



Universidade Federal de Uberlândia  
Instituto de Biologia  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e  
Biodiversidade



**A influência do habitat e do Metabolismo Ácido das Crassuláceas (CAM) na  
absorção de água em orquídeas**

Jéssica Ferreira de Lima

Dr<sup>a</sup>. Ana Sílvia Franco Pinheiro Moreira

Orientadora

Instituto de Biologia

Dr<sup>a</sup>. Daniela Boaneres de Souza

Coorientadora

Instituto Tecnológico Vale

Uberlândia - MG

2022

Universidade Federal de Uberlândia  
Instituto de Biologia  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Biodiversidade

**A influência do habitat e do Metabolismo Ácido das Crassuláceas (CAM) na  
absorção de água em orquídeas**

Jéssica Ferreira de Lima

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial necessário para obtenção do Título de Mestre em Ecologia, Conservação e Biodiversidade.

Dr<sup>a</sup>. Ana Sílvia Franco Pinheiro Moreira  
Orientadora  
Instituto de Biologia

Dr<sup>a</sup>. Daniela Boaneres de Souza  
Coorientadora  
Instituto Tecnológico Vale

Uberlândia - MG  
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

L732i  
2022      Lima, Jéssica Ferreira de, 1996-  
            A influência do habitat e do metabolismo ácido das  
            Crassuláceas (CAM) na absorção de água em orquídeas [recurso  
            eletrônico] / Jéssica Ferreira de Lima. - 2022.

            Orientadora: Ana Sílvia Franco Pinheiro Moreira  
            Coorientadora: Daniela Boanars de Souza  
            Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia.  
            Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e  
            Biodiversidade.

            Modo de acesso: Internet.

            Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.5335>

            Inclui bibliografia.

            Inclui ilustrações.

            1. Ecologia. I. Moreira, Ana Sílvia Franco Pinheiro, 1980- (Orient.).  
            II. Souza, Daniela Boanars de, 1984-, (Coorient.). III. Universidade  
            Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ecologia,  
            Conservação e Biodiversidade. IV. Título.

---

CDU: 574

Glória Aparecida  
Bibliotecária - Documentalista - CRB-6/2047



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e  
 Biodiversidade

Av. Pará, 1720, Bloco 2D, Sala 26 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38405-320  
 Telefone: (34) 3225-8641 - www.ppgeco.ib.ufu.br - ecologia@umuarama.ufu.br



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Ecologia, Conservação e Biodiversidade				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, número 316, PPGECB				
Data:	dezenove de agosto de dois mil e vinte e dois	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	17:00
Matrícula do Discente:	12012ECR007				
Nome do Discente:	Jéssica Ferreira de Lima				
Título do Trabalho:	A influência do habitat e do Metabolismo Ácido das Crassuláceas (CAM) na absorção de água em orquídeas				
Área de concentração:	Ecologia				
Linha de pesquisa:	Ecologia vegetal				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Ecofisiologia de Plantas do Cerrado				

Reuniu-se por videoconferência a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ecologia, Conservação e Biodiversidade assim composta pelos doutores: Davi Rodrigo Rossatto - UNESP; Hildeberto Caldas de Sousa - UFOP; Ana Silvia Franco Pinheiro Moreira - INBIO/UFU orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Ana Silvia Franco Pinheiro Moreira, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando a candidata:

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Ana Silvia Franco Pinheiro Moreira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 19/08/2022, às 17:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Hildeberto Caldas de Sousa, Usuário Externo**, em 24/08/2022, às 15:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Davi Rodrigo Rossatto, Usuário Externo**, em 26/08/2022, às 15:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3778624** e o código CRC **1A40610D**.

---

Universidade Federal de Uberlândia  
Instituto de Biologia  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Biodiversidade

**A influência do habitat e do Metabolismo Ácido das Crassuláceas (CAM) na absorção  
de água em orquídeas**

Jéssica Ferreira de Lima

**COMISSÃO EXAMINADORA**

Presidente (Orientador): Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Sílvia Franco Pinheiro Moreira  
(Universidade Federal de Uberlândia – UFU)

Examinadores externos  
Prof<sup>º</sup>. Dr. Davi Rodrigo Rossatto  
(Universidade Estadual Paulista – UNESP)

Prof<sup>º</sup>. Dr. Hildeberto Caldas de Sousa  
(Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP)

Prof<sup>º</sup>. Dr. Vinicius Coelho Kuster  
(Universidade Federal de Goiás - UFG) (Suplente)

Dissertação aprovada em 19/08/2022

Uberlândia - MG

2022

*Dedico à minha mãe Luciene Souza Ferreira*

*Lima, que sempre acreditou em mim!*

## **Agradecimentos**

Agradeço à Deus, por tudo que Ele tem feito em minha vida. Por ter me dado graça, força, direção durante essa jornada, e por não ter me deixado desanimar.

Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia, ao Instituto de Biologia (INBIO/UFU) e ao Programa de Pós-graduação em Ecologia, Conservação e Biodiversidade (PPGECO/UFU) pela oportunidade e suporte durante o mestrado.

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil), pelo apoio para à realização deste trabalho. Agradeço ao Laboratório de Fisiologia Vegetal (LAFIVE), ao Laboratório de Anatomia e Desenvolvimento Vegetal (LADEVI), ao Laboratório de Morfologia Vegetal, Microscopia e Imagem (LAMOVI) e ao projeto de Pesquisa Ecológica de Longa Duração (PELD) “Impactos naturais e antrópicos sobre a biodiversidade dos ecossistemas de Cerrado na região do Triângulo Mineiro e Sudeste de Goiás” pelo suporte nas coletas e análises dos dados. Ao Centro de Isótopos Estáveis “Prof. Dr. Carlos Ducatti” e ao Prof. Dr. Vladimir Costa pelas análises isotópicas.

Agradeço ao Laboratório de Anatomia Vegetal (ICEB/UFOP) e ao Prof. Dr. Hildeberto Caldas de Sousa pelo suporte e por ter me recebido tão bem durante as coletas dos dados realizadas em Ouro Preto (MG).

Agradeço à minha orientadora, Dr<sup>a</sup>. Ana Sílvia F. P. Moreira, pela paciência, pelos conselhos e por todos os ensinamentos teóricos e práticos que foi passado durante esses anos. Obrigada pelas oportunidades que você tem me proporcionado. E à minha coorientadora, Dr<sup>a</sup>. Daniela Boaneres de Souza, que não hesitou em aceitar nosso convite, sou grata pela parceria, pela paciência, por me ajudar a entender os experimentos e a estatística (rsrsrs), e por ter me socorrido várias vezes. Sou grata a vocês pelos momentos de descontração e de boas risadas, pelos feedbacks e pelo carinho, atenção, tempo dedicados. Vocês são um exemplo profissional e pessoal para mim, por me ensinarem que todo trabalho pode ser realizado com afinco, leveza e bom humor. O amor de vocês por aquilo que fazem, seja pesquisa ou ensino, me incentiva a não desanimar e acreditar que tudo vai dar certo no final.

Ao Prof. Dr. Denis Coelho de Oliveira, pelo entusiasmo pela pesquisa, pelos conselhos, pelo auxílio durante as análises e por não deixar ninguém desanimar. Ao Prof. Dr. Vinícius Kuster, pela colaboração, pela paciência, por me ensinar a fazer lindas pranchas e esquemas (ainda estou tentando aprender...rsrs), pelos feedbacks e conselhos. Agradeço ao Denny Eduardo, pelo companheirismo nas coletas de dados no campo e em laboratório, e pelas fotos das orquídeas. Aos demais colegas e amigos de laboratório, Patrícia, Phabliny, Pedro, Roberta,



Uiara, João, Amanda e a Gizele, obrigada pelos momentos de descontração no horário do café, conselhos e risadas, e pela ajuda em algumas coletas de dados. Ao Wesley Costa Silva e Aldineia Buss, que mesmo estando longe, ainda continuam me dando apoio. Agradeço à Danielle Souto e a Ana Cristina Cirilo, por terem me recebido com tanto carinho em Ouro Preto, pela parceria nas coletas de dados em campo, e por toda a ajuda em laboratório durante o dia e de madrugada. Obrigada por terem encarado esse desafio comigo.

Agradeço aos professores que contribuíram nas análises estatísticas, Dr. Heraldo Luis de Vasconcelos e Dr. Nelson Silva Pinto. Aos demais professores que contribuíram direta e indiretamente na minha formação profissional e como pessoa.

Agradeço aos membros da banca, Prof. Dr. Davi Rodrigo Rossatto, Prof. Dr. Hildeberto Caldas de Sousa e Dr. Vinicius Coelho Kuster, por aceitarem nosso convite e pelas importantes contribuições que sem dúvidas darão a este trabalho.

Às minhas amigas de turma, minha xará Jessyca Santana, por me acompanhar no campo e no laboratório durante a madrugada, e a Ingrid Beatriz. Vocês tornaram essa jornada mais divertida e leve. Obrigada pelo convívio diário e durante as disciplinas. Espero que todos os sonhos de vocês se tornem realidade.

Agradeço à minha família, por sempre estar do meu lado me dando apoio e me incentivando a continuar buscando os meus sonhos. As minhas melhores amigas, Bruna, Tamires, Maria Eduarda e Maria Antônia, por sempre torcerem por mim. As minhas amigas de apartamento, Ana Adélia, Julia e Isabella, por terem me acolhido e me fazerem sentir em casa.

