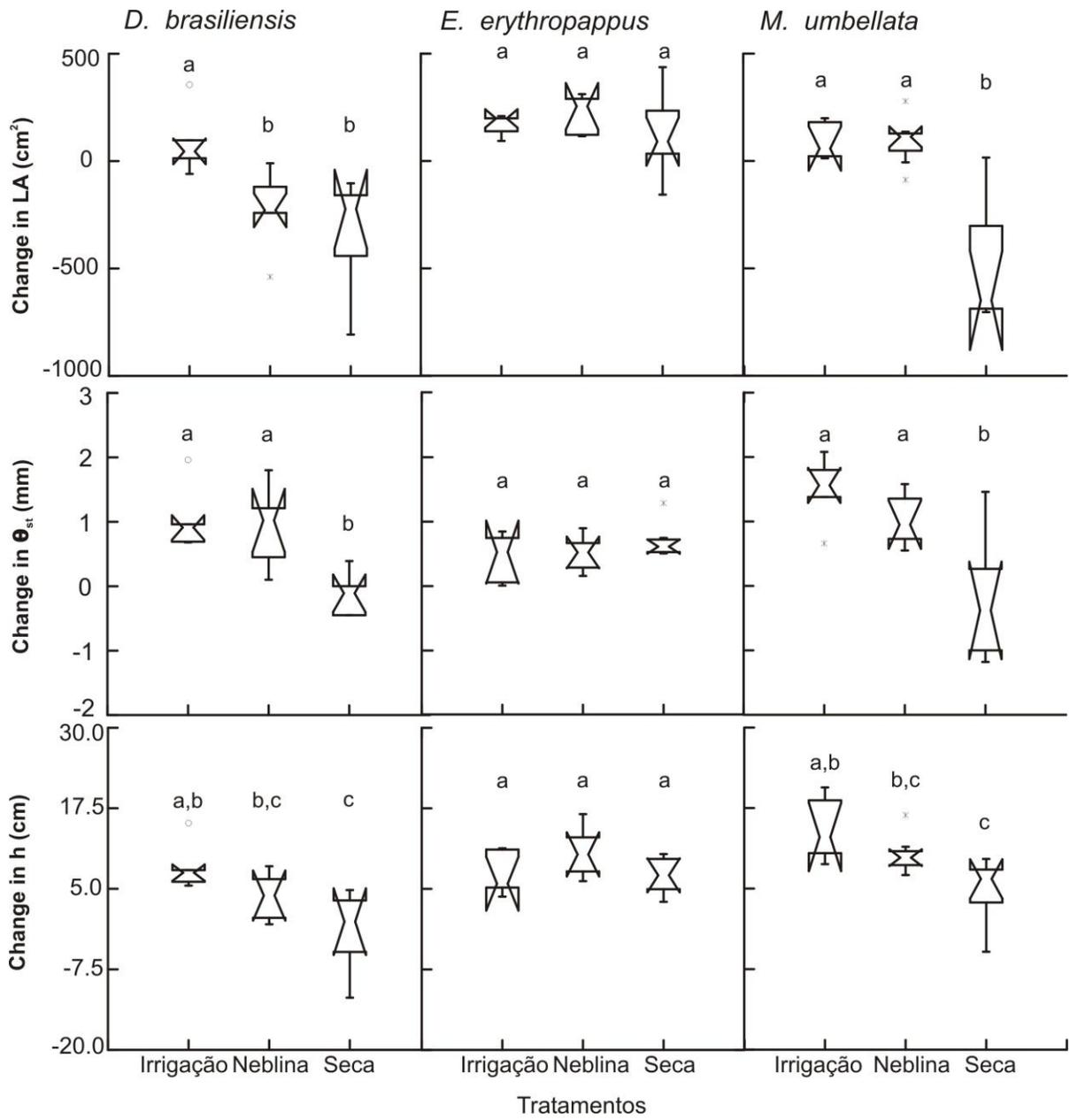
**Figura 3. Dinâmica temporal dos parâmetros ecofisiológicos nos tratamentos de Irrigação, Seca e Neblina das três espécies submetidas à nebulização ao longo de dois meses em experimento na Casa de Vegetação, Campinas/ SP.** *D. brasiliensis* com número de indivíduos (N) iniciais nos tratamentos de Irrigação (N=4), Neblina (N=5) e Seca (N=4), mas no tratamento de seca há redução gradativa do N por morte: no 45º dia (N=3), no 51º dia (N=2) e no 59º dia (N=1). Também não foi possível obter valores do potencial hídrico foliar nos 51º e 59º dias devido a necrose foliar nessa espécie. Em *E. erythropappus* o valor de N não mudou ao longo do experimento (N=4 para todos os tratamentos). *M. umbellata* mantém N=4 para todos os tratamentos, exceto na última medição do 59º dia em que há redução brusca do N da seca, para N=1. Valores da ANOVA de medidas repetidas resumidos na Tabela 1. Pontos das curvas representam a média de cada parâmetro em cada intervalo de medição e as barras verticais representam seu respectivo desvio padrão.  $\Psi_{PD}$ : Potencial hídrico foliar de madrugada (*pre-dawn*: <sub>PD</sub>) (MPa),  $\Psi_{MD}$ : Potencial hídrico foliar ao meio-dia (*midday*: <sub>MD</sub>) (MPa), **A**: Taxa de Assimilação líquida de CO<sub>2</sub> ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de CO<sub>2</sub>), **gs**: Condutância estomática ( $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de H<sub>2</sub>O), **E**: Taxa de Transpiração ( $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).



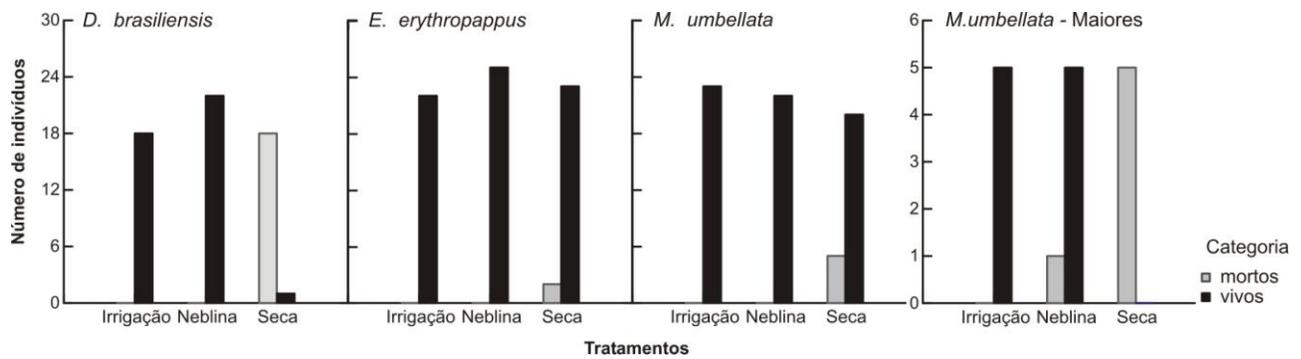
**Figura 4. Conteúdo de água no solo (Soil water content, SWC em %) por tratamento das três espécies ao longo dos dois meses de experimento na Casa de Vegetação, Campinas/ SP.** Ressaltam-se os valores intermediários do SWC coletado dos vasos das plantas sob neblina (menos evidente em *M. umbellata*) e a intensa redução do SWC no tratamento de seca. ANOVA de medidas repetidas para os fatores tratamento e dias de coleta: *D. brasiliensis*:  $F=1,95$ ;  $p=0,031$ ; *E. erythropappus*  $F= 1,94$ ;  $p=0,033$ ; *M. umbellata*:  $F= 3,73$ ;  $p<0,001$ ; (G.L= 14 para todas as análises; resultados do Bonferroni em Resultados). Pontos das curvas representam o valor médio do SWC em cada intervalo de medição e as barras verticais representam seu respectivo desvio padrão.



