



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

ADGLECIANNE DE SOUSA MELO

**AJUSTES ANATÔMICOS FOLIARES DE *Calotropis procera*  
(Apocynaceae) EM RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO E SALINIDADE**

Recife

2020

ADGLECIANNE DE SOUSA MELO

**AJUSTES ANATÔMICOS FOLIARES DE *Calotropis procera* (Apocynaceae) EM  
RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO E SALINIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

**Área de concentração:** Ecologia e  
Conservação

**Linha de pesquisa:** Ecofisiologia e  
Anatomia

**Orientador:** Prof. Dr. Mauro Guida dos Santos

**Coorientadora:** Dr.<sup>a</sup> Rebeca Rivas Costa de Albuquerque Silva

Recife

2020

Catálogo na fonte:  
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Melo, Adglecianne de Sousa

Ajustes anatômicos foliares de *Calotropis procera* (Apocynaceae) em resposta ao déficit hídrico e salinidade / Adglecianne de Sousa Melo - 2020.

64 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Mauro Guida dos Santos

Coorientadora: Rebeca Rivas Costa de Albuquerque Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal. Recife, 2020.

Inclui referências e anexo.

1. Estresse abiótico 2. Plasticidade anatômica 3. Seca  
I. Santos, Mauro Guida dos (Orientador) II. Silva, Rebeca Rivas Costa de Albuquerque (Coorientadora) III. Título

583.93 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-083

ADGLECIANNE DE SOUSA MELO

**AJUSTES ANATÔMICOS FOLIARES DE *Calotropis procera* (Apocynaceae) EM  
RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO E SALINIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Aprovada em: 17/02/2020

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Mauro Guida dos Santos (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Profa. Dr.<sup>a</sup> Ariadna Valentina de Freitas e Lopes (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Profa. Dr.<sup>a</sup> Cláudia Ulisses de Carvalho Silva (Examinador Externo)

Universidade Federal Rural de Pernambuco

A Deus, porque nos momentos de obscuridades  
e incertezas me enviou clareza para seguir em  
frente (Dedico).

Aos que fazem morada no meu coração  
(ofereço).

## AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio incondicional, principalmente nas minhas escolhas relacionadas aos estudos; pelo incentivo, pelo orgulho que sentem com cada vitória e conquistas minhas, pela compreensão da minha ausência... por suportarem as saudades... por me amarem. Minha gratidão e todo meu amor.

Agradeço as minhas amigas que “*deixei*” na Paraíba, de quem sinto tanta falta, por sempre me incentivarem, acreditarem em meu potencial, celebrarem as minhas conquistas e entenderem a minha ausência... e por estarem sempre comigo mesmo distantes.

Àqueles professores da graduação que me incentivaram a ir adiante. Em especial Udson Santos, porque ele foi um grande motivador durante as etapas de seleção do mestrado.

Ao meu orientador prof. Dr. Mauro Guida dos Santos pela confiança em mim depositada, pelos ensinamentos, paciência, compreensão, e pelas palavras de apoio e reconhecimento. Obrigada também por aceitar confiar em mim por mais 4 anos (Doutorado, aí vou eu).

À minha coorientadora Dr.<sup>a</sup> Rebeca Rivas, que foi um porto seguro para mim nessa jornada. Sua paciência, ensinamentos, conselhos, dicas, lições de vida, palavras de conforto e segurança significaram muito para mim. Ela foi tão presente, mesmo quando estava a km de distância. Sempre pude contar com ela e foi isso que eu fiz. Rebeca fez a diferença para mim nessa caminhada, especialmente porque antes de tudo ela me ofereceu sua amizade e isso tornou todo o restante mais fácil. Sou muito grata por tudo.

A galera do Laboratório de Fisiologia Vegetal (LFV) que me fez sentir-me acolhida e pertencente aquele ambiente a partir do momento que eu pisei no laboratório. Dessa galera então começo agradecendo a Gabriella Frosi, seu rosto era o único conhecido para mim no LFV e em Recife na época, então quando saiu o resultado entrei em contato e ela foi muito atenciosa, simpática e acolhedora. Quando o frio na barriga batia eu pensava: “*pelo menos Frosi vai estar lá e vai me receber bem!*” (E graças a Deus ela não foi a única)

À Maria Reis pelo convívio, carinho e pela ajuda na fase inicial do meu experimento. Aos alunos de Iniciação Científica: Alice, Joana (que foi minha mão direita na etapa de casa de vegetação), Lairton, Luana, Rafaela, Valdézio e Zuleide. Se esqueci de alguém, perdoem-me *please* é que vocês são muuuitos, o que é proporcional a ajuda que me deram! Sem vocês seria impossível dar conta de tanta demanda de coleta de material, medidas anatômicas, etc. A Silvia

Caroline, por ter me ajudado também em coleta. A Laís, por me dar help em dúvidas e curiosidades corriqueiras de laboratório e dicas em estatística.

À Vanessa Barros pela ajuda essencial antes, durante e depois do experimento. Até Bruno (seu marido) ela arrastou em finais de semana para me ajudar (Valeu, Bruno). Quase tudo o que eu sei fazer hoje no que se refere ao trabalho no laboratório eu aprendi com ela. Sou grata também pelos maravilhosos momentos de descontração que ela me proporciona na rotina diária de Lab, em parceria com outras pecinhas especiais: Mariana, Djalma e Nando (Quase um LfVense por adoção, mas na verdade é do Lab Polinizar). Vocês alegram meus dias de trabalho, e fora dele. Grata pelo companheirismo e amizade de vocês. Mariana (Xuuu), não posso deixar de te agradecer também pela ajuda no experimento e por me esclarecer dúvidas quanto a forma de analisar meus dados e tantas outras.

À Tamires Yule, pela ajuda imprescindível na realização da parte essencial deste trabalho: a anatomia, e pelo esclarecimento de dúvidas ao longo dessa etapa. Mas também quero agradecer, sobretudo, pela sua amizade, paciência, carinho, cuidado e incentivo.

Ao Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul do qual por intermédio de Tamires, obtive apoio logístico para processar meu material.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa de mestrado, o que me permitiu sobreviver em Recife por minha conta e risco (e haja conta!).

Aos professores Dr.<sup>a</sup> Letícia C. Benitez e Dr. Hiram M. Falcão pela colaboração na etapa de avaliação da Fundamentação Teórica durante a disciplina de Seminários Integrados I. Muito obrigada pelas contribuições.

Aos meus colegas de turma de mestrado Felicidade, Bella, Lucas, Pâmela e Weverton pela amizade e companheirismo, é sempre mais reconfortante quando vemos que não estamos sozinhos nos perrengues hahahaha. Ao Lucas também agradeço pelo esclarecimento de dúvidas relacionadas à anatomia, que sempre surgiam, e por mediar junto à Professora Emília a utilização do fotomicroscópio do Laveg sempre que precisei.

Há muito o que agradecer, muitos detalhes, nomes e histórias que acabam tendo que ser omitidos porque senão estender-se-ia a muitas laudas esta seção. Mas o meu coração sabe e é grato a todos, citados ou não, que fizeram parte dessa jornada.

A vocês o meu muito obrigada!

*“The steps you take don't need to be big; they just need to take you in the right direction.”<sup>1</sup>*

*– Jemma Simmons, Agents of S.H.I.E.L.D.*

---

<sup>1</sup> *“Os passos que você dá não precisam ser grandes; eles só precisam te levar na direção certa.”*

## RESUMO

Diante de condições desfavoráveis tais como seca e salinidade as plantas podem apresentar estratégias em seus vários níveis de organização a fim de tolerar o estresse. Dentre tais estratégias, características anatômicas foliares se destacam uma vez que o desempenho fisiológico está relacionado com a anatomia da folha, principalmente por ser o órgão diretamente envolvido com a fotossíntese. Sendo também o órgão de maior plasticidade de respostas, ajustes anatômicos podem ser uma importante característica de espécies tolerantes a condições ambientais adversas tal como é *C. procera*. Esta sempre verde se destaca pelo robusto desempenho sob condições de seca e salinidade. Assim, nosso objetivo foi verificar se ajustes anatômicos também poderiam estar envolvidos nessa tolerância. Sob condições experimentais de seca e salinidade em casa de vegetação foram avaliados aspectos fisiológicos como trocas gasosas e conteúdo hídrico relativo foliar, e atributos anatômicos das folhas de *C. procera* ao longo do tempo de estresse imposto. Sob seca e salinidade as plantas apresentaram respostas fisiológicas semelhantes como redução da condutância estomática, alta eficiência no uso da água e manutenção do status hídrico. Quanto as respostas anatômicas, foi observado que as plantas ajustaram sua anatomia frente a condição desfavorável, aumentando a espessura da cutícula, densidade de tricomas e estômatos bem como alterações na espessura do mesofilo ao longo do estresse. Os ajustes nos parâmetros morfofisiológicos relacionados à regulação da transpiração, como cutícula e densidade de tricomas, foram registrados a partir do 9º nas plantas sob déficit hídrico e aos 22 dias sob salinidade mostrando que a espécie prontamente lança mão desses ajustes como uma estratégia para preservar o status hídrico sob condição limitante. A maior densidade estomática observada ao longo do estresse pode ser relacionada com a manutenção da assimilação mesmo sob baixa condutância estomática, pois é sugerido que a maior densidade melhora o controle e a rapidez da abertura dos estômatos, podendo favorecer a captação de CO<sub>2</sub> mesmo sob forte controle da transpiração. Além disso, as plantas também modificaram espessura do parênquima paliádico e lacunoso o que pode ser estratégia para melhorar a distribuição da luz e difusão do CO<sub>2</sub> na folha favorecendo a fotossíntese. Portanto, os dados evidenciam uma plasticidade anatômica da espécie ajustando atributos que conferem maior tolerância e conseqüentemente a sobrevivência sob condições de seca e salinidade.

Palavras – chaves: Estresse abiótico. Plasticidade anatômica. Seca. Sal.

## ABSTRACT

Faced with unfavorable conditions such as drought and salinity, plants can present strategies at their various levels of the organization to tolerate stress. Among such strategies, leaf anatomical characteristics stand out since the physiological performance is related to the anatomy of the leaf, mainly because it is the organ directly involved with photosynthesis. Also being the organ with the greatest plasticity of responses, anatomical adjustments can be an important characteristic of species tolerant to adverse environmental conditions such as *C. procera*. This evergreen stands out for its robust performance under drought and salinity conditions. Thus, our objective was to verify whether anatomical adjustments could also be involved in this tolerance. Under experimental conditions of drought and salinity in a greenhouse, physiological aspects were evaluated, such as gas exchange and leaf relative water content, and anatomical attributes of the leaves of *C. procera* during the time of stress imposed. Under drought and salinity, plants showed similar physiological responses such as reduced stomatal conductance, high efficiency in water use and maintenance of water status. As for the anatomical responses, it was observed that the plants adjusted their anatomy in the face of unfavorable conditions, increasing the thickness of the cuticle, density of trichomes and stomata as well as changes in the thickness of the mesophyll during stress. The adjustments in the morphophysiological parameters related to the regulation of transpiration, such as cuticle and trichome density, were recorded from the 9th on plants under water deficit and at 22 days under salinity showing that the species promptly make use of these adjustments as a strategy to preserve the water status under limiting condition. The higher stomatal density observed during stress can be related to the maintenance of assimilation even under low stomatal conductance, as it is suggested that the higher density improves the control and the speed of stoma opening, which may favor CO<sub>2</sub> uptake even under strong sweating control. Besides, the plants also modified the thickness of the palisade and lacunous parenchyma, which may be a strategy to improve light distribution and CO<sub>2</sub> diffusion in the leaf, favoring photosynthesis. Therefore, the data show anatomical plasticity of the species by adjusting attributes that confer greater tolerance and consequently survival under drought and salinity conditions.

**Keywords:** Abiotic stress. Anatomical plasticity. Drought. Salt.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>13</b>
2.1	ESTRESSE ABIÓTICO .....	13
2.1.1	Déficit hídrico .....	14
2.1.2	Estresse salino .....	16
2.1.3	Respostas anatômicas foliares de plantas sob estresse.....	18
2.2.	<i>CALOTROPIS PROCERA</i> .....	19
2.2.1	Características da espécie .....	19
2.2.2	Respostas de <i>Calotropis procera</i> ao déficit hídrico e à salinidade.....	20
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>24</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>26</b>
4.1	ARTIGO – <i>CALOTROPIS PROCERA</i> (APOCYNACEAE) INCREASING DENSITY AND DECREASING STOMATAL PORE SIZE DURING STRESS CONDITIONS SUPPORTING THE TOLERANCE OF THIS C <sub>3</sub> SPECIES UNDER DROUGHT AND SALINITY.....	26
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>57</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>58</b>
	<b>ANEXO A – NORMAS PARA SUBMISSÃO NO PERIÓDICO ANNALS OF BOTANY.....</b>	<b>64</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A seca e a salinidade são os dois principais fatores abióticos que mais limitam o desenvolvimento e produtividade vegetal ao redor do mundo. Tais fatores afetam vários aspectos da vida das plantas limitando fotossíntese, reduzindo crescimento e determinando o estabelecimento e distribuição das espécies nos ecossistemas (Liu *et al.*, 2019). Tais condições são desfavoráveis a muitas espécies, enquanto outras conseguem tolerar e inclusive apresentar alta robustez nesses ambientes. Este é o caso de *Calotropis procera*, espécie sempre verde de metabolismo C<sub>3</sub> (Tezara *et al.*, 2011) nativa de zonas áridas (Mutwakil *et al.*, 2017), fato este que chama muita atenção uma vez que nesses ambientes de elevada luminosidade, temperatura e déficit de pressão de vapor, a maioria das espécies C<sub>3</sub> seria incapaz de sobreviver (Lawson *et al.*, 2014).

*C. procera* apresenta tolerância diferenciada sob condições de seca e salinidade, mantendo folhas fotossinteticamente ativas durante todo o ano. Além disso, sua reprodução é contínua, com picos surpreendentes de floração nos períodos de seca (Frosi *et al.*, 2012). Estudos ecofisiológicos têm demonstrado o conjunto de respostas moleculares, bioquímicas e fisiológicas (Frosi *et al.*, 2012; Tezara *et al.*, 2011; Rivas *et al.*, 2017; Coêlho *et al.*, 2019) que essa espécie apresenta para lidar com o estresse. Dentre essas respostas estão o forte controle estomático que auxilia no controle da perda de água por transpiração, promovendo também maior eficiência no uso da água. Alta condutância mesofílica também foi registrada sob condições de seca (Rivas *et al.*, 2017; Frosi *et al.*, 2012) o que está relacionado com melhoria na difusão do CO<sub>2</sub> podendo favorecer a manutenção da fotossíntese sob estresse osmótico em consequência da seca ou salinidade.

Além disso a espécie apresenta um eficiente sistema antioxidante e acúmulo de pigmentos que auxiliam na dissipação do excesso de energia, além do acúmulo de solutos orgânicos que atuam como moléculas sinalizadoras do estresse e no combate de espécies reativas de oxigênio que tendem a se acumular sob situações estressantes (Rivas *et al.*, 2017; Barros *et al.*, 2018; Coêlho *et al.*, 2019).

As respostas das plantas ao estresse podem acontecer nos seus vários níveis de organização, desde o molecular ao morfológico e anatômico (Barros *et al.*, 2019). Muitas características anatômicas inclusive são classificadas como típicas de espécies tolerantes à determinados ambientes com condições estressantes (Simione *et al.*, 2017). A presença de uma

cutícula espessa e de tricomas nas folhas são atributos de tolerância nas plantas que vivem em ambientes com limitação hídrica.

A folha é o órgão de maior plasticidade de repostas ao ambiente circundante, além de ser diretamente relacionada com processos fisiológicos essenciais a vida das plantas tal como a fotossíntese (Tholen et al., 2012; Tomás et al., 2013). Nesse contexto, por trás dessa tolerância de *C. procera* estariam também envolvidos ajustes anatômicos nos atributos foliares? O objetivo principal deste trabalho foi verificar ajustes anatômicos nas folhas de *C. procera* em resposta as condições de deficiência hídrica e salinidade.

A tolerância de *C. procera* sob condições estressantes faz dessa espécie um excelente modelo para estudos ecofisiológicos, bem como fonte para identificação de genes com foco no melhoramento genético. O presente estudo contribui com dados acerca das respostas morfofisiológicas dessa espécie diante de condições de déficit hídrico e salinidade colaborando com a visualização de um perfil anatômico foliar mais completo que permite esta espécie prosperar em ambientes tão limitantes e diversificados.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

As condições ambientais podem impor pressão na sobrevivência das plantas, determinando assim seu estabelecimento e distribuição nos habitats. Na natureza, muitos fatores podem afetar o desenvolvimento vegetal, sejam estes de origem biótica ou abiótica (ABDELRAHEEM et al., 2019). As variáveis ambientais podem se constituir como fatores de estresse às plantas quando alteram o funcionamento normal do sistema (SHAO et al., 2008). Entre os fatores mais limitantes do crescimento e desenvolvimento vegetal estão os estresses abióticos provocados pelo déficit hídrico e pela salinidade dos solos (BARROS et al., 2018; BENITEZ et al., 2011).