À vocês, que contribuíram para à realização desse trabalho, muito obrigada!!!

## SUMÁRIO

Resumo .....	11
Abstract.....	12
Introdução geral .....	13
Referências.....	19
Capítulo 1: Do CAM metabolism and habitat influence foliar water uptake in orchids? .....	27
Resumo .....	27
Abstract.....	28
Introduction.....	29
Materials and methods .....	31
<i>Study Material</i> .....	31
<i>Measuring foliar water uptake (FWU)</i> .....	33
<i>Determination of photosynthetic metabolism</i> .....	34
<i>Determination of saturation water content, relative water content, and specific leaf mass</i> .....	35
<i>Data analyses</i> .....	36
Results.....	37
<i>Foliar water uptake and structural variations in relation to habitat</i> .....	37
<i>Foliar water uptake and structural characteristics in relation to photosynthetic metabolism</i> .....	38

<i>Foliar water uptake and structural characteristics</i> .....	41
Discussion.....	44
<i>Foliar water uptake in relation to habitat and the structural characteristics of the leaves</i> .....	45
<i>Foliar water uptake in relation to the types of photosynthetic metabolism</i> .....	47
<i>Leaf structural characteristics and FWU</i> .....	48
Capítulo 2: Hábito aéreo e terrestre das raízes adventícias da hemiepífita <i>Vanilla phaeantha</i> (Orchidaceae) afeta a composição de epitopos da parede celular ao longo da maturação celular.....	66
Resumo .....	66
Abstract.....	67
Introdução .....	68
Material e métodos.....	71
<i>Área de estudo e espécie vegetal</i> .....	71
<i>Análises imunocitoquímicas</i> .....	73
Resultados.....	75
<i>Mobilização dos compostos da parede celular durante a maturação</i> .....	79
<i>Composição da parede celular em relação ao hábito aéreo e terrestre</i> .....	81
Discussão .....	87
<i>Composição da parede celular em relação ao hábito aéreo e terrestre</i> .....	87
<i>Composição da parede celular em relação a maturação</i> .....	91
Conclusão.....	93

Referências.....	94
Considerações finais .....	104

## Resumo

O sucesso adaptativo das orquídeas em diferentes habitats deve-se ao desenvolvimento de estratégias morfológicas e fisiológicas que promovem maior eficiência do uso da água. Dentre estas estratégias, podemos citar a suculência foliar, a absorção foliar de água (*Foliar water uptake* - FWU) e a expressão Metabolismo Ácido das Crassuláceas (CAM). Além disso, as raízes aéreas podem maximizar a absorção de água e nutrientes, processos que podem ser relacionados com a presença de um velame e a composição de sua parede celular. Diante disso, hipotetizamos no Capítulo 1 que a FWU pode ser uma estratégia para aquisição de água pelas orquídeas epífitas e rupícolas devido à baixa disponibilidade hídrica nestes ambientes, e que o metabolismo CAM aumentaria ainda mais a taxa de absorção de água por estas plantas. Para testar esta hipótese, avaliamos a capacidade de FWU e verificamos variações entre os habitats epifítico, rupícola e terrestre, e entre o metabolismo C3 e CAM em 16 espécies de orquídeas. Descobrimos que a absorção foliar de água pode ser uma estratégia desenvolvida pelas orquídeas, e possui relação com características estruturais das folhas. As espécies rupícolas apresentaram maior FWU, porém esta estratégia de absorção de água não foi favorecida pelo metabolismo CAM. Já no Capítulo 2, levantamos como hipótese que as raízes aéreas e terrestres de *Vanilla phaeantha* podem apresentar características da parede celular que contribuem com seu papel em cada ambiente, bem como entender como ocorrem modificações em sua estrutura durante seu desenvolvimento. Para verificar as alterações na composição da parede celular das raízes de *V. phaeantha* foram realizadas análises imunocitoquímicas utilizando anticorpos monoclonais que marcam epitopos de proteínas, hemiceluloses e pectinas. Descobrimos que a composição da parede celular das raízes aéreas (livres e aderidas ao forófito) e terrestres (fixadas no solo) de *V. phaeantha* se altera em resposta ao ambiente, o que conseqüentemente reflete na função exercida por essas raízes. Em síntese, a absorção foliar de água provavelmente está relacionada com as condições do habitat e os traços morfológicos das folhas associados ao uso da água, e ajuda as orquídeas a enfrentar eventos de seca. As raízes aéreas de *V. phaeantha* apresentaram uma maior complexidade e presença de pectinas, favorecendo o influxo de água e nutrientes. Nossos resultados fornecem novas perspectivas para compreender as estratégias relacionadas ao uso da água apresentadas pelas orquídeas em seus órgãos vegetativos para lidar com as condições do ambiente.