**Figura 5. Déficit de pressão de vapor (VPD em KPa) ao longo dos dois meses de experimento na Casa de Vegetação, Campinas/ SP (KW= 39,583; G.L=7;  $p < 0,001$ ). Ressalta-se o maior valor do VPD no 45º dia e o menor no 39º dia (Teste Tukey com dados ranqueados:  $p < 0,05$  entre as comparações do 39º dia com o dia zero, 19º dia; do 45º dia com o 6º, 31º, 39º e 51º dia; e do 51º dia com o dia zero). Pontos das curvas representam o valor médio do VPD em cada intervalo de medição, das 8h as 12h30 dos dias de amostragem. Barras verticais representam o respectivo desvio padrão.**



**Figura 6. Parâmetros morfológicos (área foliar total estimada, diâmetro do tronco e altura) por tratamento das três espécies em relação aos valores de início e fim do experimento de longa duração.** Amplitude da diferença (*Change*= valor final-inicial) da área foliar total (*Change in LA*), do diâmetro do tronco (*Change in  $\Theta_{st}$* ) e da altura (*Change in h*). Tratamentos: Irrigação, Neblina e Seca. Cada caixa (Box) representa 50% das observações, as barras verticais representam a amplitude da distribuição, os símbolos \* e ° representam valores extremos. A porção “acinturada” da caixa representa o intervalo de confiança de 95% ao redor da mediana. Valores da ANOVA em Resultados. Para letras iguais os grupos não diferem significativamente (Teste de Bonferroni).



**Figura 7. Número de indivíduos mortos e vivos por tratamento no final dos dois meses em experimento para a mesma classe de tamanho das três espécies e indivíduos maiores de *M. umbellata*.** *D. brasiliensis*: 0% de mortalidade no tratamento de irrigação (Número total de indivíduos, N=18) e neblina (N=22); 94,74% de mortalidade na seca (N=19) ( $\chi^2=54,23$ ; G.L=2;  $p<0,001$ ); *E. erythropappus*: 0% de mortalidade no tratamento de irrigação (N=22) e neblina (N=25) e 8% de mortalidade na seca (N=25) ( $\chi^2=3,87$ ; G.L=2;  $p=0,145$ ). *M. umbellata*: 0% de mortalidade no tratamento de irrigação (N=23) e neblina (N=22) e 20% de mortalidade na seca (N=25) ( $\chi^2=9,69$ ; G.L=2;  $p=0,008$ ). *M. umbellata*, indivíduos maiores (h>60cm): 0% de mortalidade no tratamento de irrigação (N=5), 16,7% na neblina (N=6) e 100% na seca (N=5) ( $\chi^2=12,44$ ; G.L=2;  $p=0,002$ ).

**Tabela 1. Valores da ANOVA de medidas repetidas dos parâmetros do desempenho ecofisiológico do experimento de longa duração (incluindo WUE) quanto aos efeitos dos tratamentos ao longo do tempo (dois fatores: tratamento e dias) para cada espécie separadamente. Quando os valores estatísticos da interação dos dois fatores não são significativos, apresentamos entre parêntesis os valores da mesma análise apenas para o fator tratamento.**

PARÂMETROS	<i>D. brasiliensis</i>			<i>E. erythropappus</i>			<i>M. umbellata</i>		
	F	G.L.	p	F	G.L.	p	F	G.L.	p
$\Psi_{PD}$	1,31 (4,56)	13 (2)	0,315 <b>(0,01)</b>	0,37 (7,56)	14 (2)	0,962 <b>(0,001)</b>	1,08 (8,10)	14 (2)	0,433 <b>(0,001)</b>
$\Psi_{MD}$	0,78	13	0,673	0,36 (6,31)	14 (2)	0,968 <b>(0,001)</b>	1,97	14	<b>0,05</b>
<b>A</b>	11,90	14	<b>&lt;0,001</b>	9,22	14	<b>&lt;0,001</b>	3,85	14	<b>&lt;0,001</b>
<b>gs</b>	9,88	14	<b>&lt;0,001</b>	7,57	14	<b>&lt;0,001</b>	4,17	14	<b>&lt;0,001</b>
<b>E</b>	18,55	14	<b>&lt;0,001</b>	12,44	14	<b>&lt;0,001</b>	8,38	14	<b>&lt;0,001</b>
<b>WUE</b>	2,69	14	<b>&lt;0,001</b>	8,20	14	<b>&lt;0,001</b>	4,85	14	<b>&lt;0,001</b>

## Referências bibliográficas

- Allen C.D. & Breshears D.D. (1998) Drought-induced shift of a forest–woodland ecotone: rapid landscape response to climate variation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 14839–14842.
- Arambarri A.M., Freire S.E, Colares M.N, Bayón N.D, Novoa M.C, Monri C. & Stenglein S.A. (2006) Leaf anatomy of medicinal shrubs and trees from Gallery forests of the paranaense province (Argentina): Part 1. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 41, 233–268.
- Bhaskar R. & Ackerly D.D. (2006) Ecological relevance of minimum seasonal water potentials. *Physiologia Plantarum* 127 353-359.
- Bieras A.C. & Sajo M.G. (2009) Leaf structure of the cerrado (Brazilian savanna) woody plants. *Trees - Structure and Function* 23, 451-471.
- Boyce, C. K, M. A Zwieniecki, G. D Cody, C. Jacobsen, S. Wirick, A. H Knoll, e N. M Holbrook. (2004) Evolution of xylem lignification and hydrogel transport regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 17555-17558.
- Boucher J.F., Munson A.D. & Bernier P.Y. (1995) Foliar absorption of dew influences shoot water potential and root growth in *Pinus strobes* seedlings. *Tree Physiology* 15, 815–823.
- Boyer J.S. (1970) Differing sensitivity of photosynthesis to low leaf water potential in corn and soybean. *Plant Physiology* 46, 236-239.
- Bréda N., Huc R., Granier A. & Dreyer E. (2006) Temperate forest trees and stands under severe drought: a review of ecophysiological responses, adaptation processes and long-term consequences. *Annals of Forest Science* 63, 625–544.
- Breshears D.D., Cobb N.S., Rich P.M., Price K.P. & Allen C.D. (2005) Regional vegetation die-off in response to global-change type drought. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 15144–15148.