Condições de déficit hídrico e salinidade são encontradas em muitas regiões do globo terrestre como, por exemplo, o nordeste do Brasil. Cerca de 60% desta região é caracterizada por um clima semiárido (RAMALHO, 2013), sendo suscetível a longos períodos de seca, além de estar cada vez mais vulnerável à salinização dos solos (DA SILVA et al., 2008; FROSI et al., 2018). Entretanto, mesmo em ambiente com condições limitantes, algumas espécies vegetais podem sobreviver e se estabelecer nestes locais adversos apresentando, para tanto, mecanismos e estratégias de tolerância (BARTELS; SUNKAR, 2005), inclusive se destacando em seu desempenho mediante os estresses tornando-se importantes modelos para estudos em Ecofisiologia Vegetal.

A compreensão acerca da tolerância das espécies frente aos estresses abióticos fornece bases importantes de conhecimento, fundamentais para aplicação em diversas outras áreas, considerando que tal entendimento é necessário por exemplo, na seleção de espécies e genótipos tolerantes para uso na recuperação de ambientes degradados e/ou regeneração de florestas. Além de ser valioso para o avanço da biotecnologia aplicada ao melhoramento de espécies cultivadas, com o intuito de promover culturas tolerantes ao cenário previsto de mudanças climáticas globais, visando a garantia da segurança alimentar.

### 2.1 ESTRESSE ABIÓTICO

Em termos biológicos, o estresse é uma alteração na condição fisiológica causada por um fator externo. Esse fator externo, que pode ser chamado de fator de estresse, provoca uma tensão no funcionamento normal do organismo induzindo à resposta (JALEEL et al., 2009). As plantas constantemente estão sujeitas à vários desses fatores na natureza, que, em suma, são

condições externas adversas que podem interferir no crescimento, desenvolvimento e produtividade.

O estresse abiótico pode ser originado por fatores ambientais, tais como alta ou baixa temperatura, excesso ou falta de água, radiação luminosa intensa, deficiência ou toxicidade de nutrientes, disponibilidade de oxigênio, salinidade da água ou dos solos, poluição, entre outros (HAKIM et al., 2018). Em condições naturais, é difícil a ocorrência de tais fatores de maneira isolada, estando a maioria deles interligados e ocorrendo de forma conjunta, desencadeando respostas combinadas para tolerar a condição estressante (MAHAJAN; TUTEJA, 2005).

A exemplo de condições onde podem ocorrer essa ação combinada dos fatores de estresse pode-se citar as regiões áridas e semiáridas. As plantas nesses locais estão expostas à altas temperaturas e à baixa precipitação pluviométrica características de tais climas, tendo que lidar não só com o problema da limitação hídrica no solo, mas também com a elevada temperatura (SANTOS et al., 2014). Estes fatores de estresse podem ainda estar associados à uma condição de salinidade, pois essas regiões estão também suscetíveis à salinização devido, principalmente, ao manejo incorreto do solo (BARTELS; SUNKAR, 2005). A salinidade além de condicionar as plantas à uma condição de seca fisiológica causada pelo efeito osmótico dos sais, afeta ainda o componente iônico das plantas devido ao excesso e ao acúmulo dos íons presentes na solução do solo (NOWICKA et al., 2018).

### **2.1.1 Déficit hídrico**

Dois tipos de estresse estão relacionados com à disponibilidade de água: o estresse pela falta ou pelo excesso dela (MAHAJAN; TUTEJA, 2005). Todavia, como o estresse por déficit hídrico é mais recorrente na natureza, o termo estresse hídrico é frequentemente utilizado com essa denotação (SHAO et al., 2008). Entretanto, na literatura mundial sobre estresses abióticos o termo mais utilizado fazendo referência ao estresse por limitação hídrica é o termo “seca” (DISSANAYAKE et al., 2018). Embora seja um termo com denotação de uma condição meteorológica caracterizada por um período sem precipitação, combinada com condições de alta temperatura e alta radiação solar (MUNNÉ-BOSCH; ALEGRE, 2004), na natureza essa é a principal condição geradora de déficit hídrico para as plantas.

O fenômeno de seca é comum em muitos ambientes ao redor do mundo e o cenário de mudanças climáticas há muito antecipa que essa condição tende a se estender e agravar-se em muitas regiões, afetando a diversidade biológica e gerando impactos em setores produtivos, tal como a agropecuária (ARNDT et al., 2001; BENKO-ISEPPON et al., 2011). Por ser o principal

estresse limitador do desenvolvimento e acúmulo de biomassa nas plantas – seu impacto na produtividade vegetal pode ser maior do que mesmo a combinação dos demais estresses bióticos e abióticos – se configura como a maior ameaça para o futuro da segurança alimentar (WALTER et al., 2011).

Vários aspectos da vida das plantas são afetados pelo déficit hídrico. Processos fisiológicos e bioquímicos como a fotossíntese, respiração, translocação de substâncias, absorção de íons, metabolismo de nutrientes, expansão e alongamento celular são prejudicados (JALEEL et al., 2009). Essas disfunções resultam primariamente da redução do status hídrico, o qual leva à perda de turgescência celular e o fechamento estomático, o qual por sua vez afeta as trocas gasosas diminuindo a fotossíntese. Essa limitação estomática se dá também por regulação via Ácido Abscísico (ABA) que sob condições de déficit hídrico induz ao fechamento dos estômatos como uma primeira linha de defesa das plantas ao estresse (SREENIVASULU et al., 2012).

As trocas gasosas são reduzidas sob condições de déficit hídrico, no entanto a energia luminosa continua sendo absorvida pelos cloroplastos gerando fluxo contínuo de elétrons nos fotossistemas. Ainda, a fixação do carbono no ciclo de Calvin-Benson é limitada, devido à baixa disponibilidade de CO<sub>2</sub>, e a dinâmica das reações de oxirredução são afetadas ocasionando a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) desencadeando, assim, o estresse oxidativo (BARBOSA et al., 2014; UZILDAY et al., 2014). Todos esses transtornos funcionais reduzem o crescimento e o desenvolvimento, podendo resultar na morte das plantas (CANO; LÓPEZ; WARREN, 2014).

Embora seja uma condição muito desfavorável para a sobrevivência das plantas, a depender principalmente da intensidade e duração (AULER et al., 2017; RIVAS; OLIVEIRA; SANTOS, 2013), existem espécies que resistem a seca conseguindo se estabelecer e crescer em ambientes com limitação hídrica por apresentar estratégias e mecanismos adaptativos em resposta a condição limitante. Essas estratégias podem ser classificadas em três categorias: “escape”, “evitamento” e “tolerância” (ENNAJEH et al., 2010; NABI et al., 2019).

O mecanismo de escape ou fuga da seca está mais relacionado com estratégias adaptativas da história de vida da espécie. É, principalmente, característica de plantas com rápido crescimento e desenvolvimento, o que as possibilitam reproduzir-se antes que o evento de seca inicie ou atinja um ponto crítico. Tal estratégia é frequentemente associada a plantas com ciclo de vida anual, de hábito decíduo e que conseguem manter as funções fisiológicas reduzidas durante os períodos de déficit hídrico severo (KOOYERS, 2015; YILDIRIM; KAYA, 2017).

Com relação as estratégias de evitamento da seca, estas consistem em mecanismos para evitar a desidratação dos tecidos vegetais, ou seja, manter o status hídrico da planta apesar da drástica redução da umidade do solo. Nisso estão envolvidas várias características aclimatativas que visam, por exemplo, a otimização da absorção de água (investimento no crescimento de raízes) e minimização das perdas por meio de reduções nas taxas de transpiração através de ajustamento da área foliar e controle estomático (YILDIRIM; KAYA, 2017).

Quanto à tolerância, é a estratégia caracterizada pela habilidade das plantas em manter a pressão de turgescência nos tecidos e assim conservar relativamente o funcionamento do sistema, mantendo a homeostase, mesmo sob baixo potencial hídrico. Para tanto estão envolvidos processos como o ajustamento osmótico, resistência do protoplasma e elasticidade celular, além da atuação do sistema antioxidante (BASU et al., 2016; ENNAJEH et al., 2010; ZHENG et al., 2017).

Todos os mecanismos envolvidos na capacidade de sobreviver e tolerar o déficit hídrico incluem respostas em uma variedade de atributos que abrangem todos os níveis funcionais das plantas envolvendo processos moleculares, bioquímicos, fisiológicos, morfológicos e anatômicos (BENKO-ISEPPON et al., 2011), muitas dessas respostas acontecendo principalmente em nível foliar (FALCÃO et al. 2017).

### **2.1.2 Estresse salino**

Solos com altas concentrações de sais são comuns em várias regiões do mundo, principalmente em ambientes áridos e semiáridos (MUNNS; TESTER, 2008). As condições salinas afetam o crescimento e o desenvolvimento das plantas (PORCEL; AROCA; RUIZ-LOZANO, 2012), submetendo-as a dois estresses simultâneos: osmótico e iônico (VIGHI et al., 2017). Em virtude disso, alguns aspectos das respostas das plantas ao estresse salino se sobrepõem àqueles observados para o déficit hídrico, pois nas duas condições as plantas têm de lidar com a redução da disponibilidade hídrica causada pela redução do potencial osmótico do solo, que no caso da salinidade é provocada pelo excesso de íons (BENITEZ et al., 2016; FROSI et al., 2018). Entretanto, o estresse iônico provocado pela absorção de íons como  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  em excesso no solo, desencadeia respostas específicas (BELKHEIRI; MULAS, 2013).

O efeito iônico afeta a sobrevivência das plantas por ocasionar prejuízo em inúmeros processos. Os íons absorvidos da solução do solo tendem a se acumular nas folhas, inicialmente nas mais velhas e em seguida nas folhas jovens, e ao atingir altas concentrações levam a sua senescência. Com o passar do tempo de exposição à condição salina essa taxa de morte foliar

se torna mais rápida do que a taxa de expansão, dada a limitação de carboidratos provocada pelo estresse, assim há uma redução da área foliar que reduz ainda mais a produção de fotoassimilados afetando não só o crescimento das plantas, mas podendo também levá-las à morte (LÄUCHLI; GRATTAN, 2014).

Além disso, o  $\text{Na}^+$  e o  $\text{Cl}^-$  em excesso exercem efeitos tóxicos no metabolismo celular podendo inibir a síntese de proteínas, causar danos às organelas celulares e romper a estrutura de enzimas, além de interferir na absorção e transporte dos nutrientes, afetando o balanço nutricional das plantas e, conseqüentemente, demais processos metabólicos co-dependentes dos minerais (LUSTOSA et al., 2017; PORCEL; AROCA; RUIZ-LOZANO, 2012). O excesso de sódio, por exemplo, pode causar deficiência em elementos como potássio e cálcio devido à competição pelos mesmos canais iônicos (LÄUCHLI; GRATTAN, 2014).

Para tolerar o estresse salino, as plantas devem apresentar respostas intrínsecas que ajudem a minimizar os efeitos negativos do sal (FROSI et al., 2018). Mecanismos associados à tolerância de muitas plantas envolvem a capacidade de exclusão do sal pelas folhas e retenção de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  na raiz para evitar concentrações desses íons em níveis tóxicos na parte aérea (ROSSI et al., 2015). De acordo com a capacidade de tolerância ao sal, as plantas podem ser classificadas em glicófitas ou halófitas. As últimas são as mais tolerantes conseguindo suportar concentrações salinas elevadas, em torno de 200mM de NaCl, já as glicófitas são plantas sensíveis à altas concentrações (POLLE; CHEN, 2015).

O mecanismo fisiológico que diferencia esses dois grupos é principalmente a capacidade de compartimentalização dos íons no vacúolo, impedindo o acúmulo destes no citosol em níveis tóxicos, que de forma paralela pode desempenhar função osmorregulatória com um menor custo energético para as plantas (ROY; NEGRÃO; TESTER, 2014; SCHMÖCKEL; JARVIS, 2017). As glicófitas não apresentam essa habilidade, assim quando expostas à concentrações moderadas o mecanismo principal é a exclusão desses íons através da superfície foliar (LÄUCHLI; GRATTAN, 2014).

O desenvolvimento de suculência é considerado uma característica típica de plantas halófitas. Caracterizada pela presença de um tecido parenquimático de armazenamento de água com células grandes e paredes finas, a suculência desempenha importante papel na tolerância ao estresse salino por promover a diluição dos sais reduzindo sua concentração no interior das células. Além de auxiliar no gerenciamento do efeito tóxico dos íons nas células, exerce função importante na manutenção da turgescência tecidual (ABD ELHALIM et al., 2016).

### 2.1.3 Respostas anatômicas foliares de plantas sob estresse

As folhas são o órgão que mais rapidamente respondem as condições do ambiente. As plantas podem moldar o desenvolvimento de folhas jovens a partir de sinais percebidos pelas folhas maduras (THOLEN et al., 2012), como por exemplo a partir da quantidade de assimilados acumulados ou com base na intensidade de luz e disponibilidade de CO<sub>2</sub>, que irá refletir em características como a densidade estomática, alteração do parênquima paliçádico e área foliar específica. Nesse contexto, as plantas podem ajustar sua anatomia em resposta a condições estressantes.

A anatomia foliar está fortemente conectada às propriedades fotossintéticas, sua arquitetura influencia na distribuição da luz no mesofilo, tendo papel determinante na quantidade de luz disponível para a fotossíntese em diferentes locais da folha, bem como nos processos de difusão e de controle da temperatura foliar (THOLEN; BOOM; ZHU, 2012). O aumento na deposição de cutícula, por exemplo, bem como a presença de tricomas nas folhas são citados e associados com a função de auxiliar na refletância da luz incidente ajudando a minimizar a transpiração e proporcionando um microclima favorável sob condições de seca (BOSABALIDIS; KOFIDIS, 2002; TEZARA et al., 2011).

Em plantas que crescem sob condições xéricas, o desenvolvimento dos estômatos pode se dar em criptas na epiderme da folha ou ainda apresentar distribuição diferente nas duas faces foliares como observado em *Olea europaea* L. cultivada sob déficit hídrico. Um aumento na densidade dos estômatos também foi observado nessa espécie em resposta ao estresse, ajuste que pode promover um maior controle da perda de água e a manutenção das trocas gasosas (BOSABALIDIS; KOFIDIS, 2002). De acordo com Tholen et al. (2012), a distribuição dos estômatos exerce forte influência no componente de difusão do CO<sub>2</sub>, onde folhas anfiestomáticas tendem a ter uma menor resistência mesofílica, ou seja, uma maior condutância de CO<sub>2</sub>.

Ennajeh et al. (2010) observaram que sob déficit hídrico houve aumento na espessura dos parênquimas paliçádico e lacunoso nas folhas de *Olea europea*, o que pode dar suporte à manutenção das taxas fotossintéticas provavelmente por aumentar os locais de assimilação de CO<sub>2</sub> e melhorar a difusão deste no espaço intercelular. Além disso, a disposição do parênquima paliçádico em ambas as faces das folhas é relatada como uma característica comum em plantas adaptadas a ambientes secos (CHARTZOULAKIS et al., 2002). A característica de maior espessura foliar pode ser vantajosa pois este arranjo aumentaria a quantidade da enzima Rubisco por unidade de área foliar sem esgotamento da concentração de CO<sub>2</sub>, uma vez que suas

concentrações continuariam idealmente baixas por unidade de estroma o que promoveria às plantas uma alta eficiência fotossintética em ambientes com alta luminosidade (THOLEN; BOOM; ZHU, 2012).

Em algumas halófitas, tais como as espécies do gênero *Atriplex* a tolerância à salinidade é atribuída à presença de tricomas vesiculares na superfície da folha os quais retêm uma grande quantidade de sal, que pode atuar prevenindo o acúmulo tóxico dos íons nos tecidos foliares (BELKHEIRI; MULAS, 2013). Modificações nas paredes das células endodérmicas da raiz como a deposição de suberina, que em combinação com estrias de Caspary formam barreiras apoplásticas, podendo dificultar a entrada e translocação de  $\text{Na}^+$  para as partes aéreas (ROSSI et al., 2015).

A salinidade também pode provocar alterações na estrutura do mesofilo, como verificado em *Solanum pennelli*, induzindo o aumento das células do parênquima esponjoso devido ao aumento do vacúolo, estratégia que provavelmente contribui para maior capacidade de acúmulo dos íons tóxicos no interior desta organela, contribuindo para à tolerância à condição salina. (ALBALADEJO et al., 2017). Outra importante característica anatômica encontrada em muitas espécies tolerantes ao sal é a succulência das folhas, promovida pela presença de um parênquima de armazenamento, que está associada a maior capacidade de diluição dos íons tóxicos reduzindo, assim, suas concentrações (ABD ELHALIM et al., 2016).

## 2.2 CALOTROPIS PROCERA

### 2.2.1 Características da espécie

*Calotropis procera* (Aiton) W.T. Aiton é uma planta arbustiva perene, nativa da África e Ásia pertencente à família Apocynaceae. Sua distribuição, atualmente, vai além de sua área de ocorrência natural, sendo encontrada em várias regiões do mundo, principalmente em zonas áridas e semiáridas (HASSAN et al., 2015; MUTWAKIL et al., 2017). No Brasil, é amplamente encontrada na região Nordeste onde foi introduzida por volta de 1900 como uma espécie ornamental, depois tornou-se invasora se espalhando por vários estados do nordeste e de outras regiões do país (SOBRINHO et al., 2013).