**Palavras-chave:** absorção foliar de água; epífitas; estresse hídrico; imunocitoquímica; parede celular; plantas CAM

## Abstract

The adaptive success of orchids in different habitats is due to the development of morphological and physiological strategies that promote greater efficiency in water use. Among these strategies, we can mention foliar succulence, foliar water uptake (FWU), and the expression Crassulacean Acid Metabolism (CAM). Furthermore, aerial roots can maximize the absorption of water and nutrients, processes that can be related to the presence of a canopy and the composition of its cell wall. Therefore, we hypothesized in Chapter 1 that FWU may be a strategy for water acquisition by epiphytic and rupicolous orchids due to the low water availability in these environments and that CAM metabolism would further increase the rate of water absorption by these plants. To test this hypothesis, we evaluated the capacity of FWU and verified variations between epiphytic, rupicolous, and terrestrial habitats, and between C3 and CAM metabolism in 16 orchid species. We found that foliar water uptake may be a strategy developed by orchids, and is related to the structural characteristics of leaves. The rupicolous species showed higher FWU, but this water absorption strategy was not favored by CAM metabolism. In Chapter 2, we hypothesized that the aerial and terrestrial roots of *Vanilla phaeantha* may present cell wall characteristics that contribute to their role in each environment, as well as understand how changes in their structure occur during their development. To verify the alterations in the composition of the cell wall of the roots of *V. phaeantha*, immunocytochemical analyzes were performed using monoclonal antibodies that mark epitopes of proteins, hemicelluloses, and pectin. We found that the cell wall composition of aerial (free and attached to the phorophyte) and terrestrial (fixed to the soil) roots of *V. phaeantha* changes in response to the environment, which consequently reflects on the function performed by these roots. In summary, the foliar water uptake is likely related to habitat conditions and leaf morphological traits associated with water use and helps orchids cope with drought events. The aerial roots of *V. phaeantha* showed greater complexity and presence of pectin, favoring the influx of water and nutrients. Our results provide new perspectives to understand the water use strategies presented by orchids in their vegetative organs to deal with environmental conditions.

**Keywords:** foliar water uptake; epiphytes; hydric stress; immunocytochemistry; cell wall; CAM plants

## Introdução geral

As orquídeas estão presentes em habitats com as mais diversas condições ambientais, podendo ser descritas como epífitas, rupícolas e terrestres (Black 1973; Williams-Linera *et al.* 1995; Swarts e Dixon 2009; Zhang *et al.* 2015a). Ao contrário das espécies terrestres que possuem acesso à água disponível no solo, as epífitas e rupícolas dependem de fontes atmosféricas deste recurso (Kress 1986; Benzing 1990). Por isso, plantas epífitas estão sujeitas à maiores flutuações na disponibilidade de água e nutrientes, enquanto as plantas rupícolas crescem expostas a intensa irradiação solar, altas temperaturas, ventos fortes e escassez hídrica e nutricional (Benzing 1990; Burke 2002). Dentre esses fatores, para ambos os grupos, o maior desafio é a escassez de água, refletindo no desenvolvimento de estruturas adaptativas e estratégias fisiológicas que maximizam o uso de água (Withner 1959; Benzing 1990; Scatena e Nunes 1996; Zotz e Hietz 2001; Laube e Zotz 2003). Como exemplo, pode ser observado um sistema radicular especializado constituído por raízes adventícias, cujas raízes aéreas possuem a função de absorção de água e minerais graças à presença de tecidos especializados, como o velame (Benzing 1990; Black 1973).

O velame é uma epiderme múltipla constituída por células mortas na maturidade, que permite a rápida absorção de água e nutrientes (Benzing 1990; Zotz e Winkler 2013). Em raízes aéreas de orquídeas, a presença de pectinas na parede celular das células pode proporcionar estabilidade, sustentação mecânica e favorecer a absorção de água e nutrientes pelo velame (Joca *et al.* 2020; Lana *et al.* 2020). Durante o desenvolvimento das raízes, a composição pética da parede celular também pode ser alterada (Joca *et al.* 2020; Lana *et al.* 2020). Nas raízes jovens de *Cattleya* (Orchidaceae), a parede primária apresenta deposição de pectinas homogalacturonanos (HGs) de alta metilesterificação, enquanto nos tecidos maduros são predominantes as formas pouco metilesterificadas (Lana *et al.* 2020). As proteínas arabinogalactanas, por exemplo, podem auxiliar no alongamento e na expansão das células ao

longo do desenvolvimento das raízes (Willats e Knox 1996). As condições do ambiente parecem moldar a estrutura das raízes, fazendo com que as raízes de orquídeas apresentem estruturas adaptativas relacionadas a aquisição de água e nutrientes (Moreira *et al.* 2013; Thangavelu e Ayyasamy 2017). Em *Acampe praemorsa* (Orchidaceae), por exemplo, as raízes aéreas em resposta a baixa disponibilidade de água apresentaram características anatômicas adaptativas, como a presença do velame, enquanto as raízes em contato com o substrato desenvolveram pelos radiculares para absorção de água e nutrientes (Thangavelu e Ayyasamy 2017).