- Breshears D.D., McDowell N.G., Goddard K.L., *et al.* (2008) Foliar absorption of intercepted rainfall improves woody plant water status most during drought. *Ecology* 89, 41–47.
- Brewer C.A., Smith W.K. & Volgelmann (1991) Functional interaction between leaf trichomes, leaf wettability and the optical properties of water droplets. *Plant, Cell and Environment* 14, 955-962.
- Burgess S. S.O. & Dawson T.E. (2004) The contribution of fog to the water relations of *Sequoia sempervirens* (D. Don): foliar uptake and prevention of dehydration. *Plant Cell and Environment* 27, 1023-1034.
- Burkhardt J. (2010) Hygroscopic particles on leaves: nutrients or desiccants? *Ecological Monographs* 80, 369-399.
- Cavalier J. & Goldstein G. (1989) Mist and fog interception in elfin cloud forest in Colombia and Venezuela. *Journal of Tropical Ecology* 5, 309-322.
- Cavelier J., Solis D. & Jaramillo M.A. (1996) Fog Interception in Montane Forests Across the Central Cordillera of Panama. *Journal of Tropical Ecology* 12, 357-369.
- Chaves M.M. (1991) Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of Experimental Botany* 42, 1-16.
- Chen S., Bai Y., Lin G. & Han X. (2005) Variations in life-form composition and foliar carbon isotope discrimination among eight plant communities under different soil moisture conditions in the Xilin River Basin, Inner Mongolia, China. *Ecology Research* 20, 167-176.
- Ciais P., Reichstein M., Viovy N., Granier A., Ogee J., *et al.* (2005) Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003. *Nature* 437, 529-533.
- Colwell R.K., Brehm G., Cardelús C.L. Gilman A.C., Longino J.T. (2008) Global warming, elevational range shifts, and lowland biotic attrition in the wet tropics. *Science* 322, 258-261.

- Comita L.S. & Engelbrecht M.J. (2009) by the Ecological Society of America Seasonal and spatial variation in water availability drive habitat associations in a tropical forest *Ecology*, 90(10), 2009, pp. 2755–2765
- Condit R., Hubbell S.P. & Foster R.B. (1995) Mortality rates of 205 neotropical tree and shrub species and the impact of severe drought. *Ecol Monogr* 65, 419–439.
- Cook E.R., Woodhouse C.A., Eakin C.M., Meko D.M. & Stahle D.W. (2004) Long-term aridity changes in the western United States. *Science* 306, 1015–1018.
- Cornic G. (2000) Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture – not by affecting ATP synthesis. *Trends in plant science* (Comment) 5, 187-188.
- Dawson T.E. (1998) Fog in the California redwood forest: ecosystem inputs and use by plants. *Oecologia* 117, 476-485.
- Ellis R.C. (1971) Rainfall, fog drip and evaporation in a mountainous area of southern Australia. *Australian Forestry* 35, 99–106.
- Engelbrecht B.M.J., Kursar T.A., Tyree M.T. (2005) Drought effects on seedling survival in a tropical moist forest. *Trees-Structure and Function* 19, 312–321.
- Engelbrecht B.M.J, Comita L.S, Condit R., Kursar T.A., Tyree M.T., Turner B.L. & Hubbell S.P. (2007) Drought sensitivity shapes species distribution patterns in tropical forests. *Nature* 447, 80-82. doi:10.1038/nature05747.
- Falkenberg D.B. & Voltolini J.C. (1995) The montane cloud forest in Southern Brazil, p.: 138-149. In *Tropical montane cloud forest*. (Eds. Hamilton, L.S., Juvik, J.O. & Scatena F.N.). Springer-Verlag, New York/USA.
- Feild T.S., Zwieniecki M.A, Donighue M.J. & Holdbrook M. (1998) Stomatal plugs of *Drimys winteri* (Winteraceae) protect leaves from mist but not drought. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America* 95, 14256–14259.

- Feild T.S & Holbrook N.M. (2000) Xylem sap flow and stem hydraulics of vesselless angiosperm *Drimys granadensis* (Winteraceae) in a Costa Rican elfin forest. *Plant, Cell and Environment* 23, 1067-1077.
- Fisher R.A., Williams M., Vale R.L., Costa, A.L. & Meir P. (2006) Evidence from Amazonian forests is consistent with isohydric control of leaf water potential. *Plant, Cell & Environment* 29, 151-165.
- Foster P. (2001) The potential negative impacts of global climate change on tropical montane cloud forests. *Earth-Science Reviews* 55, 73-106.
- Freitas M.F. (2003) Estudos taxonômicos das espécies de *Myrsine* L. (Myrsinaceae) nas regiões sudeste e sul do Brasil. pp.50-83. Tese de doutorado. pp.15-173. UNICAMP, Campinas/SP – Brasil.
- Gaertner E.E. (1964) Tree growth in relation to the environment. *The Botanical Review* 30: 393-436.
- Gitlin A.R., Sthultz C.M., Bowker M.A., Stumpf S., Paxton K.L., Kennedy K., Munoz A., Bailey J.A. & Whitham T.G. (2006) Mortality gradients within and among dominant plant populations as barometers of ecosystem change during extreme drought. *Conservation Biology* 20, 1477–1486.
- Goldstein G., Andrade J.L., Meinzer F.C., Holdbrook N.M, Cavalier J. Jackson P. & Celis A. (1998) Stem water storage and diurnal patterns of water use in tropical forest canopy trees. *Plant, Cell and Environment*, 21, 397-406.
- Grammatikopoulos G. & Manetas Y. (1994) Direct absorption of water by hairy leaves of *Phlomis fruticosa* and its contribution to drought avoidance. *Canadian Journal of Botany* 72, 1805-1811.
- Grammatikopoulos G. (1999) Mechanisms of drought tolerance in two Mediterranean seasonal dimorphic shrubs. *Australian journal of plant physiology* 26, 587–594.