Muitos nomes populares são utilizados para *C. procera*, dentre eles estão “algodão-de-seda”, “algodão-de-praia”, “algodão brabo” e “leiteira”, provavelmente atribuídos devido à plumagem branca de fios de seda que envolvem as sementes, o que é um tipo de adaptação à dispersão anemocórica (LEAL et al., 2013), e também pela grande quantidade de látex que a

planta produz (RANGEL; NASCIMENTO, 2011), característica típica da família Apocynaceae (SENNBLAD; BREMER, 2002).

*Calotropis procera* tem floração e frutificação contínua, as flores são hermafroditas, melitófilas e sem sistema de polinização especializado (SOBRINHO et al., 2013); os frutos são do tipo folículo e produzem um grande número de sementes que são adaptadas à dispersão pelo vento, possuindo para tanto alas e plumagem; apresenta uma alta taxa de germinação e rápido estabelecimento, inclusive em solos pobres (OLIVEIRA et al., 2009).

Tais características mencionadas, de maneira conjunta, atribuem à espécie uma alta capacidade de invasão nos ecossistemas, principalmente em áreas de Caatinga e Restinga onde as condições ambientais não atuam como barreira ao seu estabelecimento uma vez que a espécie é originária de regiões desérticas tolerando seca, salinidade, alta temperatura, solos arenosos e pobres em nutrientes (LEAL et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2009; TEZARA et al., 2011).

Apesar de ser uma exótica invasora, *C. procera* já está bastante presente nas paisagens do nordeste brasileiro. A sua alta capacidade de tolerar um amplo espectro de condições edafoclimáticas, mantendo ótimo desempenho sob condições estressantes, faz com que ela produza fitomassa durante todo o ano, tornando-se uma fonte alternativa de importância para fins de uso como forragem animal durante os períodos de seca no semiárido (FROSI et al., 2012)

As propriedades medicinais, fitoquímicas e farmacológicas dos compostos de *C. procera*, bem como sua atividade biológica, são bastante pesquisadas e a maioria dos trabalhos acerca dessa espécie são com essa abordagem (AWAAD et al., 2018; CHUNDATTU; AGRAWAL; GANESH, 2016; GULZAR; SIDDIQUI, 2017; SHARMA et al., 2019; SILVA et al., 2010; SRIVASTAVA; CHAUHAN; SHARMA, 2012). Entretanto, o seu notável desempenho sob condições ambientais extremas tem atraído o foco de pesquisas na área de ecofisiologia, as quais buscam compreender as bases da sua tolerância e desta forma avançar no conhecimento das repostas das plantas aos estresses abióticos.

### **2.2.2 Respostas de *Calotropis procera* ao déficit hídrico e à salinidade**

As respostas de *C. procera* à salinidade e ao déficit hídrico envolvem tanto estratégias de evitamento quanto de tolerância. *C. procera* apresenta um extenso sistema de raízes que possibilita a exploração de água em solos profundos (TEZARA et al., 2011). Sob déficit hídrico e salinidade foi observado que *C. procera* responde aumentando a relação raiz/parte aérea e reduzindo a área foliar por meio da senescência e posterior abscisão das folhas (IBRAHIM,

2013). Esses são os mecanismos que aprimoram a aquisição de água e minimizam a sua perda em virtude da redução da área de transpiração em ambientes estressantes (TRAVLOS; CHACHALIS, 2008).

Condições experimentais de déficit hídrico realizadas por Frosi et al. (2012) demonstraram que *C. procera* mantém alta a taxa fotossintética ao longo do dia apesar da redução da condutância estomática e transpiração, indicando uma alta eficiência no uso de água pela planta. Esses autores também verificaram alterações no metabolismo foliar, como, por exemplo, aumento de pigmentos de clorofila *a* e carotenoides bem como acúmulo de aminoácidos livres e redução na síntese de proteínas totais sob estresse, sugerindo ajuste e resistência da maquinaria metabólica.

Esse estudo de Frosi et al. (2012) que foi realizado em condições de campo, destacou que a redução da condutância estomática durante os períodos de seca reflete pouco na taxa de assimilação desta espécie, ou seja, as plantas mantêm uma alta taxa fotossintética apesar da drástica redução da disponibilidade hídrica no ambiente semiárido. Para a maioria das plantas de metabolismo  $C_3$  isto poderia ser letal (RIVAS et al., 2017). Essa característica de desempenho de *C. procera* ajuda a explicar o fato das plantas permanecerem verdes durante todo o ano inclusive florescendo e frutificando de maneira proeminente na estação seca no semiárido nordestino.

Corroborando com estas observações supracitadas, alguns autores demonstraram que em *C. procera* o aumento da limitação bioquímica em detrimento da limitação estomática nas taxas fotossintéticas conforme o estresse progride, não acontece. Isto fica evidenciado nos parâmetros observados da taxa máxima de carboxilação da Rubisco ( $V_{c,max}$ ) e na taxa fotossintética máxima ( $A_{max}$ ) que permanecem inalterados em plantas sob déficit hídrico quando comparadas ao controle. Desta maneira, uma vez diminuída a limitação estomática, possibilita o aumento da disponibilidade de  $CO_2$  nas células e a planta consegue se recuperar rapidamente após superada a condição hídrica limitante, esse comportamento foi verificado em *C. procera* a após reidratação.

Nesse contexto, a capacidade de sobrevivência de *C. procera* à condições extremas de seca pode ser atribuída, principalmente, a rapidez de resposta no metabolismo da espécie frente as mudanças na disponibilidade hídrica (RAMADAN et al., 2014). Também foi observado em *C. procera* um aumento significativo no conteúdo de aminoácidos e de lipídios de membranas fotossintéticas, bem como a diminuição de solutos como sacarose, rafinose e maltitol, moléculas que são relacionadas a osmoproteção, indicando que as plantas responderam

rapidamente à condição de disponibilidade hídrica identificando a situação como um alívio ao estresse (RAMADAN et al., 2014).

Respostas similares foram observadas no metabolismo primário de *C. procera*, tais como o aumento do conteúdo de prolina e açúcares solúveis nas folhas das plantas estressadas (RIVAS et al., 2017; FROSI et al., 2012). Esses são metabólitos primários que, além de exercer função antioxidante prevenindo eventuais danos por acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), são reconhecidos por atuarem como moléculas osmorregulatórias. Além disso, podem desempenhar papel sinalizador de genes responsivos ao estresse oxidativo, como por exemplo genes que codificam a enzima Superóxido Desmutase (SOD) do sistema antioxidante enzimático (MUTWAKIL et al., 2017).

Além disso, *C. procera* apresenta medidas fotoprotetoras significativas em condições de déficit hídrico, aumentando a dissipação não fotoquímica de energia (NPQ) sob estresse, bem como também as taxas de fotorrespiração e respiração diária. Tais processos atuam como principais vias receptoras para os produtos finais da cadeia de transporte de elétrons e de dissipação de energia sob estresse, prevenindo assim o excesso dessa energia e consequentes danos deletérios aos fotossistemas (RIVAS et al., 2017). Em conformidade com essas observações, Tezara et al. (2011) destacaram a resistência da atividade do fotossistema evidenciada pela ausência de fotoinibição em plantas de *C. procera* durante a estação seca em estudo realizado em uma ecorregião semidesértica da Venezuela.

As estratégias de *C. procera* frente ao estresse salino, por sua vez, são menos conhecidas, sendo escassos os estudos que abordam as respostas específicas por trás da tolerância à salinidade. Os estudos publicados abordam principalmente as respostas em nível molecular, como as respostas em nível de transcriptoma e metaboloma tanto sob déficit hídrico quanto salinidade, onde verificaram que as plantas regulam a expressão de genes ao longo do período de estresse imposto, sendo imediatamente responsivas ao estresse salino, onde nas primeiras horas já é observado expressão gênica diferencial, registrando uma regulação positiva em genes relacionados ao xiloglucano, o qual tem envolvimento no afrouxamento das paredes celulares – as quais sob estresse osmótico podem se tornar enrijecidas devido ao acúmulo de EROS. Também foi registrada expressão de genes que envolvem a peroxidase, molécula que participa da regulação das membranas das células guardas, atuando, portanto, no controle da abertura estomática. Além disso o acúmulo de mioinositol, uma molécula muito importante nas vias de sinalização sob estresse salino, foi verificado tanto pela análise do metaboloma como dos transcritos que registraram a regulação de genes relacionados tanto à síntese quanto a degradação desse composto (MUTWAKIL et al., 2017).

Com relação as respostas do metabolismo primário, este se comporta de maneira semelhante entre o estresse salino e déficit hídrico, como evidenciado no aumento do conteúdo de aminoácidos livres, tais como prolina, ácido glutâmico e alanina. Estas moléculas são solutos compatíveis que podem atuar no ajustamento osmótico em condições de estresse (IBRAHIM, 2013). Em plantas de *C. procera* sob déficit hídrico, observou-se uma redução no conteúdo de clorofilas também sob estresse salino (RIVAS et al., 2017).

Outra estratégia observada em *C. procera* é a abscisão de folhas em resposta ao estresse tanto salino quanto por déficit hídrico. A eliminação de folhas menos eficientes do ponto de vista fotossintético contribui para a redução da área de transpiração total sem grandes perdas de rendimento para a planta. Além disso, em plantas estressadas por sal o acúmulo de íons em concentrações tóxicas pode acelerar a senescência foliar levando a posterior abscisão da folha. Também foi observado um aumento de íons  $K^+$  e  $Na^+$  nas plantas sob salinidade, o que se relaciona com o aumento da pressão osmótica foliar, contribuindo com o ajustamento osmótico e manutenção da turgescência e, por conseguinte, homeostase das atividades metabólicas durante o estresse (IBRAHIM, 2013).

Todas essas estratégias de respostas de *C. procera* promovem a sua tolerância e, portanto, sua sobrevivência em ambientes estressantes. No entanto, é provável que ajustes em nível anatômico também contribuam para essa tolerância diferenciada, em especial ajustes nos atributos foliares uma vez que a folha está diretamente relacionada à fotossíntese e é o órgão de maior plasticidade de resposta frente às condições ambientais diversificadas (BACELAR et al., 2004). A alta pubescência nas folhas de *C. procera* deve contribuir com a proteção do aparato fotossintético, por ajudar a dissipar uma grande parte da radiação que chega a superfície foliar evitando assim danos crônicos, além de ajudar no controle da transpiração (TEZARA et al., 2011).

Modificações nos atributos anatômicos foliares de *C. procera* foram observadas por Silva (2016) em populações da espécie presentes no semiárido e litoral durante a estação seca, as quais apresentaram respostas diferentes. O entendimento dessas respostas anatômicas, entretanto, ainda não está esclarecido e essa é uma abordagem que pode ajudar a identificar se a plasticidade anatômica foliar é mais um dentre os mecanismos de tolerância apresentados por *C. procera* responsável pela sua sobrevivência e estabelecimento em ambientes secos e salinos.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Para o presente trabalho serão realizados dois experimentos: salinidade e déficit hídrico. A obtenção das plantas jovens de *Calotropis procera* (Aiton) W.T. Aiton (Apocynaceae) seguirá os métodos de Rivas et al.(2017). No experimento de salinidade, as sementes serão obtidas a partir de uma população localizada na praia de Maria Farinha – Paulista, Pernambuco (7°57'8.37"S, 38°17'54.07"O). As plantas serão divididas em dois tratamentos: controle (irrigação com 100% da capacidade do pote, 400mL) e salino (irrigação com 100 mM de solução de NaCl). Para o experimento de déficit hídrico, as sementes serão provenientes de uma população localizada no semiárido – Serra Talhada, Pernambuco (7°57'8.37"S, 38°17'54.07"O). As plantas serão divididas em dois tratamentos: controle (irrigação com 100% da capacidade de pote) e déficit hídrico (irrigação com 10% da capacidade de pote, 40 mL).

#### 3.2 ANÁLISE E MEDIDAS

##### 3.2.1 Conteúdo hídrico relativo foliar (CHR), status hídrico do solo

Serão realizadas medidas de conteúdo hídrico relativo (CHR) foliar seguindo metodologia proposta por Barrs e Weatherley (1962) e da umidade do solo (US) através do Medidor Falker HFM 2030 (v/v).

##### 3.2.2 Trocas gasosas

As trocas gasosas serão medidas com o analisador de gases por infravermelho (IRGA, ADC, model LCI-pro; Hoddesdon, UK) na folha mais jovem completamente expandida, sem senescência. Serão obtidos a condutância estomática ( $g_s$ ), assimilação líquida de  $CO_2$  ( $A$ ), transpiração ( $E$ ) e a eficiência do uso da água ( $EUA=A/E$ ). A fluorescência da clorofila  $a$  será mensurada no mesmo par de folhas das trocas gasosas, dentro mesmo intervalo de tempo.

##### 3.2.3 Análises anatômicas

As análises serão realizadas na Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Para tal, folhas expandidas serão coletadas, o mesmo par correspondente para cada tratamento (Figura 1), fixadas com FAA<sub>50</sub> (formaldeído, ácido acético e etanol 1:1:18, respectivamente) por 48 horas e em seguida preservadas em etanol 70%. Serão realizadas secções transversais de 12  $\mu$ m em micrótomato rotativo para posterior fixação (BUKATSCH, 1972) e montagem em lâminas

permanentes, para se obter as medidas de espessura da folha, mesofilo, parênquimas paliçádico e esponjoso, bem como espessura da epiderme e cutícula em ambas as faces (abaxial e adaxial). Também será realizada a dissociação da epiderme pelo método de Strittmatter (1973) para a obtenção de medidas de densidade estomática, de células epidérmicas e de tricomas.

As estruturas serão registradas utilizando fotomicroscópio Leica (Leica DM5500 B) com auxílio do sistema de captura de imagens Leica Application Suite (LAS) V3 software e as imagens serão analisadas utilizando o software ImageJ (Pro Plus 4.5, Media Cybernetics, Inc., Rockville USA)

## 4 RESULTADOS

4.1 ARTIGO – *CALOTROPIS PROCERA* (APOCYNACEAE) INCREASING DENSITY AND DECREASING STOMATAL PORE SIZE DURING STRESS CONDITIONS SUPPORTING THE TOLERANCE OF THIS C3 SPECIES UNDER DROUGHT AND SALINITY

A ser submetido ao periódico *Annals of Botany*

***Calotropis procera* (Apocynaceae) increasing density and decreasing stomatal pore size during stress conditions supporting the tolerance of this C<sub>3</sub> species under drought and salinity**

**Adglecianne S. MELO<sup>1</sup>, Tamires S. YULE<sup>1</sup>, Vanessa A. BARROS<sup>1</sup>, Rebeca RIVAS<sup>1</sup> and Mauro G. SANTOS<sup>1\*</sup>**

*<sup>1</sup>Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE 50670-9 901, Brazil;*

*\*For Correspondence. E-mail: [mauro.gsantos@ufpe.br](mailto:mauro.gsantos@ufpe.br)*

- **Background and Aims** To deal with stressful environmental conditions, such as drought and salinity, plants have several strategies, some of which are anatomical. In leaf anatomy level, mainly, as it is intrinsically related to photosynthesis and, therefore, to the physiological performance of plants. Thus, the ability to adjusting leaf traits during stress can be a substantial strategy tolerance. *Calotropis procera* stands out for its robust performance under drought and salinity, thus, our main goal was to verify whether and what this specie changes leaf anatomical attributes during stressful conditions, and how this may helping its performance.
- **Methods** Under experimental conditions of drought and salinity, in a greenhouse, were measured the anatomical-physiological parameters of *C. procera* over 46 and 56 days of duration of these respective experiments.
- **Key Results** Plants showed adjustments in leaf attributes in both stressful conditions. Under drought, on the 6th day, plants showed thicker mesophyll, and at ninth increased thickness cuticle, the density of stomata and trichomes. Under salt, the plants adjusted the same attributes (22nd day). Such adjustments are mainly involved in the regulation of water loss, which improves water status in plants and the efficiency of this resource, promoting directly and indirectly improvements in photosynthesis rate even under stress, possibly by the increases in the sites to CO<sub>2</sub> uptakes and optimized diffusing process.
- **Conclusions** Our finds confirm that *C. procera* has anatomical plasticity changing traits that can play a decisive role in its physiological adaptation, giving advantage mainly of its efficient stomatal control under water limited environmental.
- **Key words:** abiotic stress, anatomical plasticity, *Calotropis*, C<sub>3</sub> metabolism, drought, evergreen, leaf anatomy, stomatal density, trichomes density, thickness cuticle, salinity, stress tolerance.

## INTRODUCTION

Environmental conditions such as temperature, precipitation, soil salinity, and solar radiation influence on the survival of plant species determining their establishment and distribution (Liu *et al.*, 2019). To survive such conditions, plants can present strategies that allow them to tolerate stress, either through molecular, physiological, and biochemical adjustments, as well as by changes in their morphology and anatomy (Trabelsi *et al.*, 2019; Rivas *et al.*, 2020).