Outra estratégia, são folhas mais suculentas relacionadas ao armazenamento de água e ao Metabolismo Ácido das Crassuláceas (CAM) (Cushman 2001; Zotz e Bader 2009; Zhang *et al.* 2015b). O metabolismo CAM, é uma adaptação fotossintética cuja eficiência do uso da água é maior do que as outras vias fotossintéticas, pois a fixação do dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) ocorre durante a noite, quando a perda de água por transpiração é mínima (Winter *et al.* 2005). Nas plantas CAM, durante a noite os estômatos se abrem e o CO<sub>2</sub> atmosférico é capturado via fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPcase), sendo armazenado nos vacúolos geralmente sob a forma de ácidos orgânicos (principalmente malato). De manhã, o malato é descarboxilado pela enzima NADP-málica e o CO<sub>2</sub> liberado é fornecido ao ciclo de Calvin-Benson através da atividade carboxilase da Rubisco, quando é incorporado a compostos orgânicos (Cushman 2001). Visto que, os ácidos orgânicos produzidos durante a noite são armazenados no vacúolo das células (Griffiths *et al.* 1986; Cushman 2001; Moreira *et al.* 2009), a expressão do metabolismo CAM, além de economizar água, pode auxiliar na absorção de água. Nestes casos, o acúmulo de ácidos orgânicos nos vacúolos durante a noite pode diminuir o potencial osmótico da folha, e conseqüentemente seu potencial hídrico, aumentando a probabilidade de captação de água (Herrera *et al.* 2008).



Outro processo que ajuda as epífitas vasculares a enfrentar melhor o déficit hídrico presente no ambiente é a absorção foliar de água (em inglês *foliar water uptake* - FWU) (Gotsch *et al.* 2015; Pan *et al.* 2021). A FWU já foi demonstrada em diversos ecossistemas e várias espécies (Breshears *et al.* 2008; Limm *et al.* 2009; Goldsmith *et al.* 2013; Eller *et al.* 2013, 2016; Cassana *et al.* 2015; Boanares *et al.* 2019), incluindo orquídeas epífitas (Pan *et al.* 2021). A FWU ocorre em resposta a um gradiente de potencial de hídrico, gerado pela diferença de pressão de vapor entre a atmosfera e o interior da folha, fazendo com que a água ultrapasse a superfície da folha e promova a hidratação dos tecidos foliares (Burgess e Dawson 2004). Essa entrada de água pelas folhas promove uma série de vantagens para a planta, tais como o aumento na eficiência no uso da água, especialmente em ambientes sazonalmente secos, onde além da chuva, a água é fornecida por névoa, neblina e orvalho (Limm *et al.* 2009; Limm e Dawson 2010; Goldsmith *et al.* 2013; Boanares *et al.* 2019; Oliveira *et al.* 2014; Vesala *et al.* 2017; Berry *et al.* 2019).

As possíveis vias de entrada da água nas folhas são a cutícula (Ritpitakphong *et al.* 2016; Gui *et al.* 2021), tricomas (Schreel *et al.* 2020; Gui *et al.* 2021), hidatódios (Martin e von Willert 2000), e pelos estômatos (Guzmán-Delgado *et al.* 2021). Além da presença dessas características anatômicas, a composição química da parede celular também pode influenciar na FWU (Eller *et al.* 2016; Schreel *et al.* 2020; Boanares *et al.* 2018). Por exemplo, a presença de algumas pectinas na parede celular das folhas pode aumentar a porosidade da parede, e consequentemente, aumentar a capacidade de absorção foliar de água (Boanares *et al.* 2018; Schreel *et al.* 2020). Já nas raízes, alterações na disposição da celulose e composição dos elementos não celulósicos da parede celular influenciam na permeabilidade, absorção e no armazenamento de água (Albersheim *et al.* 1996; Joca *et al.* 2017, 2020).

Diante disso, esta dissertação teve como principal objetivo avaliar diferentes estratégias de absorção de água por orquídeas. Ela foi dividida em 2 capítulos. Levantamos como hipótese

no **capítulo 1**, que a FWU pode ser uma interessante estratégia para aquisição de água pelas orquídeas que crescem como epífitas e rupícolas, uma vez que estes ambientes impõem restrições como baixa disponibilidade hídrica. Acreditamos que o metabolismo CAM pode levar à uma maior taxa de absorção de água, uma vez que este metabolismo promove o acúmulo de ácidos orgânicos durante o período noturno com consequente redução do potencial hídrico foliar no período da manhã. Neste capítulo, utilizamos 16 espécies de orquídeas que crescem como epífitas, rupícolas e terrestres (Fig. 1).