- Gouvra E. & Grammatikopoulos G. (2003) Beneficial effects of direct foliar water uptake on shoot water potential of five chasmophytes. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 81, 1280-1286.
- Gucci R., Massai R., Xiloyannis C. & Flore J.A. (1996) The effect of drought and vapour pressure deficit on gas exchange of young kiwifruit (*Actinidia deliciosa* var. *deliciosa*) vines. *Annals of Botany* 77, 605-613.
- Hacke U.G., Sperry J.S., Pockman W.T, Davis S.D. & McCulloh K.A. (2001) Trends in wood density and structure are linked to prevention of xylem implosion by negative pressure. *Oecologia* 126, 457-461.
- Hacke U.G. & Sperry J.S. (2001) Functional and ecological xylem anatomy. *Urban & Fischer Verlag* 4/2, 97-115.
- Holbrook N.M & Franco A.C (2005) From wet to dry: tropical trees in relation to water availability. *Trees* 19, 280–281.
- Hsiao T.C. (1973) Plant response to water stress. *Annual Review of Plant Physiology* 4, 519-70.
- Hsiao T.C. & Bradford K.J. (1983) Physiological consequences of cellular water deficits. In *Limitations to efficient water use in crop production* (eds. Taylor H.M., Jordon W.R & Sinclair T.R.). p.227-265. Wisconsin, ASA/ CSSA/ SSSA.
- Hutley L.B, Doley D., Yates D.J. & Boonsaner A. (1997) Water Balance of an Australian Subtropical Rainforest at Altitude: the Ecological and Physiological Significance of Intercepted Cloud and Fog. *Australian Journal of Botany* 45, 311–329.
- IPCC (2007) Climate change 2007: the physical science basis. Contribution of Working Group I to the Forth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, 1009. Cambridge – UK
- Johnson D.M. & Smith W.K. (2008) Cloud immersion alters microclimate, photosynthesis and water relations in *Rhododendron catawbiense* and *Abies fraseri* seedlings in the southern Appalachian Mountains, USA. *Tree physiology* 28, 385.

- Jones H.G. & Sutherland R.A. (1991) Stomatal control of xylem embolism. *Plant, Cell and Environment* 14, 607-612.
- Jurskis V. (2005) Eucalypt decline in Australia, and a general concept of tree decline and dieback. *Forest Ecology and Management* 215, 1–20.
- Kapos V. (1989) Effects of Isolation on the Water Status of Forest Patches in the Brazilian Amazon. *Journal of Tropical Ecology* 5, 173-185.
- Kaiser W.M. (1987) Effects of water deficit on photosynthetic capacity. *Physiologia Plantarum* 71, 142-149.
- Kramer P.J. (1983) *Water relations of plants*. Academic press inc Ltd. London - UK
- Kramer P. & Boyer J. (1995) *Water relations of plants and soils*. Academic Press, San Diego, CA – USA.
- Kimmins J.P. (1987) *Forest Ecology*. Macmillan, New York – USA.
- Kittredge J. (1948) *Forest Influences*. McGraw-Hill, New York – USA.
- Krieg D.R. (1993) Stress tolerance mechanisms in above ground organs. p. 65-79. In *Proceedings of the Workshop on Adaptation of Plants to Soil Stress*. INTSORMIL, Nebraska - USA
- Lambers H., Chapin III F.S. & Pons T.L. (2006) *Plant physiological ecology*. 540p. Imprenta New York: Springer – USA.
- Larcher W. (2006) *Ecofisiologia vegetal*. RiMa, São Carlos, SP/Brasil.
- Lawlor D.W. & Cornic G. (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment* 25, 275–294.
- Leuschner C. (2000) Are the high elevations in Tropical Montane Arid Environments for plants? *Ecology* 81, 1425-1436.
- Limm E., Simonin K., Bothman A. & Dawson T. (2009) Foliar water uptake: a common water acquisition strategy for plants of the redwood forest. *Oecologia* 161, 449-459.

- Lovett G.M., Reiners W.A., Olson R.K. (1982) Cloud droplet deposition in subalpine balsam fir forests: hydrological and chemical inputs. *Science* 218, 1302–1303.
- Mansur R.J.C.N. & Barbosa D.C.A. (2000) Comportamento fisiológico em plantas jovens de quatro espécies lenhosas da caatinga submetidas a dois ciclos de estresse hídrico. *Phyton* 68, 97-106.
- Martin C.E. & von Willert D.J. (2000) Leaf epidermal hydathodes and the ecophysiological consequences of foliar water uptake in species of *Crassula* from the Namib Desert in southern Africa. *Plant Biology* 2, 229-242.
- Mastroberti A.A. & Mariath J.E.A. (2008) Development of mucilage cells of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). *Protoplasma* 232, 222-245.
- Martin B. & Ruiz-Torres N.A. (1992) Effects of water-deficit stress on photosynthesis, its components and component limitations, and on water use efficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiology* 100, 733-739.
- McDowell N., Pockman W.T, Allen C.D *et al.* (2008) Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? *New Phytologist* 178, 719-739. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02436.x
- McJannet D., Wallace J. & Reddell P. (2007) Precipitation interception in Australian tropical rainforests: II. Altitudinal gradients of cloud interception, stemflow, throughfall and interception. *Hydrological Processes* 21, 1703–1718.
- Meidner H. & Sheriff D.W. (1976) *Water and Plants* (Tertiary Biology Series). pp.1-135. Blackie, Glasgow and London.
- Meinzer F.C. (2003) Functional convergence in plant responses to the environment. *Oecologia* 134, 1–11.
- Meireles L.D., Shepherd G.L. & Kinoshita L.S. (2008) Variações na composição florística e na estrutura fitossociológica de uma floresta ombrófila densa alto-montana na Serra da Mantiqueira, Monte Verde, MG. *Revista Brasileira de Botânica* 31, 559-574.

- Metcalf C. R. (1987) *Anatomy of the dicotyledons: Magnoliales, Illiciales & Laurales* (sensu Armen Takhtajan). 2<sup>o</sup>ed. Vol.III. Claredon Press Oxford, New York - USA.
- Monteith J.L. (1995) A reinterpretation of stomatal responses to humidity. *Plant Cell and Environment* 18: 357-364.
- Munné-Bosch S., Nogues S. & Alegre L. (1999) Diurnal variations of photosynthesis and dew absorption by leaves in two evergreen shrubs growing in Mediterranean field conditions. *New Phytologist* 144, 109-119.
- Nakagawa M., Tanaka K., Nakashizuka T., Ohkubo T. *et al.* (2000) Impact of severe drought associated with the 1997–1998 El Nino in a tropical forest in Sarawak. *Journal of Tropical Ecology* 16, 355–367.
- Naves-Barbiero C.C., Franco, A.C., Bucci S.J. & Goldstein G. (2000) Fluxo de seiva e condutância estomática de duas espécies lenhosas sempre-verdes no campo sujo e cerrado. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12, 119-134.
- Nepstad D., Lefebvre P., Da Silva U.L., Tomasella J., Schlesinger P., Solorzano L., Moutinho P., Ray D. & Benito J.G. (2004) Amazon drought and its implications for forest flammability and tree growth: a basin-wide analysis. *Global Change Biology* 10, 704–717.
- Nimer E. (1977) Clima. *Geografia do Brasil* Vol. 3. pp. 51-89. Regido Sudeste, Fundagco Instituto de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro/ RJ - Brasil.
- Oliveira R. S., Dawson T.E, Burgess S.S.O. & Nepstad D.C. (2005) Hydraulic redistribution in three Amazonian trees. *Oecologia* 145, 354-363.
- Oliveira, R.S, Martinelli, L.A., Camargo, P., Lara, L. & Paes, L. (2007) *O papel da neblina como fonte de água nas Florestas Ombrófilas Montanas no Estado de São Paulo*. Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 23 a 28 de Setembro de 2007, Caxambu – MG/Brasil.
- Pounds J.A., Fodgen M.P.L. & Campbell J.H. (1999) Biological response to climatic change on a tropical mountain. *Nature* 398, 411–415.