Among the most limiting abiotic factors of plant growth and development are drought and salinity (Munns, 2002; Mohanta *et al.*, 2017) both affect essential aspects of plant life, such as photosynthesis, being responsible for significant losses in productivity plant (Chaves *et al.*, 2009; Abdelraheem *et al.*, 2019). About 20% of arable lands in the world are affected by salinity (Negrão *et al.*, 2017), while in the drought scenario, climatological forecasts point to an increase in average temperature and a reduction in precipitation, leading to even more intense drought events (Flexas *et al.*, 2016; Gray and Brady, 2016; Marengo *et al.* 2017).

Despite the unfavorable conditions, some species can develop and maintain their performance, as does *Calotropis procera*, a species native from arid areas (Hassan *et al.*, 2015). Its physiological performance under limiting conditions contrasts with most other C<sub>3</sub> metabolism plants (Lawson *et al.*, 2014; Rivas *et al.*, 2020), such as maintaining a high photosynthetic rate even under low stomatal conductance (Rivas *et al.*, 2017; 2020). This feature attracts interest in understanding the strategies giving such tolerance to environments with limited resources, which could contribute to genetic bases for plant breeding.

Previous studies have shown how *C. procera* responds to these adverse conditions with remarkable performance (Tezara *et al.* 2011; Frosi *et al.*, 2012; Rivas *et al.*, 2020), but what is poorly understood is if adjustments at the anatomical level could be contributing to its tolerance. Especially changes in leaf attributes, since the leaf has a direct relation to photosynthetic, and

is one of the organs with the higher plasticity in response to environmental conditions (Tomás *et al.*, 2013). Some studies have shown that plants developing under different conditions could show specific anatomic traits of adaptations. For example, in plants of xeric environments it is expected leaves with a thick cuticle, due to its role as a barrier against transpiration (Abd Elhalim *et al.*, 2016; Simione *et al.*, 2017). Also, changes in mesophyll thickness, as well in the density of stomatal have a significant impact on photosynthesis improving de CO<sub>2</sub> uptake and diffusion in situations of reduced  $g_s$  under water-limited environments (Violet-Chabrand *et al.*, 2017; Toscano *et al.*, 2018). With this in mind, leaf anatomical adjustments could be a key strategy in *C. procera* as well, favoring its survival and the outstanding performance under limiting conditions.

As mentioned, responses in this level to this species under conditions of drought and salt are little understood (Colombo *et al.*, 2007; Tezara *et al.*, 2011; Rivas *et al.*, 2020). Most studies already conducted show just at one moment of the stressful condition, yet, here we analyze the responses over the drought and salt period imposed. Thus, it will make it possible to expand the understanding of tolerance mechanisms mainly related to leaf anatomical adjustments by verifying if it changes, when it changes and how such attributes relate to the physiological performance of this species under stress.

The principal hypothesis tested here is that *C. procera* presents anatomical plasticity by changing leaf attributes during the stress period, those that relate to the efficient regulation against water loss by an increase in trichomes density and thickness cuticle. It will be possible to see this adjustment in the leaves developing during the period of the stress imposition. Understanding the anatomical leaf responses of *C. procera*, makes it possible to view a full profile of the mechanisms that this species uses to thrive in such limiting and diverse environments.

## MATERIALS AND METHODS

## *Plant material and growth conditions*

### *Drought experiment*

The experiment was conducted in a greenhouse (8°08'58"S, 34°56'55"W) under the average temperature was 32°C ± 2 and 61% relative humidity. Plants of *Calotropis procera* (Aiton) W.T. Aiton (Apocynaceae) was obtained from seeds collected from a population of the species located in the semiarid region of Brazil, in the municipality of Serra Talhada (7°57'8.37"S, 38°17'54.07"W). Seeds germinated in trays containing vermiculite, after 15 days after were transferred to seedling pots (7kg) containing a mix of substrates of black soil, red soil, and washed sand (3:1:1) that presented the following characteristics: pH: 8.1 H<sub>2</sub>O; P: 49 mg dm<sup>-3</sup>; Ca: 3.65 cmolc.dm<sup>-3</sup>; Mg: 0.85 cmolc.dm<sup>-3</sup>; K: 0.65 cmolc.dm<sup>-3</sup>.

The plants were maintained well-watered during three months of growth (with 400 mL of water per pot). Upon reaching this age, the plants were submitted to the following treatments: control (irrigated daily with 100% pot capacity, 400mL), and drought (irrigation with 10% pot capacity, 40mL), with 20 replicates per treatment, with one plant per pot. The two experiments were conducted in parallel and independently with their respective experimental designs (Fig. 1), which were planned based on previous observations (Frosi *et al.*, 2012; Rivas *et al.*, 2017). In addition, we considered visual responses to adjust the evaluations as leaf senescence and abscission. When stomatal conductance came near zero and the most recent leaf expanded, we made the final collect and ended the experiments.

### *Salinity experiment*

*Calotropis procera* were collected near seacoast (7°50'33.35"S, 34° 50'20.63"W) in northeastern Brazil. Seeds were germinated in trays containing vermiculite, at the 15 days after seedlings were transferred to seedling pots (7 kg) containing washed sand whose characteristics were: pH: 8.5 H<sub>2</sub>O; P: 92 mg dm<sup>-3</sup>; Ca: 1.0 cmolc.dm<sup>-3</sup>; Na: 0.6 cmolc.dm<sup>-3</sup>; K: 0.04 cmolc.dm<sup>-3</sup>; Mg: 0.5 cmolc.dm<sup>-3</sup>. The plants grew for three months in a greenhouse under ideal hydration

conditions, after which they were subjected to the treatments: control (daily irrigation with deionized water at 100% of the pot capacity, 400mL) and saline (daily irrigation with 100mM NaCl solution, 400mL) with 24 replicates. Every 15 days during the three months of growth and after installation of the experiment plants received nutrient solution by Hoagland modified by Epstein (1972).

### *Measurements*

#### *Water Status and Soil Moisture*

The leaf relative water content (RWC) was determined by collecting leaf discs (6mm) at 6 am on the same days and on the same plants that we used to collect for leaf anatomical processing. After collected, the discs were immediately weighed on a precision scale to obtain fresh weight (FW). Subsequently, the discs were soaked in deionized water for 24 hours to obtain the turgid weight (TW) after that, they were dried in a stove at 60°C for 48 hours to obtain dry weight (DW). RWC was calculated as  $RWC (\%) = [FW-DW / TW-DW] \times 100$ , according to Barrs and Weatherley (1962). Measurements of soil moisture (SM) were performed during the experiment at a depth of approximately 30cm, with the Falker HFM 2030 (v / v) meter.

#### *Gas exchange*

Gas exchanges were measured during the experiments on healthy leaves completely expanded using the infrared gas analyzer (IRGA, ADC, model LCI-Pro; Hoddesdon, UK). We obtained values of stomatal conductance ( $g_s$ ), net CO<sub>2</sub> assimilation ( $A$ ), and transpiration rate ( $E$ ), after was calculated water use efficiency ( $WUE = A / E$ ). The measurements were performed between 9:00 to 11:00 a.m, according to the photosynthetic photon flux density of the incidence of global irradiation at the time of measurements, between 500 and 900  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . The vapor-pressure deficit (VPD) was calculated in parallel with the gas exchange, using data of temperature and air humidity, measured using the Digital Thermo-hygrometer (SH, 122,

J. Prolab, São José dos Pinhais, BR). The  $VPD = e_s - e_a$ , being ( $e_s$ ) the vapor pressure of the saturated air and ( $e_a$ ) the ambient vapor pressure (Campbell and Norman, 1998).

### *Anatomical analyses*

#### *Leaf material and anatomical processing*

The median region of the leaves (first fully expanded leaf pair) were collected from three plants in each treatment: drought, salt, and their respective controls at 3:00 p.m. These samples were fixed in a solution of FAA 50% (ethanol, formaldehyde, and acetic acid, 8:1:1, respectively) for 24 hours, after that, were preserved in 70% alcohol (Johansen, 1940).

The material was selected to measure the mesophyll thickness (palisade and spongy), cuticle, and epidermis (adaxial and abaxial) by cross-sections. By peridermic sections, we measured stomatal and trichome density. The samples obtained by the cross-sections (the median portion of the central rib) was processed following the paraffin technique (Kraus and Arduin, 1997). Sections with 12  $\mu\text{m}$  were performed on a rotative microtome (Leica RM 2145), adhered to slides with Bissing adhesive and placed on a heating plate (40°C), followed by the dewaxing step and then the double staining procedure (Alcian Blue + Safranin) and placed in blades with Entellan.

For preparing blades from paradermal sections, the epidermal dissociation procedure was performed. The material was immersed in Franklin's solution (hydrogen peroxide and acetic acid, 1:1) and taken to the stove until it was observed the beginning of the epidermis detachment. With the aid of tweezers, the abaxial and adaxial epidermis were separated, stained in safranin, and subsequently placed on slides with 50% liquid glycerin.

The slides were observed and photographed in a photomicroscope (Leica DM5500 B) with the help of the Leica Application Suite (LAS) V3 software, for later measurements of the anatomical parameters (15 measurements per treatment) using the ImageJ Software (Pro Plus 4.5, Media Cybernetics, Inc., Rockville USA). Trichomes were counted for by their basal

structure. Trichomes and stomatal density were obtained by the relationship between the number of these structures and the area (0,3 mm<sup>2</sup>) of the field view from 10X magnification.

#### *Leaf area, Specific leaf area and Biomass*

The total biomass (leaf, stem, and root) was collected from four individuals per treatment at the end of the experiments. All fresh leaves were scanned to calculate the leaf area using Software Image J Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Inc., Rockville USA). Subsequently, the material collected was dried in a stove at 60° C for 72 hours and then weighed on a precision scale (AND H200, Tokyo, JP), to obtain dry biomass. The specific leaf area (SLA) was calculated by the ration between the leaf area and the dry biomass of the leaves.

#### *Statistical analysis*

The anatomical parameters involving different faces (abaxial and adaxial) were submitted to factorial ANOVA (treatment x face), as well as the mesophyll thickness (treatment X parenchyma) and the means were compared by Newman Keuls test ( $p < 0.05$ ). The ecophysiological variables of gas exchange, RWC, soil moisture, and growth measures were analyzed using the T test ( $p < 0.05$ ). All analyzes were performed using the Statistica 8.0 software (StatSoft. Inc., Tulsa, OK 74104, USA).

## RESULTS

#### *Water Status and Soil Moisture*

Under drought, plants showed lower RWC compared to the control (Table 1). Although the reductions in SM (45%), the RWC decreased only 15% in stressed plants, which maintained the hydration levels above 50%. Under salt, there was no difference in RWC of plants even after 56 days subjected to daily concentrations of salt in the soil. In that condition, neither the SM showed any difference on the final day (Table 1).

#### *Gas exchanges*

The gas exchange of *C. procera* plants decreased under drought and salinity (Fig. 2). Under drought, plants had an average reduction of 70% in the  $g_s$  compared to the control (Fig. 2A); nevertheless were able to maintain 60% of  $A$  despite the lower  $g_s$  (Fig. 2B). Besides, some days plants in both treatments, drought and control, showed the same assimilation rate, even with control plants showing higher  $g_s$ . The WUE was 41% higher in plants under drought (Fig. 2C).

Under salt, plants showed lower  $g_s$  (54%) compared to control plants (Fig. 2D) except on the day of high VPD (Supplementary data fig.1) in which there is no difference in this parameter. Yet plants still had a high assimilation rate, almost 50%, compared with control (Fig. 2E). On salinity, the WUE increased 8% in stressed plants compared to the control (Fig. 2F).

#### *Leaf area, Specific leaf area and biomass*

Both stresses affected plant growth by reducing the shoot compared to control plants (Table 2). Under drought, the shoot biomass was 60% lower, and concerning the underground organ, there was no difference between treatments. The shoot/root ratio was 2.5 times smaller in stressed plants compared to the control plants (Table 2). Under salinity, both the shoot and root biomass were affected, with lower values compared to the control, 41%, and 70%, respectively. Stressed plants showed a higher shoot/root ratio (Table 2). The total leaf area in plants under both drought and salt decreased 41% and 27%, respectively (Table 2). Contrasting with the specific leaf area that increased 52% and 33% compared the control plants (Table 2).

#### *Anatomical analysis*

##### *Mesophyll*

The cross-sections showed a dorsiventral mesophyll (palisade parenchyma + spongy) and a uniseriate epidermis (Fig. 3). The leaves of *C. procera* are amphistomatous (Supplementary data fig. 2). Regardless of the treatment, type of stress condition, and the day, spongy parenchyma is thicker than the palisade (Fig. 4). During the drought condition, plants

show a thickening of mesophyll compared to control plants (Fig. 4A). Under salinity, there was an increase only in the spongy parenchyma compared to control plants (Fig. 4B).

#### *Cuticle and epidermis*

In the drought experiment, plants showed changes in cuticle thickness from the 6th day, where both abaxial and adaxial leaf sides have thickening cuticle comparing to control (Tab. 3). Under salt, only with at 46 days plants showed differences in this parameter, in which only the abaxial side have thickening compared to the control (Tab.3). Regarding the epidermis, plants under drought increased the thickness on the 18th day on both leaf surfaces. Under salinity, it showed thickening only on the abaxial side compared to the control plants (Tab. 3).

#### *Stomatal and trichomes density*

In the drought experiment, plants showed increases in stomatal density from the 9th day, especially in the adaxial leaf side compared to control (Fig. 5A). Under salt condition, plants also increased the stomatal density on the adaxial surface (Fig. 5C). Besides, in both conditions the stomatal size decreased in stressed plants (Table 4). About trichomes, in both experiments, plants showed an increase in the density on both leaf surfaces compared to their respective controls (Fig. 5B, D).

## DISCUSSION

Our results suggest that tolerance of *Calotropis procera* outcomes from the ability to respond with different strategies and adjustments, which combine and collaborate to optimize its performance under stress. Under limited conditions, both drought and salt, plants reduce the stomatal aperture to conserve water, which helps to the maintenance of RWC at safe levels. Meantime it shows an increase in the adaxial stomatal density, which appears to coordinate the trade-off between low  $g_s$  and photosynthesis. Plants of *C. procera* also increased the cuticle thickness and trichomes density, which contribute to the improvement of WUE. In synthesis,

our data indicate that changes in leaf anatomic attributes appear to be an essential response, which reflects in physiological traits helping this species to deal with stress.

Our findings advance in the knowledge about leaves being a very plastic organ (Khan *et al.*, 2018). We add the evidence that, specifically, the anatomic attributes are very plastic as well, reflecting in important physiological parameters under stress. This find is until now particular for *Calotropis procera* because those changes occur quickly, within only a few days after the limiting conditions start. That confronts the assumption from the past that the leaf anatomical traits do not change in response to stress, especially in a short time (Chaves *et al.*, 2009). Previous studies with *C. procera* had already highlighted the tolerance of this species under water limiting conditions, but none of them had shown the dynamics of anatomical adjustments in the most plastic organ of plants (Tezara *et al.*, 2011; Frosi *et al.*, 2012; Rivas *et al.*, 2017; 2020).

All traits adjusted are straight involved with strategies to conserve water and, at the same time, maintain a considerable photosynthesis rate even under adverse environments. The first anatomical response observed under drought was the thickening of the cuticle, which can be critical to tolerate arid and semi-arid zones (Pereira *et al.*, 2019; Wyka *et al.*, 2019). The cuticle is a barrier to transpiration in plants, which means that a thicker one increases the resistance to water loss, improving the WUE (Simione *et al.*, 2017). Mainly, considering that with reducing  $g_s$  cuticle transpiration could be significant (Kane *et al.*, 2020). As the cuticle, the trichomes can increase the resistance to water loss as well (Galdon-Armero *et al.*, 2018). Besides, these structures allow the maintenance of the border layer leading to a microclimate more favorable for gas exchange (Rivas *et al.*, 2020).

Stomatal density is another anatomical trait observed that impact on the gas exchange (Boer *et al.*, 2016; Arve *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017; Violet-Chabrand *et al.*, 2017; Lawson *et al.*, 2018; McAusland *et al.*, 2020). With higher density, plants can improve the control and

aperture time of the stomata (Souza *et al.*, 2018). This trait is also associated with smaller stomata (Table 4) that have faster kinetics (Boer *et al.*, 2016; Chaves *et al.*, 2016; Lawson and Vialet-Chabrand, 2018;). Thus, in situations of stomatal closure due to stress, plants may have increased the stomata density to promote more CO<sub>2</sub> uptake sites, aiming the carbon gain (Rivas *et al.*, 2020). It can be a crucial response to sustaining the photosynthesis rate in *C. procera* under conditions of this study. Furthermore, *C. procera* leaves are amphistomatous, which is one more feature supporting the physiological performance of this species under stress. Having stomatal in both leaves surface could improve the CO<sub>2</sub> diffusion in intercellular spaces (Tholen *et al.*, 2012; Xiong and Flexas, 2020). Indeed, *C. procera* has ability to maintain mesophilic conductance and maximum rate of Rubisco carboxylation under water limited conditions (Rivas *et al.*, 2017). The thickening parenchyma that we observed here may be responsible for this as well.