**Figura 1:** Algumas espécies epífitas (A-C), rupícolas (D-G) e terrestres (H-K) utilizadas para comparar a absorção foliar de água. (A) *Cattleya forbesii*, (B) *Vanilla phaeantha*, (C) *Prosthechea pachysepala*, (D) *Gomesa warmingii*, (E) *Bulbophyllum weddellii*, (F) *Bifrenaria harrisoniae*, (G) *Prosthechea vespa*, (H) *Epistephium sclerophyllum*, (I) *Habenaria glazioviana*, (J) *Eulophia alta*, e (K) *Oeceoclades maculata*. (Fotos: Jéssica F.; Aldineia Buss; Ana Sílvia Moreira; Danielle Souto e Ana Cristina Cirilo)

O **capítulo 2** traz uma outra abordagem, onde as raízes protagonizam como principal órgão de absorção de água. Como modelo de estudo utilizamos *Vanilla phaeantha* Rchb.f.

(Orchidaceae), uma espécie que apresenta raízes aéreas que crescem livres, fixadas ao forófito ou diretamente no solo (raízes terrestres) (Fig. 2). Em trabalho anterior (Lima e Moreira 2022), mostramos que estas raízes possuem diferenças estruturais que afetam seus traços fisiológicos e que podem interferir nas taxas de absorção de água. Aqui, levantamos como hipótese que estes três diferentes tipos de raízes além de anatomicamente diferentes, podem apresentar características da parede celular que contribuem com seu papel em cada ambiente, bem como entender como ocorrem modificações em sua estrutura durante seu desenvolvimento.





**Figura 2:** *Vanilla phaeantha* encontrada em mata de galeria na região de Araguari. Visão geral mostrando o crescimento da hemiepífita sobre o forófito (A). Detalhe das raízes aéreas que crescem livres (B), fixadas ao forófito (C) ou diretamente no solo (raízes terrestres) (D) (setas). (Fotos: Jéssica Ferreira)

### Referências

Albersheim P, Darvill AG, O'Neill MA, Schols HA, Voragen AGJ (1996) An hypothesis: the same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants. In 'Pectins and Pectinases.' (Eds J Visser, AGJ Voragen) pp. 47-53. (Elsevier Sciences B.V.:

- Amsterdam). [https://doi.org/10.1016/S0921-0423\(96\)80245-0](https://doi.org/10.1016/S0921-0423(96)80245-0)
- Benzing DH (1990) 'Vascular epiphytes: general biology and related biota.' (Cambridge University Press: UK). <https://doi.org/10.1017/CBO9780511525438>
- Berry ZC, Emery NC, Gotsch SG, Goldsmith GR (2019) Foliar water uptake: processes, pathways, and integration into plant water budgets. *Plant, Cell & Environment* **42**, 410-423. <https://doi.org/10.1111/pce.13439>
- Black PM (1973) Orquídeas. (Ed. Ao Livro Técnico S/A).(Brasil: Rio de Janeiro).
- Boanares D, Ferreira BG, Kozovits AR, Sousa HC, Isaias RMS, França MGC (2018) Pectin and cellulose cell wall composition enables different strategies to leaf water uptake in plants from tropical fog mountain. *Plant Physiology and Biochemistry* **122**, 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.11.005>
- Boanares D, Kozovits AR, Lemos-Filho JP, Isaias RMS, Solar RRC, Duarte AA, França MGC (2019) Foliar water-uptake strategies are related to leaf water status and gas exchange in plants from a ferruginous rupestrian field. *American Journal of Botany* **106**, 935-942. <https://doi.org/10.1002/ajb2.1322>
- Breshears DD, McDowell NG, Goddard KL, Dayem KE, Martens SN, Meyer CW, Brown KM (2008) Foliar absorption of intercepted rainfall improves woody plant water status most during drought. *Ecology* **89**, 41–47. <https://doi.org/10.1890/07-0437.1>
- Burgess SSO, Dawson TE (2004) The contribution of fog to the water relations of *Sequoia sempervirens* (D. Don): foliar uptake and prevention of dehydration. *Plant, Cell & Environment* **27**, 1023-1034. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2004.01207.x>
- Burke A (2002) Island–matrix relationships in Nama Karoo inselberg landscapes Part II: Are some inselbergs better sources than others? *Plant Ecology* **158**, 41–48.