- Qiu Y., Hong-lang X., Liang-ju Z., Sheng-cun X., Mao-xian Z., Cai-zhi L. & Liang Z. (2010) Research progress on water uptake through foliage. *Acta Ecologica Sinica* 30, 172-177.
- Reinhardt K. & Smith W.K. (2008) Leaf gas exchange of understory spruce-fir saplings in relict cloud forests, southern Appalachian Mountains, USA. *Tree physiology* 28, 113-122.
- Ritter A., Regalado C.M. & Aschan G. (2009) Fog reduces transpiration in tree species of the Canarian relict heath-laurel cloud forest (Garajonay National Park, Spain). *Tree Physiology* 29, 517.
- Rundel P.W. (1982) Water uptake by organs other than roots. In *Physiological Plant Ecology*. Vol. II. Water Relations and Carbon Assimilation. (eds. Lange O.L., Nobel P.S., Osmond C.B. & Ziegler H.) pp. 111–134. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York – USA.
- Safford H. D. (1999a). Brazilian Páramos I. An introduction to the physical environment and vegetation of the campos de altitude. *Journal of Biogeography* 26, 693–712.
- Safford H. D. (1999b) Brazilian paramos II. Macro- and mesoclimate of the campos de altitude and affinities with high mountain climates of the tropical Andes and Costa Rica. *Journal of Biogeography* 26, 713-737.
- Saha S., BassiriRad H. & Joseph G. (2005) Phenology and water relations of tree sprouts and seedlings in a tropical deciduous forest of South India. *Trees - Structure and Function* 19, 322-325.
- Salleo L.S., Lo Gullo M.A., Trifiló P. & Nardini A. (2004) New evidence for a role of vessel-associated cells and phloem in the rapid xylem refilling of cavitated stems of *Laurus nobilis*. *Plant, Cell and Environment* 27, 1065–1076.
- Sarmiento G., Goldstein G. & Meinzer F. (1985) Adaptive strategies of woody species in neotropical savannas. *Biological Review*, 60: 315- 355,
- Schulze E.D., Lange O.L., Buschbom U., Kappen L. & Evenary M. (1972) Stomatal response to changes in humidity in plants growing in the desert. *Planta* 108, 259-270.

- Schulze E.D., Lange O.L., Kappen L., Evenari M. & Buschbom U. (1975) The role of air humidity and leaf temperature in controlling stomatal resistance of *Prunus armeniaca* L. under desert conditions. *Oecologia* 18, 219-233.
- Schulze E.D. (1986) Carbon dioxide and water vapor exchange in response to drought in the atmosphere and in the soil. *Annual Review of Plant Physiology* 37, 247–274.
- Seager R., Ting M., Held I., Kushnir Y., *et al.* (2007) Model projections on an imminent transition to a more arid climate in southwestern North America. *Science* 316, 1181-1184.
- Segadas-Vianna F. & Dau L. (1965). Ecology of the Itatiaia range, Southeastern Brazil. II – Climates. *Arquivos do Museu Nacional* 53: 31–53.
- Slatyer R.O. (1960) Absorption of water by plants. *Botanical Review* 26, 331-392.
- Slik J.W.F. (2004) El Niño droughts and their effects on tree species composition and diversity in tropical rain forests. *Oecologia* 141, 114–120.
- Simonin K.A., Santiago L.S., Dawson T.E. (2009) Fog interception by *Sequoia sempervirens* (D.Don) crowns decouples physiology from soil water deficit. *Plant Cell and Environment* 32, 882–892.
- Smith W.K. & McClean T.M. (1989) Adaptive Relationship Between Leaf Water Repellency, Stomatal Distribution, and Gas Exchange. *American Journal of Botany* 76, 465-469.
- Sperry J.S., Hacke U.G, Oren R. & Comstock J.P. (2002) Water deficits and hydraulic limits to leaf water supply. *Plant, Cell and Environment* 25, 251–263.
- Sperry J.S. (2003) Evolution of water transport and xylem structure. *Int. J. Plant Sci.* 164(3 Suppl.), S115–S127. 1058-5893/2003/16403S-0009.
- Still C.J., Foster P.N. & Schneider S.H. (1999) Simulating the effects of climate change on tropical montane cloud forests. *Nature* 398, 608–610.
- Stone E.C. (1957a) Dew as an ecological factor. I. A review of literature. *Ecology* 38, 407-413.

- Stone E.C. (1957b) Dew as an ecological factor. II. The effect of artificial dew on the survival of *Pinus podenrosa* and associated species. *Ecology* 38, 414-422.
- Stone E.C., Went F.W. & Young C.L. (1950) Water absorption from the atmosphere by plants growing in dry soil. *Science* 111, 546-548.
- Suarez M.L., Ghermandi L., Kitzberger T. (2004) Factors predisposing episodic drought-induced tree mortality in *Nothofagus* - site, climatic sensitivity, and growth trends. *Journal of Ecology* 92, 954-966.
- Taiz L. & Zeiger E. (2006). *Plant physiology* 4<sup>ed</sup>. 764p. Sunderland, Sinauer.
- Thomas D.S., Eamus D. & Shanahan S. (2000) Influence of season, drought and xylem ABA on stomatal responses to leaf-to-air vapour pressure difference of trees of the Australian wet-dry tropics. *Australian Journal of Botany* 48, 143-151.
- Van Hove L.W.A, & Adema E.H. (1996) The effective thickness of water films on leaves. *Atmospheric Environment* 30, 2933-2936.
- Veloso H.P., Rangel-Filho A.L.R. & Lima J.C.A. (1991) *Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal*. IBGE, Rio de Janeiro - Brasil.
- Vogelmann H.W. (1973) Fog precipitation in the cloud forests of eastern Mexico. *BioScience* 23, 96-100.
- Weaver P.L. (1972) Cloud moisture interception in the Luquillo Mountains of Puerto Rico. *Caribbean J. Sci.* 12, 129-144.
- Westhoff M., Zimmermann D., Zimmermann G. *et al.* (2009) Distribution and function of epistomatal mucilage plugs. *Protoplasma* 235, 101-105.
- Whitmore T.C. (1998) Potential impact of climatic change on tropical rain forest seedlings and forest regeneration. *Climatic Change* 39, 429-438.