Despite adjusting the same anatomical attributes in the two conditions of this study, *C. procera* shows some different strategies for drought and salt (Rivas *et al.*, 2020). Under saline stress, plants showed thick cuticles only on the abaxial side of the leaf, however, on both sides under drought. As well only the spongy parenchyma have thickening under salt, contrasting with the entire mesophyll thicker on drought stress. This attribute involves improving the distribution of the light more efficiently inside mesophyll, supporting photosynthetic rate and photoprotection (Ennajeh *et al.*, 2010; Campbell *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2018; Pireda *et al.*, 2019). Otherwise, stomatal density showed a tendency to be higher on the adaxial leaf side in both experiments. That could be a critical strategy based on the architecture of *C. procera* leaves. The orientation of their leaves tends to verticality, that is, small leaf angle, thus in environments with high temperature, air vapor pressure deficit and luminous, the adaxial surface is less negative impacted for it (Joesting *et al.*, 2016). Furthermore, investing stomatal on that side could probably maximize the CO<sub>2</sub> assimilation, improving WUE as well.

Looking at the general response pattern, we found that all anatomical adjustments support the tolerance and physiological performance. They might operate in a harmonizing and cooperative way, improving WUE, maintenance of the RWC, and photosynthesis rate. Besides, we reinforce that *Calotropis procera* has multiple traits of different levels and natures promoting its survival under conditions unfavorable to the most C<sub>3</sub> species (Lawson *et al.*, 2014; Rivas *et al.*, 2020).

## CONCLUSIONS

In this work, we have investigated whether, which, and how the leaf anatomic attributes could be contributing to this outstanding physiological performance of *C. procera*. In the first place, we corroborate our hypothesis that there is anatomical plasticity in this species. Indeed, *C. procera* respond to both drought and salt stress, adjusting the leaf attributes during the unfavorable conditions. Second, this finds adds one more mechanism that explaining its differential tolerance and distribution in many environments and regions, especially the tropical ones, despite being a C<sub>3</sub> plant. That probably gives some advantages to this species, allowing its fast establishment, survival, growth, and competitive dominance in many ecosystems, enhancing its power as an invasive species.

Moreover, these findings propose that *Calotropis procera* is a powerful source to advance in understanding the different ways that plants could respond to various limited conditions. Each study conducted with this species reveals even more possibilities to investigate paths to tolerance in plants. Such which genes are involved in this rapid anatomic plasticity? For example. This approach could be valuable to explore tools in genetic engineering perspective to improve tolerance of plants, mainly in the face of the new climate scenarios.

## SUPPLEMENTARY DATA

Figure 1: Vapor-pressure deficit during the experimental conditions of the study. Figure 2: Cross sections of *C. procera* leaves ( $n = 3 \pm \text{error}$ ) under drought experiment (10% watering) and respective control at different collection times (3, 6, 9, 18 and 46 days). **Column 1** - Mesophylus; **Column 2** - adaxial surface; **Column 3** - abaxial surface. Arrows indicate the epidermal layer and arrowheads the cuticle; **Pp** - Palisade parenchyma; **Sp** - Spongy parenchyma. Figure 3: Cross sections of *C. procera* leaves ( $n = 3 \pm \text{error}$ ) under salinity experiment (100mM NaCl) and respective control at different collection times (22, 46 and 56 days). **Column 1** - Mesophylus; **Column 2** - adaxial surface; **Column 3** - abaxial surface. **Arrows** indicate the epidermal layer and **arrowheads** the cuticle; **Pp** - Palisade parenchyma; **Pe** - Spongy parenchyma. Figure 4: Paradermal sections (200 $\mu\text{m}$ ) showing the stomata and trichomes bases of *C. procera* ( $n = 3 \pm \text{error}$ ) under drought experiment (10% watering) and respective control at different collection times (3,6, 9,18 and 46 days). Figure 5: Paradermal sections (200 $\mu\text{m}$ ) showing the stomata and trichomes bases of *C. procera* ( $n = 3 \pm \text{error}$ ) under salinity experiment (100mM NaCl) and respective control at different collection times (22 and 46 days).

#### ACKNOWLEDGMENT

AM and MS thanks to Universidade Federal de Mato Grosso do Sul for the logistic support from the Laboratório de Anatomia Vegetal of the Instituto de Biociências in the anatomic analyses.

#### FUNDING

This research was conducted with support of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. MS acknowledge to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the fellowship granted and financial support for the Project (CNPq-470247/2013-4).

#### LITERATURE CITED

- Abdelhalim ME, Abo-Allata OK, Habib AS, Abd Elbar OH. 2016.** The anatomical features of the desert halophyted *Zygophyllum album* L.F and *Nitraria retusa* (Forssk.) Asch. *Annals of Agricultural Science* **61**: 97–104.
- Abdelraheem A, Esmaeili N, O’Connell M, Zhang J. 2019.** Progress and perspective on drought and salt stress tolerance in cotton. *Industrial Crops and Products* **130**: 118–129.
- Arve LE, Kruse OMO, Tanino KK, Olsen JE, Futsæther C, Torre S. 2017.** Daily changes in VPD during leaf development in high air humidity increase the stomatal responsiveness to darkness and dry air. *Journal of Plant Physiology* **211**: 63–69.
- Barrs HD, Weatherley PE. 1962.** A Re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Australian Journal of Biological Sciences*. **15**, 413–428.
- Campbell G, Mielke MS, Rabelo GR, Da Cunha M. 2018.** Key anatomical attributes for occurrence of *Psychotria schlechtendaliana* (Müll.Arg.) Müll.Arg. (Rubiaceae) in different successional stages of a tropical moist forest. *Flora* **246–247**: 33–41.
- Campbell, G., Norman, J., 1998.** *An Introduction to Environmental Biophysics*, 2nd edn. New York: Springer-Verlag.
- Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C. 2009.** Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* **103**: 551–560.
- Colombo R, Marín O. 2007.** Relaciones hídricas, Fotosíntesis, y anatomía foliar de dos especies del género *Calotropis*. *Interciência* **32**: 731–796.
- De Boer HJ, Price CA, Wagner-Cremer F, Dekker SC, Franks PJ, Veneklaas EJ. 2016.** Optimal allocation of leaf epidermal area for gas exchange. *New Phytologist* **210**: 1219–1228.
- Ennajeh M, Vadel AM, Cochard H, Khemira H. 2010.** Comparative impacts of water stress on the leaf anatomy of a drought-resistant and a drought-sensitive olive cultivar. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **85**: 289–294.
- Epstein, E. 1972.** *Mineral nutrition of plants: principles and perspectives*. New York: John Wiley & Sons.
- Flexas J, Díaz-Espejo A, Conesa MA, et al. 2016.** Mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> and Rubisco as targets for improving intrinsic water use efficiency in C<sub>3</sub> plants: Gm and Rubisco: physiological traits driving WUEi. *Plant, Cell & Environment* **39**: 965–982.
- Frosi G, Oliveira MT, Almeida-Cortez J, Santos MG. 2012.** Ecophysiological performance of *Calotropis procera*: an exotic and evergreen species in Caatinga, Brazilian semi-arid. *Acta Physiologiae Plantarum* **35**: 335–344.
- Galdon-Armero J, Fullana-Pericas M, Mulet PA, Conesa MA, Martin C, Galmes J. 2018.** The ratio of trichomes to stomata is associated with water use efficiency in *Solanum lycopersicum* (tomato). *The Plant Journal* **96**: 607–619.
- Gray SB, Brady SM. 2016.** Plant developmental responses to climate change. *Developmental Biology* **419**: 64–77.

- Hassan LM, Galal TM, Farahat EA, El-Midany MM. 2015.** The biology of *Calotropis procera* (Aiton) W.T. *Trees* **29**: 311–320.
- Joesting HM, Counts J, Grier J, Reilly HZ. 2016.** Leaf inclination in the coastal sand dune herb *Hydrocotyle bonariensis* Comm. ex Lam. *Flora* **224**: 159–166.
- Johansen, DA, 1940.** *Plant Microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book Company Inc.
- Kane CN, Jordan GJ, Jansen S, McAdam SAM. 2020.** A Permeable Cuticle, Not Open Stomata, Is the Primary Source of Water Loss From Expanding Leaves. *Frontiers in Plant Science* **11**: 774.
- Khan A, Pan X, Najeeb U et al., 2018.** Coping with drought: stress and adaptive mechanisms, and management through cultural and molecular alternatives in cotton as vital constituents for plant stress resilience and fitness. *Biological Research* **51**: 47
- Kraus, JE, Arduin M. 1997.** *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Seropédica: Editora da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- Lawson T, Davey PA, Yates SA, et al. 2014.** C<sub>3</sub> photosynthesis in the desert plant *Rhazya stricta* is fully functional at high temperatures and light intensities. *New Phytologist* **201**: 862–873.
- Lawson T, Vialet-Chabrand S. 2018.** Speedy stomata, photosynthesis and plant water use efficiency. *New Phytologist* **221**: 93–98.
- Li L, Ma Z, Niinemets Ü, Guo D. 2017.** Three Key Sub-leaf Modules and the Diversity of Leaf Designs. *Frontiers in Plant Science* **8**: 1542.
- Liu C, Zhu P, Fan W, et al. 2019.** Functional analysis of drought and salt tolerance mechanisms of mulberry RACK1 gene. *Tree Physiology* **39**: 2055 –2069.
- Marengo JA, Torres RR, Alves LM. 2017.** Drought in Northeast Brazil – Past, present and future. *Theoretical and Applied Climatology* **129**: 1189 –1200.
- McAusland L, Vialet-Chabrand S, Jauregui I, et al. 2020.** Variation in key leaf photosynthetic traits across wheat wild relatives is accession dependent not species dependent. *New Phytologist*: [nph.16832](https://doi.org/10.1111/nph.16832).
- Mohanta TK, Bashir T, Hashem A, Abd\_Allah EF. 2017.** Systems biology approach in plant abiotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* **121**: 58–73.
- Munns R. 2002.** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* **25**: 239–250.
- Negrão S, Schmöckel SM, Tester M. 2017.** Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. *Annals of Botany* **119**: 1–11.
- Pereira S, Figueiredo-Lima K, Oliveira AFM, Santos MG. 2019.** Changes in foliar epicuticular wax and photosynthesis metabolism in evergreen woody species under different soil water availability. *Photosynthetica* **57**: 192–201.
- Pireda S, da Silva Oliveira D, Borges NL, et al. 2019.** Acclimatization capacity of leaf traits of species co-occurring in restinga and seasonal semideciduous forest ecosystems. *Environmental and Experimental Botany* **164**: 190–202.

- Rivas R, Barros V, Falcão H, Frosi G, Arruda E, Santos M. 2020.** Ecophysiological Traits of Invasive C3 Species *Calotropis procera* to Maintain High Photosynthetic Performance Under High VPD and Low Soil Water Balance in Semi-Arid and Seacoast Zones. *Frontiers in Plant Science* **11**: 717.
- Rivas R, Frosi G, Ramos DG, Pereira S, Benko-Iseppon AM, Santos MG. 2017.** Photosynthetic limitation and mechanisms of photoprotection under drought and recovery of *Calotropis procera*, an evergreen C3 from arid regions. *Plant Physiology and Biochemistry* **118**: 589–599.
- Simioni PF, Eisenlohr PV, Pessoa MJG, Silva IV da. 2017.** Elucidating adaptive strategies from leaf anatomy: Do Amazonian savannas present xeromorphic characteristics? *Flora* **226**: 38–46.
- Souza PU, Lima LKS, Soares TL, Jesus ON de, Coelho Filho MA, Girardi EA. 2018.** Biometric, physiological and anatomical responses of *Passiflora* spp. to controlled water deficit. *Scientia Horticulturae* **229**: 77–90.
- Tezara W, Colombo R, Coronel I, Marín O. 2011.** Water relations and photosynthetic capacity of two species of *Calotropis* in a tropical semi-arid ecosystem. *Annals of Botany* **107**: 397–405.
- Tholen, D.; Boom, C.; Zhu, X.-G. 2012.** Opinion: Prospects for improving photosynthesis by altering leaf anatomy. *Plant Science*, v. **197**, p. 92–101.
- Tomás M, Flexas J, Copolovici L, et al. 2013.** Importance of leaf anatomy in determining mesophyll diffusion conductance to CO<sub>2</sub> across species: quantitative limitations and scaling up by models. *Journal of Experimental Botany* **64**: 2269–2281.
- Toscano S, Ferrante A, Tribulato A, Romano D. 2018.** Leaf physiological and anatomical responses of *Lantana* and *Ligustrum* species under different water availability. *Plant Physiology and Biochemistry* **127**: 380–392.
- Trabelsi L, Gargouri K, Ben Hassena A, et al. 2019.** Impact of drought and salinity on olive water status and physiological performance in an arid climate. *Agricultural Water Management* **213**: 749–759.
- Vialet-Chabrand SRM, Matthews JSA, McAusland L, Blatt MR, Griffiths H, Lawson T. 2017.** Temporal Dynamics of Stomatal Behavior: Modeling and Implications for Photosynthesis and Water Use. *Plant Physiology* **174**: 603–613.
- Wyka TP, Bagniewska-Zadworna A, Kuczyńska A, et al. 2019.** Drought-induced anatomical modifications of barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves: An allometric perspective. *Environmental and Experimental Botany* **166**: 103798.
- Xiong D, Flexas J. 2020.** From one side to two sides: the effects of stomatal distribution on photosynthesis. *New Phytologist*: nph.16801.

TABLE 1. Leaf relative water content (RWC) and soil moisture (SM) of young plants of *Calotropis procera* ( $n= 3 \pm$  error) under drought (watering with 10 % of soil capacity) and salinity (100 mM NaCl) and respective controls

<b>Drought Experiment</b>				
Days	<b>RWC (%)</b>		<b>Soil Moisture</b>	
	<b>Control</b>	<b>Stress</b>	<b>Control</b>	<b>Stress</b>
3	83±1.6 <sup>A</sup>	58±1.3 <sup>B</sup>	8.6±0.5 <sup>A</sup>	4.1±0.2 <sup>B</sup>
6	74±4.8 <sup>A</sup>	80±2.5 <sup>A</sup>	8.2±0.1 <sup>A</sup>	3.9±0.4 <sup>B</sup>
9	67±3.9 <sup>A</sup>	71±1.6 <sup>A</sup>	6.7±0.3 <sup>A</sup>	2.8±0.1 <sup>B</sup>
18	90±13 <sup>A</sup>	74±2.8 <sup>A</sup>	5.7±0.1 <sup>A</sup>	5.2±0.1 <sup>A</sup>
46	79±1.5 <sup>A</sup>	59±0.6 <sup>B</sup>	6.0±0.3 <sup>A</sup>	4.4±0.1 <sup>B</sup>
<b>Salinity Experiment</b>				
22	73±2.5 <sup>A</sup>	67±4.2 <sup>A</sup>	5.4±0.5 <sup>A</sup>	3.5±1.3 <sup>B</sup>
56	89±1.4 <sup>A</sup>	90±4.8 <sup>A</sup>	7.0±0.6 <sup>A</sup>	7.9±0.7 <sup>A</sup>

Means followed by different letters are significantly different according to the Student's t-Test ( $p < 0, 05$ ).

TABLE 2. Biomass of young plants of *Calotropis procera* ( $n = 5 \pm$  error) under drought (10% watering) and salinity (100 mM NaCl) at the end of the experimental conditions, 46 and 56, respectively. **LA** = Leaf area, **SLA** = Specific leaf area

Biomass (g)	<b>Drought Experiment</b>			<b>Salinity Experiment</b>		
	<b>Control</b>	<b>Drought</b>	<b>%</b>	<b>Control</b>	<b>Salt</b>	<b>%</b>
LA	26.6±0.6*	15.6±1.4	41 ↓	68.4±6.2*	49.5±4.2	27 ↓
SLA	3.8±0.3	8.2±0.3*	52 ↑	13.5±0.7	20.3±1.4*	33 ↑
Shoot	9.8 ±0.2*	3.9 ±0.4	60 ↓	12.0 ± 0.5*	7.1 ± 0.8	41 ↓
Root	2.7±0.1	2.7 ±0.3		19.2 ± 1.9*	5.6 ± 0.2	70 ↓
Shoot/Root	3.5±0.2*	1.4±0.1		0.6±0.06	1.2±0.1*	

Means followed by asterisk symbol as significantly different according to the Student's t-Test ( $p < 0, 05$ ).