- Cassana FF, Eller CB, Oliveira RS, Dillenburg LR (2015). Effects of soil water availability on foliar water uptake of *Araucaria angustifolia*. *Plant and Soil* **399**, 147–157. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2685-0>
- Cushman JC (2001) Crassulacean Acid Metabolism: a plastic photosynthetic adaptation to arid environments. *Plant Physiology* **127**, 1439–1448. <https://doi.org/10.1104/pp.010818>
- Eller CB, Lima AL, Oliveira RS (2013) Foliar uptake of fog water and transport belowground alleviates drought effects in the cloud forest tree species, *Drimys brasiliensis* (Winteraceae). *New Phytologist* **199**, 151–162. <https://doi.org/10.1111/nph.12248>
- Eller CB, Lima AL, Oliveira RS (2016) Cloud forest trees with higher foliar water uptake capacity and anisohydric behavior are more vulnerable to drought and climate change. *New Phytologist* **211**, 489–501. <https://doi.org/10.1111/nph.13952>
- Goldsmith GR, Matzke NJ, Dawson TE (2013) The incidence and implications of clouds for cloud forest plant water relations. *Ecology Letters* **16**, 307–314. <https://doi.org/10.1111/ele.12039>
- Gotsch SG, Nadkarni N, Darby A, Glunk A, Dix M, Davidson K, Dawson T (2015) Life in the treetops: ecophysiological strategies of canopy epiphytes in a tropical montane cloud forest. *Ecological Monographs* **85**, 393–412. <https://doi.org/10.1890/14-1076.1>
- Griffiths H, Lüttge Ü, Stimmel KH, Crook CE, Griffiths NM, Smith JAC (1986) Comparative ecophysiology of CAM and C3 bromeliads. III. Environmental influences on CO<sub>2</sub> assimilation and transpiration. *Plant, Cell & Environment* **9**, 385–393. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1986.tb01752.x>
- Gui Z, Li L, Qin S, Zhang Y (2021) Foliar water uptake of four shrub species in a semi-arid desert. *Journal of Arid Environments* **195**, 104629. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2021.104629>

- Guzmán-Delgado P, Mason Earles J, Zwieniecki MA (2018) Insight into the physiological role of water absorption via the leaf surface from a rehydration kinetics perspective. *Plant, Cell & Environment* **41**, 1886-1894. <https://doi.org/10.1111/pce.13327>
- Herrera A, Ballestrini C, Tezara W (2008) Nocturnal sap flow in the C3-CAM species, *Clusia minor*. *Trees* **22**, 491–497. <https://doi.org/10.1007/s00468-008-0209-8>
- Joca TAC, Oliveira DC de, Zotz G, Winkler U, Moreira ASFP (2017) The velamen of epiphytic orchids: Variation in structure and correlations with nutrient absorption. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **230**, 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2017.03.009>
- Joca TAC, de Oliveira DC, Zotz G, Cardoso JCF, Moreira ASFP (2020) Chemical composition of cell walls in velamentous roots of epiphytic Orchidaceae. *Protoplasma* **257**(1), 103-118. <https://doi.org/10.1007/s00709-019-01421-y>
- Kress JW (1986) The systematic distribution of vascular epiphytes: an update. In 'Vascular plants as epiphytes'. pp. 234-261. (Springer: Berlin, Heidelberg). [https://doi.org/10.1007/978-3-642-74465-5\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-642-74465-5_9)
- Lana LG, Silva AFDM, Buss A, Oliveira DCD and Moreira ASFP (2020) Early development of epiphytic roots: perspectives based on the composition of the velamen cell wall. *Acta Botanica Brasílica* **34**, 633-644. <https://doi.org/10.1590/0102-33062020abb0140>
- Laube S, Zotz G (2003) Which abiotic factors limit vegetative growth in a vascular epiphyte? *Functional Ecology* **17**, 598-604. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.2003.00760.x>
- Lima JF, Moreira ASFP (2022) Structural plasticity in roots of the hemiepiphyte *Vanilla phaeantha* Rchb.f. (Orchidaceae): a relationship between environment and function. *The Science of Nature* **109**, 46. <https://doi.org/10.1007/s00114-022-01816-7>