- Widholzer C.F.N. (2005) Bases anatômicas do transporte de água e solutos através da epiderme foliar: estudos de *Sophranitis cernua* Ldl. (Orchidaceae). pp.50-83. Tese de doutorado. UFRGS, Porto Alegre/RS – Brasil.
- Wright S.J. & Cornejo F.H. (1990) Seasonal drought and leaf fall in a tropical forest. *Ecology* 71, 1165–1175.
- WWF (2010) *Mata Atlântica*. Disponível em: <http://www.wwf.org.br>. Acesso em 30/03/2010.
- Yates D.J. & Hutley L.B. 1995. Foliar uptake of water by wet leaves of *Sloanea woollsii* an Australian subtropical rainforest tree. *Australian Journal of Botany* 43, 157-167.
- Young J.W.H., Wong S.C. & Farquhar G.D. (1997) Stomatal responses to changes in vapour pressure difference between leaf and air. *Plant, Cell and Environment* 20, 1213-1216.
- Zadroga F. (1981) The hydrological importance of a montane cloud forest area of Costa Rica. In *Tropical Agricultural Hydrology* (eds. Lal R., Russell E.W.). p. 59–73. Wiley, New York – USA.
- Zimmermann U., Schneider H., Wegner L.H. & Haase A. (2004) Water ascent in tall trees: does evolution of land plants rely on a highly metastable state? *New Phytologist* 162, 575-615.
- Zimmermann D., Westhoff M., Zimmermann, G. et al. (2007) Foliar water supply of tall trees: evidence for mucilage-facilitated moisture uptake from the atmosphere and the impact on pressure bomb measurements. *Protoplasma* 232, 11-34.
- Zwieniecki M.A., Melcher P.J. & Holbrook N.M (2001) Hydrogel Control of Xylem Hydraulic Resistance in Plants. *Science* 291, 1059-1062.

## Considerações finais

A absorção de água pelas folhas foi descrita em espécies de ambientes xéricos, temperados e também em espécies criptógamas, epífitas, poiquilohídricas, sendo inédita a investigação dessa estratégia em espécies lenhosas da Mata Atlântica. Oliveira *et al.* (2007) sugeriram que a absorção direta de neblina pelas folhas é uma importante via absorptiva em espécies de Florestas Ombrófilas Montanas da Serra do Mar pois verificaram um enriquecimento em  $^{18}\text{O}$  na água do xilema em algumas espécies após evento de neblina. Além disso, a maioria dos trabalhos sobre absorção foliar concentra-se apenas em uma única espécie (Limm *et al.* 2009). No presente estudo verificamos a absorção de água diretamente pelas folhas ocorrendo nas três espécies através de métodos diretos (Capítulo I) e indiretos (Capítulo II). Atualmente a aquisição de água pelas folhas tem sido reconhecida como uma estratégia comum em plantas de diferentes ecossistemas ao redor do mundo como forma de prevenção ao estresse hídrico (Limm *et al.* 2009).

No nosso estudo reconhecemos a aquisição de água pelas folhas em quantidades expressivas nas três espécies utilizando isótopos estáveis, sendo maior em *D. brasiliensis*. Nesta espécie, verificamos inclusive fluxo reverso da seiva durante nebulização artificial. Também compreendemos melhor as vias de difusão e deposição das soluções interceptadas na folha pelo emprego dos sais fluorescentes traçadores de vias apoplásticas. Nas três espécies a solução difundiu pela cutícula para o interior foliar, envolvendo grande acúmulo nos tricomas tectores de *E. erythropappus* e nos tricomas glandulares de *M. umbellata* e também de outra espécie do mesmo gênero (*M. ferruginea*). Embora uma das principais funções da cutícula seja de proteção à perda excessiva de água pela transpiração, muitas evidências demonstram que possa atuar no processo absorptivo inclusive de forma responsiva a fatores ambientais, p. ex. aumentando a permeabilidade com o aumento da umidade relativa, o que confere à cutícula um dinamismo funcional (Schönherr 1976a,b, 2006; Kerstiens 1996, 2006; Schreiber *et al.* 2001; Schönherr, Fernández & Schreiber *al.* 2005; Widholzer 2005).

A difusão dos sais ocorreu pelo mesofilo das três espécies aumentando a concentração quanto maior exposição à solução, aparentemente sem envolver nenhuma estrutura especializada em *D. brasiliensis*, mas acumulou de forma particular no xilema de *E. erythropappus* e nas

células coletoras de *M. umbellata*. Com a caracterização anatômica das espécies podemos compreender melhor as estruturas particulares de cada espécie e fazer correlações com os resultados dos sais fluorescentes. São poucos trabalhos que, como este, conectam conhecimentos em anatomia vegetal e ecofisiologia, lacuna essa que foi reconhecida em estudos da absorção de água pelas folhas (Burgess & Dawson 2004; Limm *et al.* 2009; Qiu *et al.* 2010).

Além da caracterização do processo absorptivo, também reconhecemos melhora no desempenho ecofisiológico a curto e longo prazo a partir da absorção de água de neblina pelas folhas de três espécies de mata de altitude, beneficiando inclusive a morfologia vegetal e a sobrevivência de *D. brasiliensis* e *M. umbellata*. A absorção pelas folhas apenas constitui uma via alternativa, complementar quando há déficit hídrico. Não atribuímos a essa via um valor de importância igual ou maior ao da via radicular, inclusive reconhecemos que a água no solo foi determinante para o desempenho ecofisiológico máximo durante o experimento em longo prazo nas três espécies (Capítulo II). Nosso objetivo foi apresentar novas possibilidades nas relações hídricas em plantas de ambientes em que a formação de neblina é intensa mesmo nos períodos de estiagem. Conferimos que, de fato, as folhas podem desempenhar um papel complementar absorvendo a água e favorecendo a manutenção do *status* hídrico, o ganho líquido de carbono e as taxas gasosas, podendo inclusive ser determinante quando a seca se prolonga para manter a morfologia vegetal e as funções vitais.

As espécies apresentaram particularidades quanto à intensidade dessa absorção e aos benefícios sobre cada parâmetro medido. *D. brasiliensis*, por exemplo, demonstrou maior sensibilidade a seca, demonstrando danos irreversíveis já no primeiro mês do experimento de longa duração. Nessa espécie a melhora proporcionada pela nebulização foi evidente, nem tanto pelo desempenho ecofisiológico, mas principalmente pela redução dos processos de necrose foliar e caulinar que conferiu a sobrevivência de todos os indivíduos. *M. umbellata*, por várias evidências (de curto e longo prazo), parece utilizar ajustes osmóticos nas relações hídricas das plantas sob seca e neblina, tornando suas respostas mais complexas, especialmente as relativas ao potencial hídrico, mas mesmo nesse parâmetro podemos notar melhora pela nebulização exclusiva da parte aérea. *E. erythropappus* por sua vez apresentou benefícios nas respostas ecofisiológicas pela nebulização em comparação a seca. Esta espécie parece ter uma resposta

mais tardia a seca, resistindo mais tempo sem alterar o aspecto morfológico. Em contrapartida, os benefícios da exposição da umidade sobre as folhas já foram inclusive relatados mesmo em espécies incapazes de absorver água diretamente pelas folhas, pois pode haver supressão da transpiração mesmo durante as noites (Limm *et al.* 2009). Os eventos que proporcionam umidade nas folhas aumentam a eficácia do re-equilíbrio noturno com a disposição de água no solo e o aumento do potencial hídrico foliar (Limm *et al.* 2009).