TABLE 3. Thickness ( $\mu\text{m}$ ) of cuticles and epidermis of *Calotropis procera* leaves ( $n = 3 \pm \text{error}$ ) under drought (10% watering) and salinity (100mM NaCl) and respective controls. ADA = adaxial, ABA = abaxial

Drought Experiment								
Days	Cuticle				Epidermis			
	ADAXIAL		ABAXIAL		ADAXIAL		ABAXIAL	
	Control	Stress	Control	Stress	Control	Stress	Control	Stress
3	4.4 $\pm$ 0.3 <sup>A</sup>	3.7 $\pm$ 0.6 <sup>A</sup>	3.7 $\pm$ 0.1 <sup>A</sup>	3.0 $\pm$ 0.2 <sup>A</sup>	34.1 $\pm$ 2.1 <sup>A</sup>	26.6 $\pm$ 0.4 <sup>B</sup>	31.3 $\pm$ 1.7 <sup>A</sup>	24.9 $\pm$ 0.4 <sup>B</sup>
6	3.1 $\pm$ 0.1 <sup>B</sup>	4.3 $\pm$ 0.1 <sup>A</sup>	2.7 $\pm$ 0.0 <sup>B</sup>	4.2 $\pm$ 0.2 <sup>A</sup>	28.5 $\pm$ 2.0 <sup>A</sup>	25.9 $\pm$ 0.9 <sub>AB</sub>	23.4 $\pm$ 0.2 <sup>BC</sup>	21.2 $\pm$ 0.2 <sup>C</sup>
9	2.5 $\pm$ 0.4 <sup>B</sup>	3.9 $\pm$ 0.3 <sup>A</sup>	2.3 $\pm$ 0.2 <sup>B</sup>	3.9 $\pm$ 0.4 <sup>A</sup>	23.8 $\pm$ 0.9 <sup>A</sup>	25.1 $\pm$ 0.4 <sup>A</sup>	26.7 $\pm$ 0.9 <sup>A</sup>	18.3 $\pm$ 0.7 <sup>A</sup>
18	3.3 $\pm$ 0.4 <sup>A</sup>	4.1 $\pm$ 0.6 <sup>A</sup>	2.8 $\pm$ 0.0 <sup>A</sup>	3.9 $\pm$ 0.7 <sup>A</sup>	23.8 $\pm$ 0.9 <sup>B</sup>	27.4 $\pm$ 0.7 <sup>A</sup>	22.8 $\pm$ 0.4 <sup>B</sup>	22.5 $\pm$ 0.5 <sup>B</sup>
46	2.7 $\pm$ 0.4 <sup>B</sup>	3.9 $\pm$ 0.2 <sup>A</sup>	2.6 $\pm$ 0.1 <sup>B</sup>	3.8 $\pm$ 0.1 <sup>A</sup>	29.4 $\pm$ 2.2 <sup>A</sup>	22.3 $\pm$ 1.2 <sup>B</sup>	22.2 $\pm$ 2.0 <sup>B</sup>	21.4 $\pm$ 0.6 <sup>B</sup>
Salinity Experiment								
22	6.3 $\pm$ 0.5 <sup>A</sup>	7.4 $\pm$ 0.2 <sup>A</sup>	6.2 $\pm$ 0.5 <sup>A</sup>	7.3 $\pm$ 0.1 <sup>A</sup>	49.5 $\pm$ 0.5 <sup>A</sup>	32.6 $\pm$ 1.2 <sup>B</sup>	32.6 $\pm$ 1.2 <sup>B</sup>	47.8 $\pm$ 2.0 <sup>A</sup>
46	5.7 $\pm$ 0.20 <sup>B</sup>	7.3 $\pm$ 0.2 <sup>A</sup>	6.7 $\pm$ 0.4 <sup>AB</sup>	7.8 $\pm$ 0.3 <sup>A</sup>	53.8 $\pm$ 1.6 <sup>A</sup>	49.3 $\pm$ 1.3 <sup>A</sup>	34.6 $\pm$ 2.2 <sup>B</sup>	47.7 $\pm$ 1.5 <sup>A</sup>
56	9.0 $\pm$ 0.1 <sup>A</sup>	8.5 $\pm$ 0.2 <sup>A</sup>	8.5 $\pm$ 0.2 <sup>A</sup>	8.6 $\pm$ 0.5 <sup>A</sup>	42.9 $\pm$ 2.7 <sup>A</sup>	43.0 $\pm$ 2.2 <sup>A</sup>	32.0 $\pm$ 2.1 <sup>B</sup>	51.2 $\pm$ 2.5 <sup>B</sup>

Means followed by different letters are significantly different according to the Newman-Keuls Test ( $p < 0, 05$ ).

TABLE 4. Stomatal size ( $\mu\text{m}$ ) of *Calotropis procera* leaves ( $n = 3 \pm \text{error}$ ) under drought (10% watering) and salinity (100mM NaCl) and respective controls

Drought Experiment				
Days	ADAXIAL		ABAXIAL	
	Control	Stress	Control	Stress
3	19.04 $\pm$ 0.0 <sup>A</sup>	19.53 $\pm$ 0.3 <sup>A</sup>	18.45 $\pm$ 0.0 <sup>A</sup>	19.31 $\pm$ 0.1 <sup>A</sup>
9	20.03 $\pm$ 0.2 <sup>AB</sup>	17.21 $\pm$ 0.1 <sup>C</sup>	21.33 $\pm$ 0.0 <sup>A</sup>	18.51 $\pm$ 0.0 <sup>BC</sup>
18	20.19 $\pm$ 0.0 <sup>A</sup>	17.45 $\pm$ 0.2 <sup>B</sup>	19.93 $\pm$ 0.0 <sup>A</sup>	19.32 $\pm$ 0.1 <sup>A</sup>
46	23.68 $\pm$ 0.2 <sup>A</sup>	20.18 $\pm$ 0.2 <sup>B</sup>	23.73 $\pm$ 0.1 <sup>A</sup>	19.17 $\pm$ 0.0 <sup>B</sup>
Salinity Experiment				
22	24.17 $\pm$ 0.1 <sup>A</sup>	19.40 $\pm$ 0.2 <sup>B</sup>	23.70 $\pm$ 0.2 <sup>A</sup>	19.23 $\pm$ 0.1 <sup>B</sup>
46	23.17 $\pm$ 0.0 <sup>B</sup>	20.28 $\pm$ 0.1 <sup>C</sup>	24.89 $\pm$ 0.0 <sup>A</sup>	19.749 $\pm$ 0.0 <sup>C</sup>

Means followed by different letters are significantly different according to the Newman-Keuls Test ( $p < 0, 05$ ).

## Figure legends

**Figure 1.** Experimental design to physio-anatomic measurements in plants of *Calotropis procera* subjected to drought and salinity conditions at a greenhouse. RWC – Relative water content; SM – Soil moisture; LA – Leaf area; SLA – Specific leaf area.

**Figure 2.** Gas exchanges of young plants of *Calotropis procera* ( $n= 3 \pm$  error) under drought (10% watering) e salinity (100 mM NaCl). A, B – stomatal conductance; C, D – Assimilation of CO<sub>2</sub>; e, f – Water use efficiency. Asterisk (\*) indicates that means are significantly different between treatments according to the Student's Test,  $p < 0, 05$ .

**Figure 3.** Cross-sections of leaves of *Calotropis procera* ( $n=3 \pm$  error) under drought (10% watering) and salinity (100mM NaCl) and respective controls from different collects time. Column 1 –**Mesophyll**; Column 2 – **adaxial leaf side**; Column 3 – **abaxial leaf side**. Arrows indicate epidermis and arrowheads the cuticule; Pp – Palisade parenchymma; Sp – Spongy parenchymma.

**Figure 4.** Mesophyll thickness of *Calotropis procera* leaves ( $n = 3 \pm$  error), under drought (10% watering) and salinity (100 mM NaCl) and respective controls. Means followed by different letters are significantly different according to the Newman-Keuls Test ( $p < 0, 05$ ). Lower letters indicates comparison between leaf surfaces and capital letter between treatments.

**Figure 5.** Stomatal and trichomes density of young plants of *Calotropis procera* ( $n= 3 \pm$  error) under drought (10% watering) and salinity (100 mM NaCl) and respective controls. Means followed by different letters are significantly different according to the Newman-Keuls Test ( $p < 0, 05$ ).