Ainda são necessários mais estudos na comunidade para reconhecer se o potencial de absorção de água pelas folhas é uma estratégia comum nos ambientes alto-montanos por serem comumente expostos a períodos de secas com saturação atmosférica que produz umidade sobre as folhas. Limm *et al.* (2009), por exemplo, verificaram absorção de água foliar entre diferentes táxons dominantes nas florestas de sequóia californianas. Nesse ecossistema 80% das espécies de diferentes hábitos (pteridófitas, arbustos, árvores) absorveram água pelas folhas. Inclusive, torna-se relevante discutir que a absorção de água pelas folhas não se inclui na maioria dos modelos ecológicos, hidrológicos e atmosféricos, o que tem implicações na interpretação das assinaturas isotópicas e sobre a quantidade de entrada de água no ecossistema (Farquhar *et al.* 1993).

Recentemente Simonin, Santiago & Dawson (2009) verificaram o desacoplamento da fisiologia da parte aérea do potencial hídrico do solo, em decorrência da absorção de água pelas folhas, sugerindo modificações às relações hídricas previstas pelo modelo unidirecional do contínuo Solo-Planta-Atmosfera (SPAC). Nesse trabalho, o *status* hídrico das sequóias que absorveram água pelas folhas demonstrou independência do *status* hídrico do solo. E assim, os autores inseriram novos termos às fórmulas que prevêm o fluxo de água no sistema, sendo eles: o parâmetro de eficiência na absorção foliar e o gradiente de potencial hídrico entre o dossel interceptador de neblina e a folha. O modelo do SPAC apresenta baixa previsibilidade quando a formação de atmosfera saturada é frequente. Além disso, assume condições constantes ao longo do trajeto da água que raramente existe em plantas, pois o fluxo varia dentro e entre segmentos, como por exemplo, ao longo do xilema em ramos submetidos a diferentes condições microclimáticas (Kozlowski & Pallardy 1997; Zimmermann *et al.* 2007).

A mudança conceitual do modelo SPAC tem implicações para os modelos climáticos, pois estes sempre consideram água no solo como determinante da transpiração e fotossíntese de

plantas. O funcionamento das plantas capazes de absorver água pelas folhas poderia desassociar do *status* hídrico do solo. Dessa forma, uma melhor compreensão e representação dos processos que afetam a sobrevivência e modulam o crescimento de plantas e a produtividade de ecossistemas nativos é essencial para aumentar a previsibilidade dos modelos que simulam o funcionamento de ecossistemas e a distribuição de espécies sob diversos cenários climáticos. Ainda há poucos estudos sobre a ecologia funcional de espécies lenhosas tropicais que permita conhecer melhor seus envelopes bioclimáticos. Esses podem ser determinados por parâmetros climáticos ou pela tolerância fisiológica teórica dos organismos, sendo projetado sobre grades (*grids*) do clima atual para identificar a extensão potencial dos limites climáticos atuais das espécies. Dessa forma, pode-se prever mudanças em sua distribuição e os limites potenciais de deslocamento sob cenários de alterações climáticas (Araújo & Guisan 2006), além de estimar taxas de extinção das espécies (Williams *et al.* 2003; Thomas *et al.* 2004).

Os cenários climáticos apontados por modelos de circulação global (GCMs) para estas regiões sugerem que haverá um aumento na altitude média das camadas de nuvens orográficas que dão origem à neblina (Still, Foster & Schneider 1999; Milly *et al.* 2002; Palmer & Raianen 2002; Foster 2001). Bruijnzeel (2002) cita diversos autores que apontam a possibilidade do aquecimento global elevar o patamar altimétrico de condensação das nuvens e diminuir a interceptação de água nos ecossistemas. Em diversas regiões, a taxa de desaparecimento das florestas em montanhas excede as das áreas pluviais tropicais de menores altitudes, inclusive em decorrência baixa resiliência dos ambientes montanos (Hamilton *et al.* 1995). A diminuição da umidade que chega às florestas alto-montanas pela neblina poderá exacerbar os efeitos de estações secas provavelmente mais longas e variáveis (Still *et al.* 1999; Foster 2001).

A vegetação de florestas alto-montanas pode funcionar como captadora de água em regiões montanhosas tropicais (Stadtmuller 1987; Veneklaas 1990; Veneklaas & Van Ek 1990; Hutley *et al.* 1997; Bruijnzeel 2002). No entanto, pouco se sabe sobre o papel desse evento climático no metabolismo das plantas e no funcionamento de florestas alto-montanas situadas nas cotas mais elevadas das Serras do Mar e Mantiqueira. Estabelecer os mecanismos que determinam os limites altitudinais da distribuição tornam-se relevantes no contexto atual, uma vez que a resposta das plantas ao aquecimento global dependerá dos fatores que as modulam

como o uso direto de água de neblina e consequente recuperação total ou parcial do *status* hídrico de plantas em montanhas tropicais (Still *et al.* 1999; Hughes 2000). A garantia da integridade ecológica desses sistemas biológicos únicos é prioritária para as ações de conservação e pesquisa (Safford 1999). A destruição das formações vegetais de altitude poderia ocorrer em consequência ao aquecimento global, o que poderia ser amenizado com a manutenção de corredores que conectem as vegetações isoladas pela altitude (Safford 1999). Nessa situação, as Serras do Mar e da Mantiqueira ainda proporcionam interconexão de grandes áreas, mas ainda necessita de ações de conservação e pesquisa, especialmente nas formações mais vulneráveis como os campos de altitude (Safford 1999). Nesse contexto, o conhecimento dos fatores que afetam a sobrevivência e o sucesso das populações de espécies arbóreas em diferentes ambientes é fundamental para prever os impactos dos distúrbios por mudanças climáticas ou antropogênicas. Os efeitos da neblina estavam mais focados em árvores adultas (Gu *et al.* 2002; Burgess & Dawson 2004; Min 2005) mas o estabelecimento de plântulas pode ser ainda mais significativo para a compreensão de como as mudanças climáticas podem afetar a regeneração e o recrutamento de espécies de altitude (Sullivan & Pittillo 1988).

Dessa forma, o presente trabalho contribuiu para o conhecimento da capacidade de absorção de água pelas folhas e dos mecanismos envolvidos utilizando métodos quantitativos e qualitativos seguros e complementares, que vem sendo reconhecidos como necessários no contexto atual (*c.f.* Widholzer 2005; Limm *et al.* 2009; Qiu *et al.* 2010). Além disso, colaboramos para reconhecer o papel ecológico da água da neblina para o sucesso de espécies lenhosas, principalmente em estágio de plântula, o que foi recentemente reconhecido como uma lacuna no conhecimento científico (*c.f.* Qiu *et al.* 2010). O estudo de espécies tropicais também possibilitou maior abrangência da discussão sobre o uso de fontes alternativas de água quando depositadas nas superfícies foliares, pois são raras as pesquisas fora de ambientes áridos e temperados (Qiu *et al.* 2010). Reconhecemos o papel da neblina no funcionamento das três espécies estudadas e na sobrevivência de *D. brasiliensis* e *M. umbellata*, apontando que o papel da neblina pode ir além da ecologia funcional das populações, levando-nos a sugerir que desempenhe um papel fundamental na comunidade e na hidrologia desses ecossistemas.

## Referências bibliográficas

- Araújo M.B. & Guisan A. (2006) Five (or so) challenges for species distribution modeling. *Journal of Biogeography* 33, 1677–1688.
- Burgess S.S.O. & Dawson T.E. (2004) The contribution of fog to the water relations of *Sequoia sempervirens* (D. Don): foliar uptake and prevention of dehydration. *Plant Cell and Environment* 27, 1023-1034.
- Bruijnzeel L.A. (2002) Hydrology of tropical montane cloud forests: a reassessment. In: Proceedings of the Second International Colloquium on Hydrology and Water Management of the Humid Tropics (ed. Gladwell J.S.). pp.353–383. UNESCO, Paris and CATHALAC, Panama City – Panama.
- Farquhar G.D., Lloyd J., Taylor J.A., Flanagan L.B., Syvertsen J.P, Hubick K.T., Wong S.C. & Ehleringer J.R. (1993) Vegetation effects on the isotope composition of oxygen in the atmospheric CO<sub>2</sub>. *Nature* 363, 439-443.
- Foster P. (2001) The potential negative impacts of global climate change on tropical montane cloud forests. *Earth-Science Reviews* 55, 73-106.
- Gu L., Baldocchi D.D., Verma S.B., *et al.* (2002) Superiority of diffuse radiation for terrestrial ecosystem productivity. *Journal of Geophysical Research* 107, D6, 4050 (23p.). doi:10.1029/2001JD001242.
- Hamilton L.S., Juvik J.O. & Scatena F.N. (1995) The Puerto Rico tropical cloud forest symposium: introduction and workshop synthesis. In *Tropical montane cloud forests* (eds. Hamilton L.S., Juvik J.O. & Scatena F.N.). Springer Verlag, New York, p. 1-23.
- Hughes L. (2000) Biological consequences of global warming: is the signal already apparent? *Trends in Ecology & Evolution*. 15, 56–61.
- Hutley L.B., Doley D., Yates D.J. & Boosaner A. (1997) Water balance of an Australian subtropical rainforest at altitude: the ecological and physiological significance of intercepted cloud and fog. *Australian Journal of Botany* 45, 311–329.

- Limm E., Simonin K., Bothman A. & Dawson T. (2009) Foliar water uptake: a common water acquisition strategy for plants of the redwood forest. *Oecologia* 161, 449-459.
- Kerstiens G. (1996) Cuticular water permeability and its physiological significance. *Journal of Experimental Botany* 47, 1813-1832.
- Kerstiens G. (2006) Water transport in plant cuticles: an update. *Journal of Experimental Botany* 57, 2493-2499.
- Kozlowski T.T. & Pallardy S.G. (1996) Growth Control in Woody Plants (Physiological Ecology). Academic Press, San Diego/CA – USA.
- Kozlowski T.T. & Pallardy S.G. (2002). Acclimation and adaptive responses of woody plants to environmental stresses. *Botanical Review* 68, 270–334.
- Milly P.C.D., Wetherald R.T., Dunne K.A. & Delworth T.L. (2002) Increasing risk of great floods in a changing climate. *Nature* 415, 514–517.
- Min Q. (2005) Impacts of aerosols and clouds on forest-atmosphere carbon exchange. *Journal of Geophysical Research* 110, D06203 (12p.). doi:10.1029/2004JD004858.
- Oliveira, R.S, Martinelli, L.A., Camargo, P., Lara, L. & Paes, L. (2007) *O papel da neblina como fonte de água nas Florestas Ombrófilas Montanas no Estado de São Paulo*. Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 23 a 28 de Setembro de 2007, Caxambu – MG/Brasil.
- Palmer T.N. & Raianen J. (2002) Quantifying the risk of extreme seasonal precipitation events in a changing climate. *Nature* 415, 512–514.
- Qiu Y., Hong-lang X., Liang-ju Z., Sheng-cun X., Mao-xian Z., Cai-zhi L. & Liang Z. (2010) Research progress on water uptake through foliage. *Acta Ecologica Sinica* 30, 172-177.
- Safford H.D. (1999). Brazilian Páramos I. An introduction to the physical environment and vegetation of the campos de altitude. *Journal of Biogeography* 26, 693–712.

- Schönherr J. (1976a) Water permeability of isolated cuticular membranes: the effect of pH and cations on diffusion, hydrodynamic permeability and size of polar pores. *Planta* 128, 113–126.
- Schönherr J. (1976b) Water permeability of isolated cuticular membranes: the effect of cuticular waxes on diffusion of water. *Planta* 131, 159–164.
- Schönherr J., Fernández V. & Schreiber L. (2005) Rates of cuticular penetration of chelated Fe(III): role of humidity, concentration, adjuvants, temperature and type of chelate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 4484–4492.
- Schönherr J. (2006) Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes. *Journal of Experimental Botany* 57, 2471–2491.
- Schreiber L., Skrabs M., Hartmann K.D., *et al.* (2001) Effect of humidity on cuticular water permeability of isolated cuticular membranes and leaf disks. *Planta* 214, 274–282.
- Simonin K.A., Santiago L.S. & Dawson T.E. (2009) Fog interception by *Sequoia sempervirens* (D. Don) crowns decouples physiology from soil water deficit. *Plant, Cell & Environment* 32, 882–892.
- Stadtmüller T. (1987) *Cloud forests in the humid tropics. A bibliographic review*. United Nations University, Tokyo, and CATIE, Turrialba - Costa Rica.
- Still C.J., Foster N.F. & Schneider S.H. (1999) Simulating the effects of climate change on tropical montane cloud forests. *Nature* 398, 608–610.
- Sullivan J.H. & Pittillo J.D. (1988) Succession of woody plants into a high elevation grassy bald of the Balsam Mountains. *Castanea* 53, 245–251.
- Thomas C.D., Cameron A., Green R.E., Bakkenes M. *et al.* (2004) Extinction risk from climate change. *Nature* 427, 145–148.
- Veneklaas E.J. (1990) Nutrient fluxes in bulk precipitation and throughfall in two montane tropical rain forests, Colombia. *Journal of Ecology* 78, 974–992.

- Veneklaas E.J. & Van Ek R. (1990) Rainfall interception in two tropical montane rain forests, Colombia. *Hydrological Processes* 4, 311-326.
- Williams S.E., Bolitho E.E. & Fox S. (2003) Climate change in Australian tropical rainforests: an impending environmental catastrophe. *Proceedings of the Royal Society B Lond.* 270, 1887–1892. DOI 10.1098/rspb.2003.2464.
- Zimmermann D., Westhoff M., Zimmermann, G. et al. (2007) Foliar water supply of tall trees: evidence for mucilage-facilitated moisture uptake from the atmosphere and the impact on pressure bomb measurements. *Protoplasma* 232, 11-34.