Figure 1

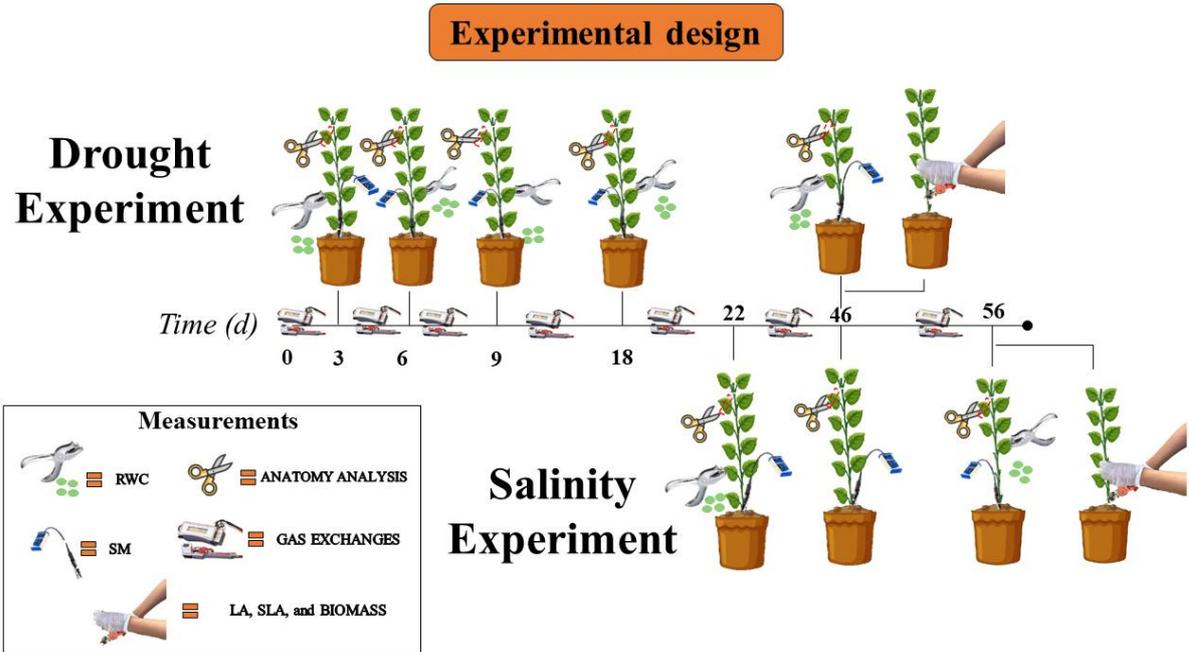


Figure 2

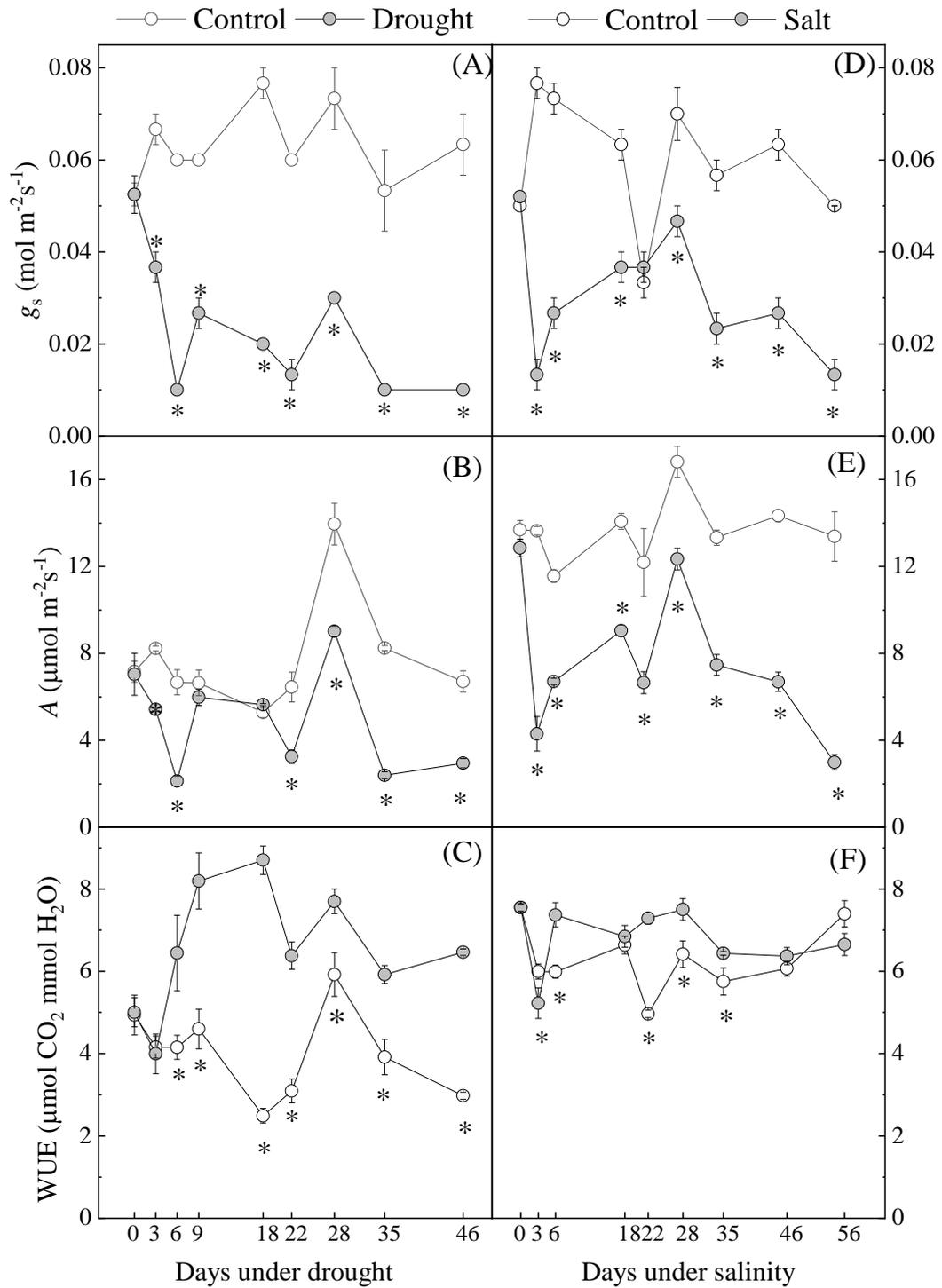


Figure 3

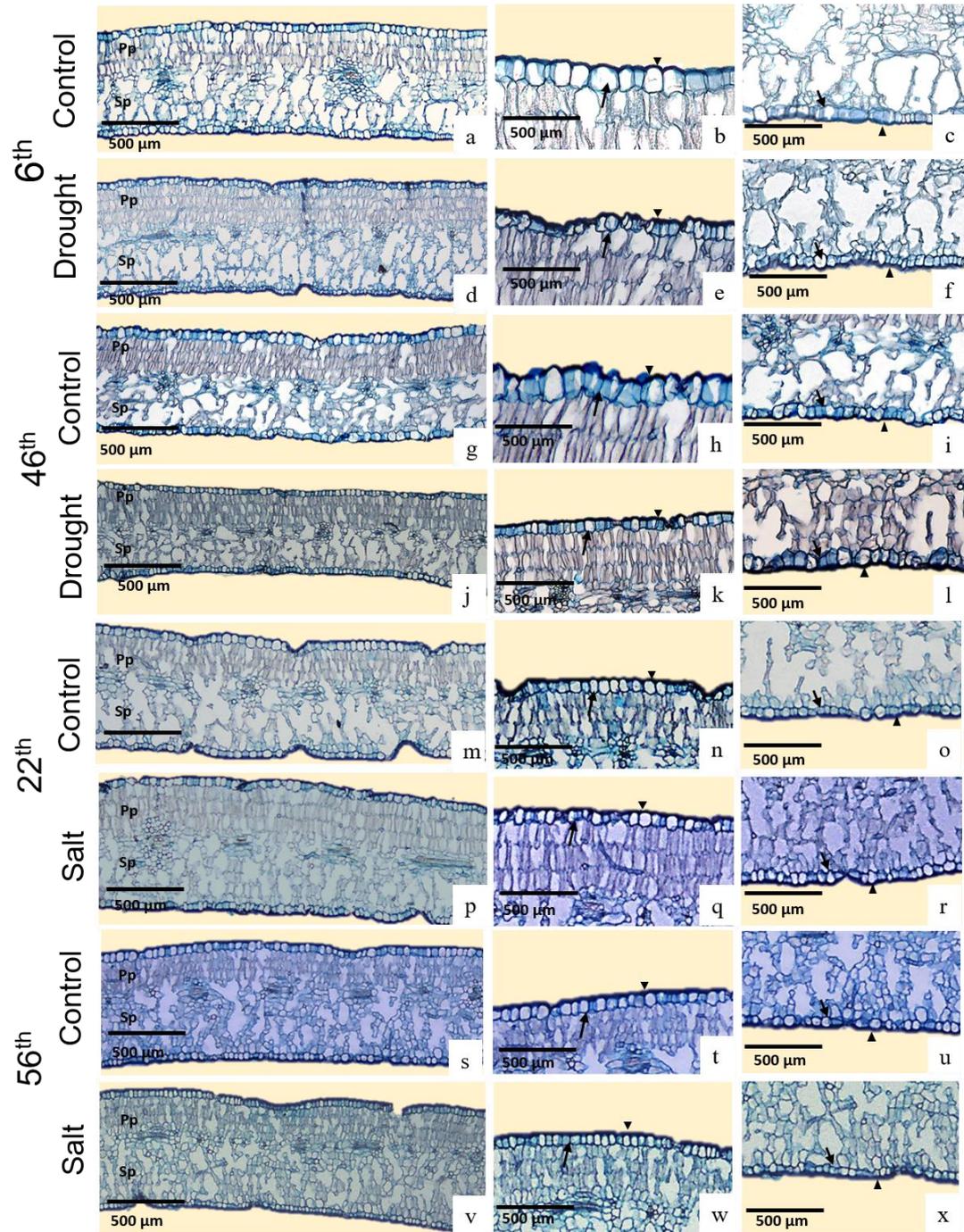


Figure 4

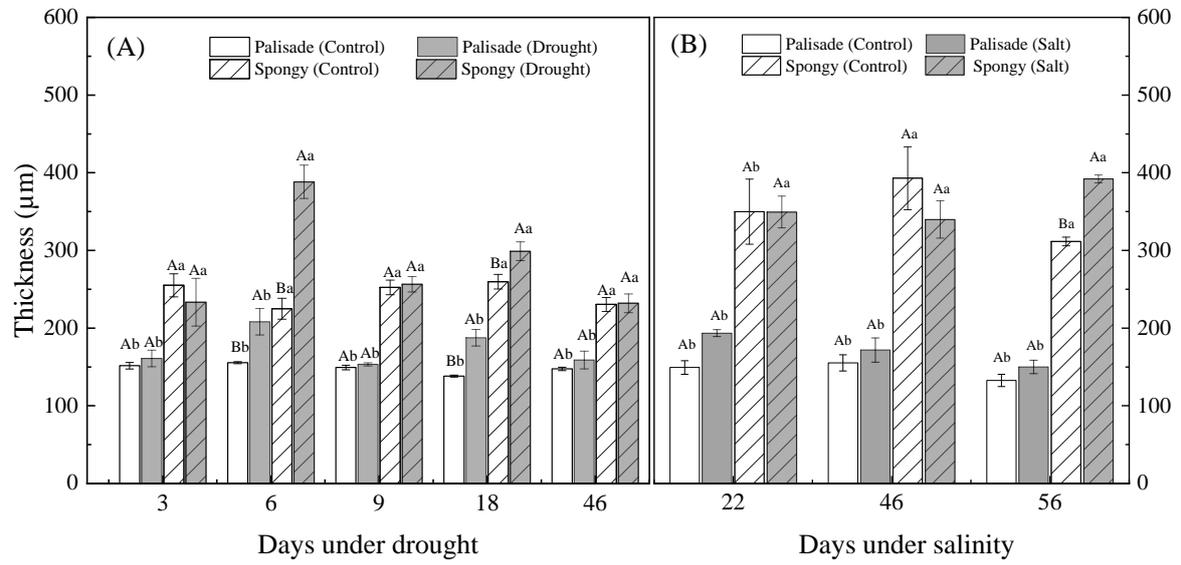
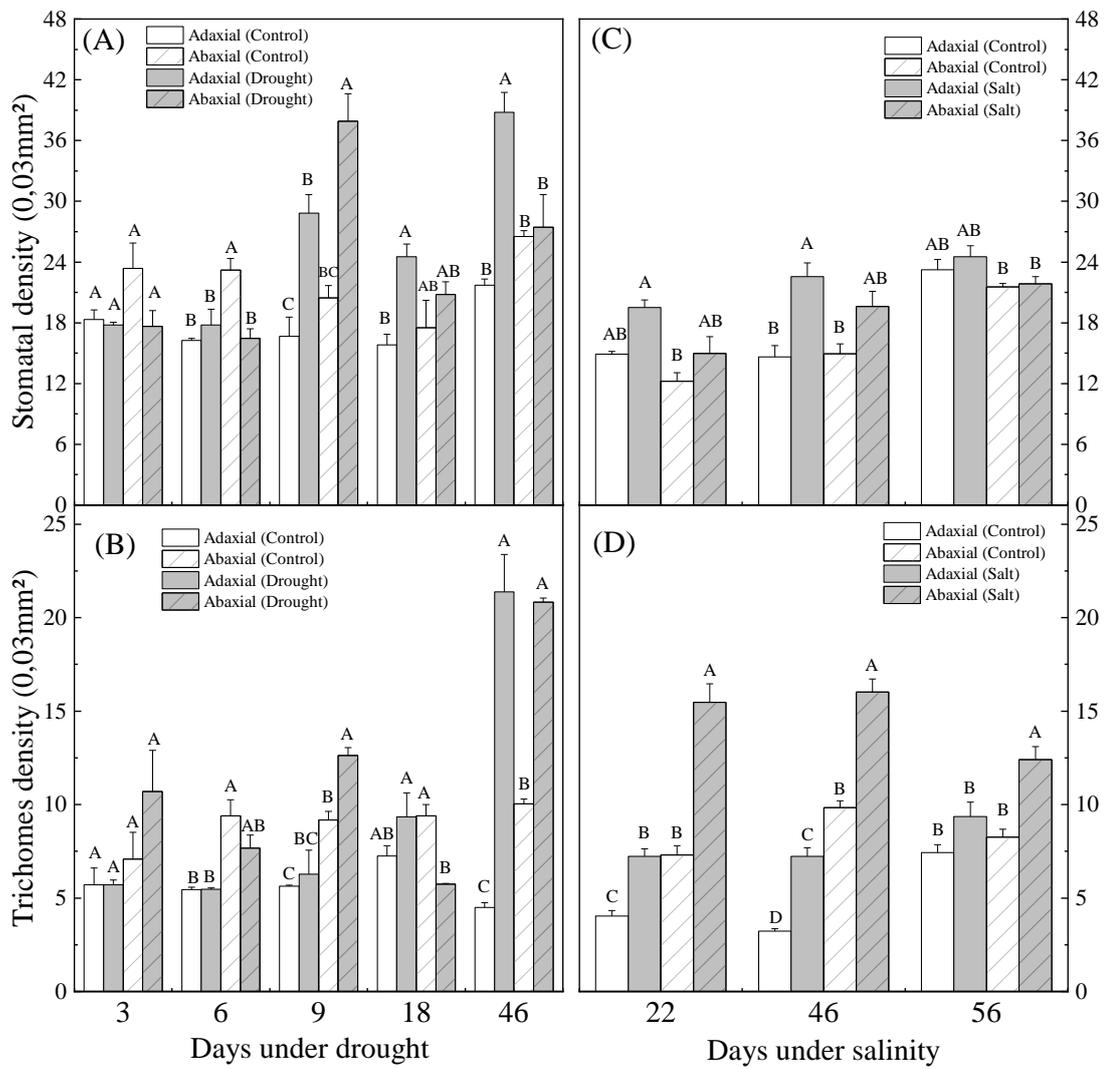
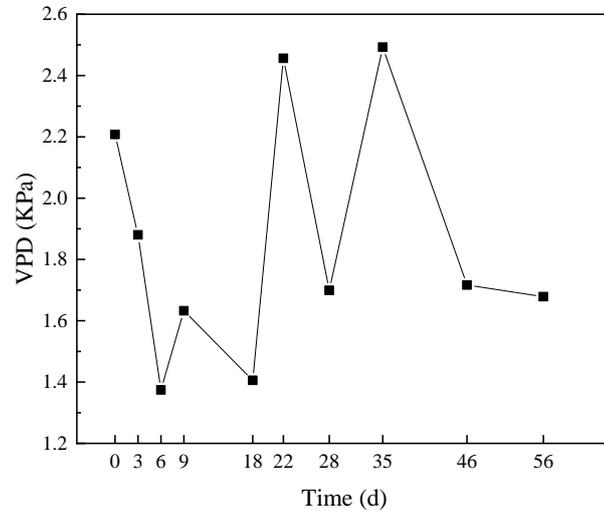


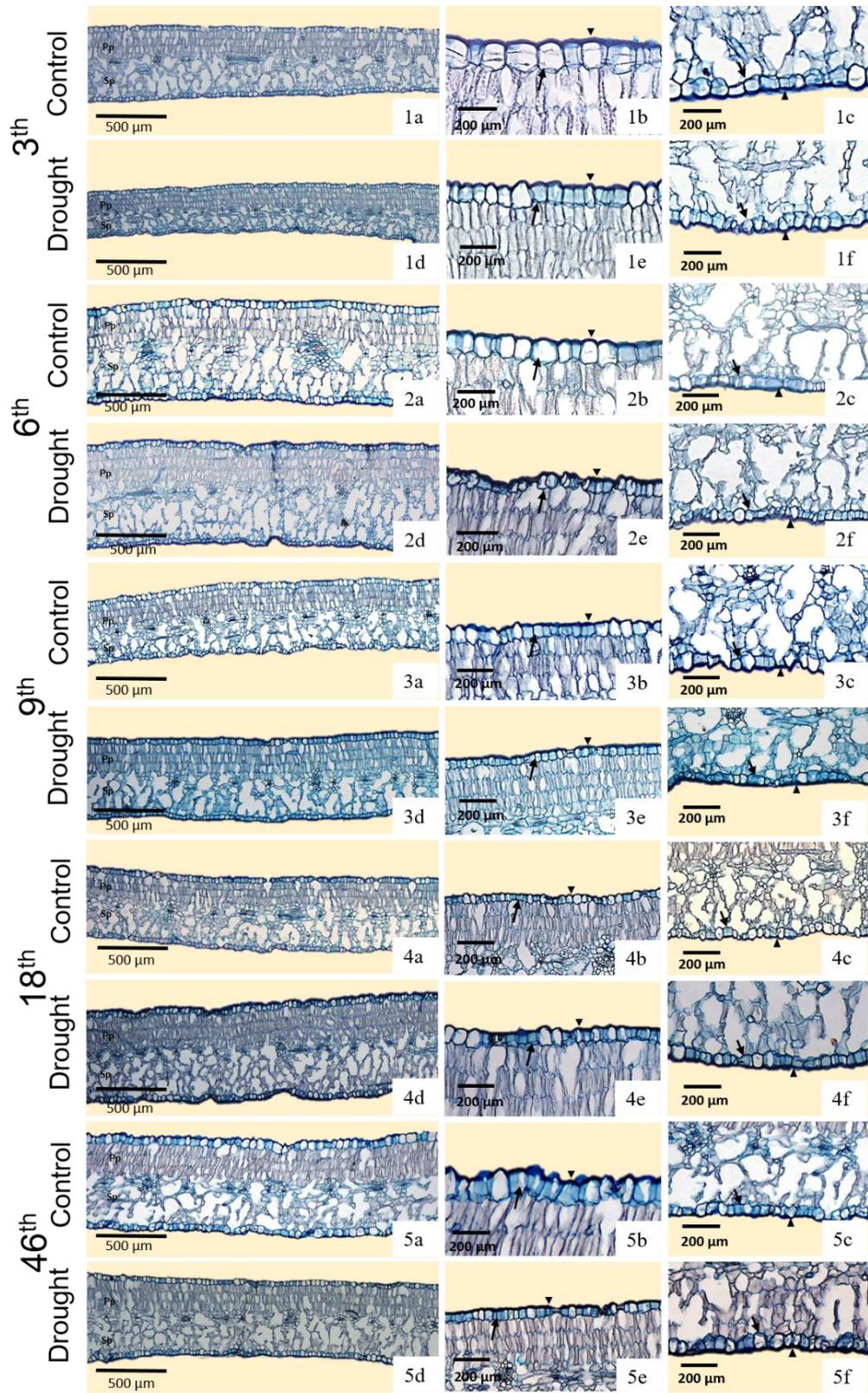
Figure 5



Supplementary figure 1



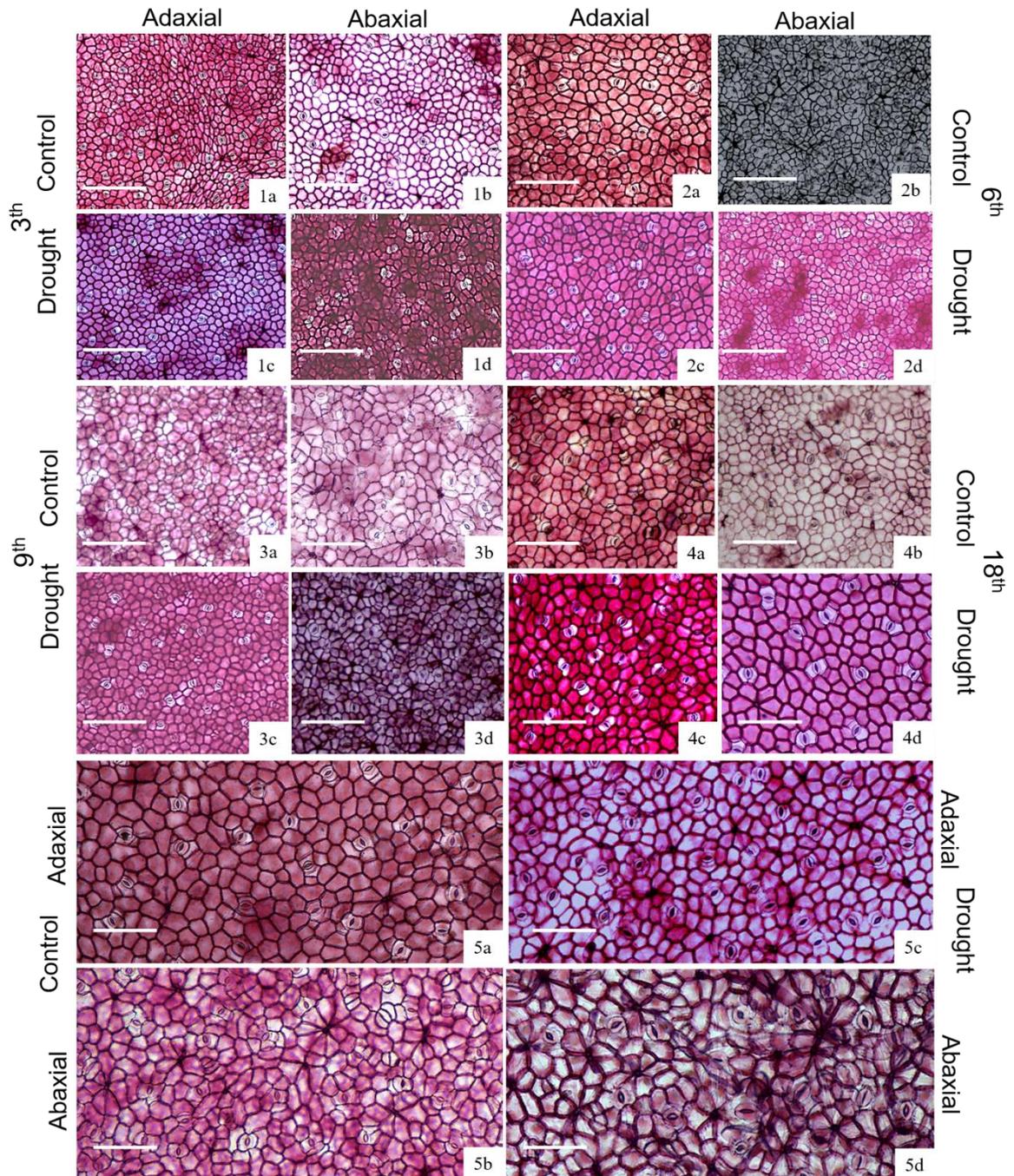
Supplementary figure 2



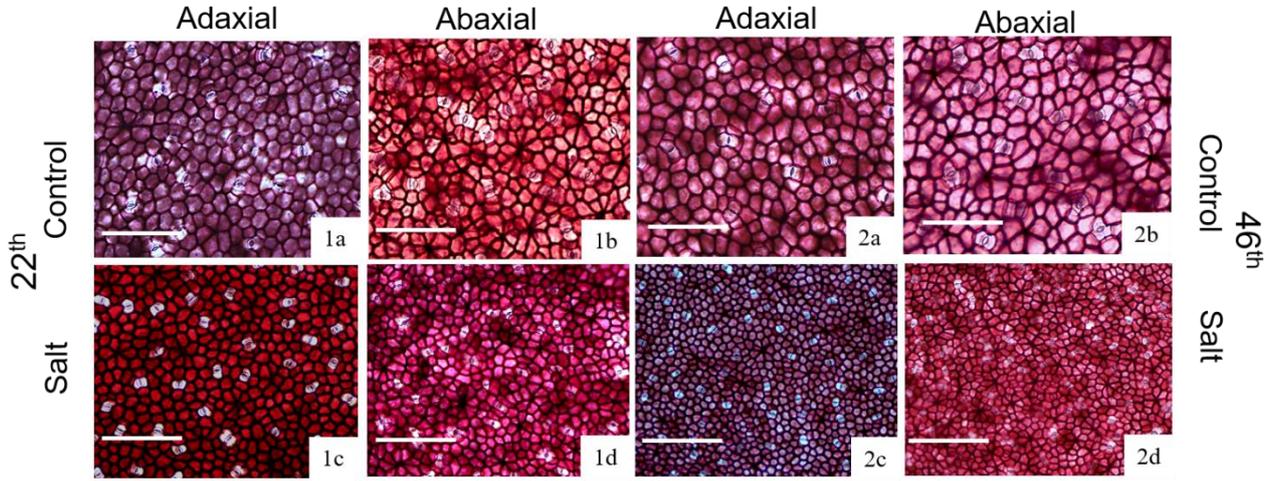
Supplementary figure 3



Supplementary figure 4

46<sup>th</sup>

Supplementary figure 5



## 5 CONCLUSÃO

Nossos resultados respondem ao questionamento inicial, e de fato ajustes anatômicos são realizados por *Calotropis procera* diante das condições estressantes, os quais constituem-se como uma estratégia que pode favorecer sua sobrevivência, desempenho diferenciado e prosperidade em ambientes desfavoráveis. Foi demonstrado que a espécie lança mão de ajustes em atributos foliares a medida que o tempo de estresse avança visando melhor ajustamento e tolerância. Os ajustes envolveram atributos que visam a melhoria no controle da transpiração tal como espessura de cutícula, e densidade de tricomas. Além disso, as plantas também ajustam a densidade de estômatos o que pode auxiliar na manutenção da taxa fotossintética mesmo diante de redução da condutância estomática. Assim, com este trabalho ampliamos o conhecimento acerca das estratégias de tolerância da espécie sempre verde *Calotropis procera* sob condições desfavoráveis de deficiência hídrica e salinidade concluindo, sobretudo, que a espécie apresenta plasticidade anatômica promovendo ajustes que ampliam sua tolerância a estresses ambientais como os impostos no presente estudo.

## REFERÊNCIAS

- ABD ELHALIM, M. E. et al. The anatomical features of the desert halophytes *Zygophyllum album* L.F. and *Nitraria retusa* (Forssk.) Asch. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 61, n. 1, p. 97–104, jun. 2016.
- ABDELRAHEEM, A. et al. Progress and perspective on drought and salt stress tolerance in cotton. **Industrial Crops and Products**, v. 130, p. 118–129, abr. 2019.
- ALBALADEJO, I. et al. Unravelling the strategies used by the wild tomato species *Solanum pennellii* to confront salt stress: From leaf anatomical adaptations to molecular responses. **Environmental and Experimental Botany**, v. 135, p. 1–12, mar. 2017.
- ARNDT, S. K. et al. Physiological and morphological adaptations of the fruit tree *Ziziphus rotundifolia* in response to progressive drought stress. **Tree Physiology**, v. 21, n. 11, p. 705–715, 1 jul. 2001.
- AULER, P. A. et al. Selection of candidate reference genes and validation for real-time PCR studies in rice plants exposed to low temperatures. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 2, 2017.
- AWAAD, A. A. et al. Anti-ulcerative colitis activity of *Calotropis procera* Linn. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, n. 1, p. 75–78, jan. 2018.
- BACELAR, E. A. et al. Sclerophylly and leaf anatomical traits of five field-grown olive cultivars growing under drought conditions. **Tree Physiology**, v. 24, n. 2, p. 233–239, 1 fev. 2004.
- BARBOSA, M. R. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453–460, mar. 2014.
- BARROS, V. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi improve photosynthetic energy use efficiency and decrease foliar construction cost under recurrent water deficit in woody evergreen species. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 127, p. 469–477, jun. 2018.
- BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and Salt Tolerance in Plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 24, n. 1, p. 23–58, 23 fev. 2005.
- BASU, S. et al. Plant adaptation to drought stress. **F1000Research**, v. 5, p. 1554, 30 jun. 2016.
- BELKHEIRI, O.; MULAS, M. The effects of salt stress on growth, water relations and ion accumulation in two halophyte *Atriplex* species. **Environmental and Experimental Botany**, v. 86, p. 17–28, fev. 2013.

BENITEZ, L. C. et al. Análise multivariada da divergência genética de genótipos de arroz sob estresse salino durante a fase vegetativa. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 2, p. 409–416, jun. 2011.

BENITEZ, L. C. et al. Correlation of proline content and gene expression involved in the metabolism of this amino acid under abiotic stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 11, p. 267, nov. 2016.

BENKO-ISEPPON, A. M. et al. Prospecção de Genes de Resistência à Seca e à Salinidade em Plantas Nativas e Cultivadas. **Revista Brasileira de Geografia Física**, p. 23, 2011.

BOSABALIDIS, A. M.; KOFIDIS, G. Comparative effects of drought stress on leaf anatomy of two olive cultivars. **Plant Science**, v. 163, n. 2, p. 375–379, ago. 2002.

COÊLHO, M. R. V. Respostas fisiológicas de *Calotropis procera* sob salinidade e expressão gênica diferencial de aquaporinas. Recife, PE: Universidade Federal De Pernambuco – UFPE, 2019. 118p. Tese de Doutorado (Doutorado em Biologia Vegetal) – Centro de Biociência / Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

CANO, F. J.; LÓPEZ, R.; WARREN, C. R. Implications of the mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> for photosynthesis and water-use efficiency during long-term water stress and recovery in two contrasting *Eucalyptus* species: Long-term water stress on mesophyll conductance. **Plant, Cell & Environment**, v. 37, n. 11, p. 2470–2490, nov. 2014.

CHARTZOULAKIS, K. et al. Water stress affects leaf anatomy, gas exchange, water relations and growth of two avocado cultivars. **Scientia Horticulturae**, v. 95, n. 1–2, p. 39–50, ago. 2002.

CHUNDATTU, S. J.; AGRAWAL, V. K.; GANESH, N. Phytochemical investigation of *Calotropis procera*. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 9, p. S230–S234, set. 2016.

DA SILVA, E. C. et al. Physiological responses to salt stress in young umbu plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 63, n. 1–3, p. 147–157, maio 2008.

DISSANAYAKE, N. P. et al. Structural and functional responses of xylem in *Rhizophora mucronata* Lam. seedlings under drought and hypersaline conditions. **Ruhuna Journal of Science**, v. 9, n. 1, p. 13, 30 jun. 2018.

ENNAJEH, M. et al. Comparative impacts of water stress on the leaf anatomy of a drought-resistant and a drought-sensitive olive cultivar. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 85, n. 4, p. 289–294, jan. 2010.

FROSI, G. et al. Ecophysiological performance of *Calotropis procera*: an exotic and evergreen species in Caatinga, Brazilian semi-arid. **Acta Physiologiae Plantarum**, 24 ago. 2012.

FROSI, G. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi and foliar phosphorus inorganic supply alleviate salt stress effects in physiological attributes, but only arbuscular mycorrhizal fungi increase biomass in woody species of a semiarid environment. **Tree Physiology**, v. 38, n. 1, p. 25–36, 1 jan. 2018.

GULZAR, A.; SIDDIQUI, M. B. Allelopathic effect of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. on growth and antioxidant activity of *Brassica oleracea* var. botrytis. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 16, n. 4, p. 375–382, out. 2017.

IBRAHIM, A. H. Tolerance and avoidance responses to salinity and water stresses in *Calotropis procera* and *Suaeda aegyptiaca*. **Turk J Agric For**, p. 10, 2013.

JALEEL, C. A. et al. Drought Stress in Plants: A Review on Morphological Characteristics and Pigments Composition. **Int. J. Agric. Biol.**, v. 11, n. 1, p. 6, 2009.

KOOYERS, N. J. The evolution of drought escape and avoidance in natural herbaceous populations. **Plant Science**, v. 234, p. 155–162, maio 2015.

LÄUCHLI, A.; GRATAN, S. R. Plant Abiotic Stress: Salt. In: **Encyclopedia of Agriculture and Food Systems**. [s.l.] Elsevier, 2014. p. 313–329.

LEAL, L. C. et al. Germination responses of the invasive *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. (Apocynaceae): comparisons with seeds from two ecosystems in northeastern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 3, p. 1025–1034, set. 2013.

LUSTOSA, B. M. et al. Strategies of two tropical woody species to tolerate salt stress. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 37, n. 89, p. 63, 31 mar. 2017.

MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: An overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 444, n. 2, p. 139–158, dez. 2005.

MUNNÉ-BOSCH, S.; ALEGRE, L. Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. **Functional Plant Biology**, v. 31, n. 3, p. 203, 2004.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of Salinity Tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, n. 1, p. 651–681, jun. 2008.

MUTWAKIL, M. Z. et al. Transcriptomic and metabolic responses of *Calotropis procera* to salt and drought stress. **BMC Plant Biology**, v. 17, n. 1, p. 231, dez. 2017.

NABI, R. B. S. et al. Nitric oxide regulates plant responses to drought, salinity, and heavy metal stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 161, p. 120–133, maio 2019.

- NOWICKA, B. et al. Improving photosynthesis, plant productivity and abiotic stress tolerance – current trends and future perspectives. **Journal of Plant Physiology**, v. 231, p. 415–433, dez. 2018.
- OLIVEIRA, S. et al. Seedling growth of the invader *Calotropis procera* in ironstone rupestrian field and seasonally dry forest soils. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 4, n. 2, p. 69–76, 24 ago. 2009.
- POLLE, A.; CHEN, S. On the salty side of life: molecular, physiological and anatomical adaptation and acclimation of trees to extreme habitats: Salt tolerance in trees. **Plant, Cell & Environment**, v. 38, n. 9, p. 1794–1816, set. 2015.
- PORCEL, R.; AROCA, R.; RUIZ-LOZANO, J. M. Salinity stress alleviation using arbuscular mycorrhizal fungi. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 32, n. 1, p. 181–200, jan. 2012.
- RAMADAN, A. et al. Metabolomic Response of *Calotropis procera* Growing in the Desert to Changes in Water Availability. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e87895, 10 fev. 2014.
- RAMALHO, M. F. DE J. L. A fragilidade ambiental do Nordeste Brasileiro: o clima semiárido e as imprevisões das grandes estiagens. **Sociedade e Território**, v. 25, n. 2, p. 104–115, 29 jul. 2013.
- RANGEL, E. DE S.; NASCIMENTO, M. T. Ocorrência de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. (Apocynaceae) como espécie invasora de restinga. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 3, p. 657–663, set. 2011.
- RIVAS, R. et al. Photosynthetic limitation and mechanisms of photoprotection under drought and recovery of *Calotropis procera*, an evergreen C3 from arid regions. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 118, p. 589–599, set. 2017.
- RIVAS, R.; OLIVEIRA, M. T.; SANTOS, M. G. Three cycles of water deficit from seed to young plants of *Moringa oleifera* woody species improves stress tolerance. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 63, p. 200–208, fev. 2013.
- ROSSI, L. et al. Salt stress modifies apoplastic barriers in olive (*Olea europaea* L.): a comparison between a salt-tolerant and a salt-sensitive cultivar. **Scientia Horticulturae**, v. 192, p. 38–46, ago. 2015.
- ROY, S. J.; NEGRÃO, S.; TESTER, M. Salt resistant crop plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 115–124, abr. 2014.
- SANTOS, M. G. et al. Caatinga, the Brazilian dry tropical forest: can it tolerate climate changes? **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 26, n. 1, p. 83–99, mar. 2014.

SCHMÖCKEL, S. M.; JARVIS, D. E. Salt Stress. In: **Encyclopedia of Applied Plant Sciences**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 40–43.

SILVA, R.R.C.A. Ecofisiologia e Anatomia de *Calotropis procera* sob estresse abiótico. Recife, PE: Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, 2016. 119p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Centro de Biociência / Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

SENNBLAD, B.; BREMER, B. Classification of Apocynaceae s.l. According to a New Approach Combining Linnaean and Phylogenetic Taxonomy. **Systematic Biology**, v. 51, n. 3, p. 389–409, 1 maio 2002.

SHAO, H.-B. et al. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331, n. 3, p. 215–225, mar. 2008.

SHARMA, P. et al. An appraisal of cuticular wax of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br.: Extraction, chemical composition, biosafety and application. **Journal of Hazardous Materials**, v. 368, p. 397–403, abr. 2019.

SILVA, M. C. C. et al. Therapeutic and biological activities of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, n. 4, p. 332–336, abr. 2010.

SIMIONE, P. F et al. Elucidating adaptive strategies from leaf anatomy: Do Amazonian savannas present xeromorphic characteristics? **Flora**, v. 226, p. 38–46, nov. 2017.

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

SREENIVASULU, N. et al. Contrapuntal role of ABA: Does it mediate stress tolerance or plant growth retardation under long-term drought stress? **Gene**, v. 506, n. 2, p. 265–273, set. 2012.

SRIVASTAVA, N.; CHAUHAN, A. S.; SHARMA, B. Isolation and Characterization of Some Phytochemicals from Indian Traditional Plants. **Biotechnology Research International**, v. 2012, p. 1–8, 2012.

TEZARA, W. et al. Water relations and photosynthetic capacity of two species of *Calotropis* in a tropical semi-arid ecosystem. **Annals of Botany**, v. 107, n. 3, p. 397–405, mar. 2011.

THOLEN, D.; BOOM, C.; ZHU, X.-G. Opinion: Prospects for improving photosynthesis by altering leaf anatomy. **Plant Science**, v. 197, p. 92–101, dez. 2012.

TOMÁS, M. et al. 2013. Importance of leaf anatomy in determining mesophyll diffusion conductance to CO<sub>2</sub> across species: quantitative limitations and scaling up by models. **Journal of Experimental Botany** v. 64, n. 8, p. 2269–2281, Abr. 2013.

TRAVLOS, I. S.; CHACHALIS, D. Drought Adaptation Strategies of Weeds and other Neglected Plants of Arid Environments. **Plant Stress**, v. 2, n. 1, p. 40 – 44. Abr. 2008.

UZILDAY, B. et al. Strategies of ROS regulation and antioxidant defense during transition from C<sub>3</sub> to C<sub>4</sub> photosynthesis in the genus *Flaveria* under PEG-induced osmotic stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, n. 1, p. 65–75, jan. 2014.

VIGHI, I. L. et al. Functional characterization of the antioxidant enzymes in rice plants exposed to salinity stress. **Biologia Plantarum**, v. 61, n. 3, p. 540–550, set. 2017.

WALTER, J. et al. Do plants remember drought? Hints towards a drought-memory in grasses. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, n. 1, p. 34–40, abr. 2011.

YILDIRIM, K.; KAYA, Z. Gene regulation network behind drought escape, avoidance and tolerance strategies in black poplar (*Populus nigra* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 115, p. 183–199, jun. 2017.

ZHENG, H. et al. Morphological and physiological responses to cyclic drought in two contrasting genotypes of *Catalpa bungei*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 138, p. 77–87, jun. 2017.

## ANEXO A

NORMAS PARA SUBMISSÃO NO PERIÓDICO *ANNALS OF BOTANY*Disponível em: [https://academic.oup.com/aob/pages/General\\_Instructions](https://academic.oup.com/aob/pages/General_Instructions)

OXFORD ACADEMIC

ANNALS OF BOTANY Founded 1887

Sign In Register

Issues More content Submit Purchase About

All Annals of Botany Advanced Search

## Information for Authors

[Introduction](#)[Publication Ethics](#)[Preparing the Article File](#)[Preparing Tables, Figure Files, Supplementary Information Files and Videos](#)[The Review Process](#)[Formatting and Submitting a Revised Paper](#)[Acceptance, Proofs, Production and Publication](#)[Formal Statement](#)[Estonian translation](#)

Please note that the journal now encourages authors to complete their copyright licence to publish form online

## Preparing the Article File

(Always consult a recent issue of *Annals of Botany* for layout and style)

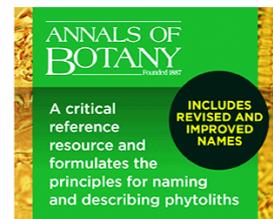
Text should be typed using size 12 Times New Roman or Courier, double-spaced throughout and with an approx. 25 mm margin. All pages should be numbered sequentially. Each line of the text should also be numbered, with the top line of each page being line 1. The article file should be in PC-compatible Microsoft Word - file type DOC [please make sure the "Language" is "English (U.K)" via Tools → Language → Set Language]. RTF files are also acceptable. Please do not use the Windows Vista DOCX format: if you have created the text in this format, please save the files as RTF before submitting them. Please do not submit PDFs, desktop publishing files or LaTeX files. The article file should include a list of any figure legends but exclude any figures themselves – these should be submitted separately, with each figure in a separate file. Tables should be included at the end of the article file, in a Word format and not embedded as an image/picture. For more details see below under PREPARING TABLE and FIGURE FILES, SUPPLEMENTARY INFORMATION FILES AND VIDEO FILES.

It is NOT journal style to have footnotes within articles. Any such notes must be incorporated into the main text, for example within brackets or as a separate paragraph.

The first page should state the type of article (e.g. Original Article, Technical Article) and provide a concise and informative full title followed by the names of all authors. Where necessary, each name should be followed by an identifying superscript number (<sup>1,2,3</sup> etc.) associated with the appropriate institutional address to be entered further down the page. For papers with more than one author, the corresponding author's name should be followed by a superscript asterisk\*. The institutional address(es) of each author should be listed next, each address being preceded by the relevant superscript number where appropriate. A running title of not more than 75 characters, including spaces, should also be provided, followed by the e-mail address of the corresponding author. Please follow the layout used for the first page of papers published in *Annals of Botany*.

The second page should contain a structured Abstract not exceeding 300 words made up of bulleted headings. For 'ORIGINAL ARTICLES' these heading will normally be as follows:

- Background and Aims
- Methods
- Key Results
- Conclusions



Latest	Most Read	Most Cited
No carbon limitation after lower crown loss in <i>Pinus radiata</i>		
Pollen on stigmas as proxies of pollinator competition and facilitation: complexities, caveats, and future directions		
Are thick leaves, large mesophyll cells and small intercellular air spaces requisites for CAM?		
Molecular control of masting: an introduction to an epigenetic summer memory		
For things to stay the same, things must change - Polyploidy and pollen tube growth rates		