- Limm EB, Dawson TE (2010) *Polystichum munitum* (Dryopteridaceae) varies geographically in its capacity to absorb fog water by foliar uptake within the redwood forest ecosystem. *American Journal of Botany* **97**(7), 1121-1128. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000081>
- Limm EB, Simonin KA, Bothman AG, Dawson TE (2009) Foliar water uptake: a common water acquisition strategy for plants of the redwood forest. *Oecologia* **161**, 449-459. <https://doi.org/10.1007/s00442-009-1400-3>
- Martin CE, von Willert DJ (2000) Leaf epidermal hydathodes and the ecophysiological consequences of foliar water uptake in species of *Crassula* from the Namib Desert in southern Africa. *Plant Biology* **2**, 229-242. <https://doi.org/10.1055/s-2000-9163>
- Moreira ASFP, Lemos-Filho JP, Zotz G, Isaias RMS (2009) Anatomy and photosynthetic parameters of roots and leaves of two shade-adapted orchids, *Dichaea cogniauxiana* Shltr. and *Epidendrum secundum* Jacq. *Flora* **204**, 604-611. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2008.08.003>
- Moreira ASFP, de Lemos Filho JP, dos Santos Isaias RM (2013) Structural adaptations of two sympatric epiphytic orchids (Orchidaceae) to a cloudy forest environment in rocky outcrops of Southeast Brazil. *Revista de Biología Tropical* **61**, 1053-1065.
- Pan ZL, Guo W, Zhang YJ, Schreel JD, Gao JY, Li YP, Yang SJ (2021) Leaf trichomes of *Dendrobium* species (epiphytic orchids) in relation to foliar water uptake, leaf surface wettability, and water balance. *Environmental and Experimental Botany* **190**, 104568. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104568>
- Ritpitakphong U, Falquet L, Vimoltust A, Berger A, Métraux JP, L'Haridon F (2016) The microbiome of the leaf surface of *Arabidopsis* protects against a fungal pathogen. *New Phytologist* **210**(3), 1033-1043. <https://doi.org/10.1111/nph.13808>
- Oliveira RS, Christoffersen BO, Barros FV, Teodoro GS, Bittencourt P, Brum-Jr MM, Viani RAG (2014) Changing precipitation regimes and the water and carbon economies of trees.

*Theoretical and Experimental Plant Physiology* **26**, 65–82.

<https://doi.org/10.1007/s40626-014-0007-1>

Scatena VL, Nunes AC (1996) Anatomia de “*Pleurothallis rupestris*” Lindl. (Orchidaceae) dos campos rupestres do Brasil. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* **15**, 35-43.

Schreel JD, Leroux O, Goossens W, Brodersen C, Rubinstein A, Steppe K (2020) Identifying the pathways for foliar water uptake in beech (*Fagus sylvatica* L.): a major role for trichomes. *The Plant Journal* **103**(2), 769-780. <https://doi.org/10.1111/tpj.14770>

Swarts ND, Dixon KW (2009) Perspectives on orchid conservation in botanic gardens. *Trends in Plant Science* **14**: 590-598. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.07.008>

Thangavelu M, Ayyasamy K (2017) Comparative anatomy of aerial and substrate roots of *Acampe praemorsa* (Rox.) Blatt. & McCann. *Flora* **226**, 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2016.11.001>

Vesala T, Sevanto S, Grönholm T, Salmon Y, Nikinmaa E, Hari P, Hölttä T (2017) Effect of leaf water potential on internal humidity and CO<sub>2</sub> dissolution: reverse transpiration and improved water use efficiency under negative pressure. *Frontiers in Plant Science* **8**, 54. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00054>

Willats WG, Knox JP (1996) A role for arabinogalactan-proteins in plant cell expansion: evidence from studies on the interaction of  $\beta$ -glucosyl Yariv reagent with seedlings of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **9**(6), 919-925. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.9060919.x>

Williams-Linera G, Sosa V, Platas T (1995) The fate of epiphytic orchids after fragmentation of a Mexican cloud forest. *Selbyana* **16**, 36-40.

Withner CL (1959) Orchid physiology. In ‘The orchids: a scientific survey’ (Ronald Press: New York)

- Zhang Z, Yan Y, Tian Y, Li J, He J, Tang Z (2015a) Distribution and conservation of orchid species richness in China. *Biological Conservation* **181**, 64-72. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.10.026>
- Zhang SB, Dai Y, Hao GY, Li JW, Fu XW, Zhang JL (2015b) Differentiation of water-related traits in terrestrial and epiphytic *Cymbidium* species. *Frontiers in Plant Science* **6**, 260. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00260>
- Zotz G, Bader MY (2009) Epiphytic plants in a changing world global: change effects on vascular and non-vascular epiphytes. In: Luttge U, Beyschlag W, Budel B, Francis D (Eds.), *Progress in Botany 70*. Springer, Berlin, pp. 147–170. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-68421-3\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-540-68421-3_7)
- Zotz G, Hietz P (2001) The physiological ecology of vascular epiphytes: current knowledge, open questions. *Journal of Experimental Botany* **52**, 2067-2078. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.364.2067>
- Zotz G, Weigelt P, Kessler M, Kreft H, Taylor A (2021) EpiList 1.0: A global checklist of vascular epiphytes. *Ecology* **102**, e03326. <https://doi.org/10.1002/ecy.3326>
- Zotz G, Winkler U (2013) Aerial roots of epiphytic orchids: the velamen radicum and its role in water and nutrient uptake. *Oecologia* **171**(3), 733-41. <https://doi.org/10.1007/s00442-012-2575-6>

**Capítulo 1:**

(Artigo submetido para a revista *Plant Biology*)

**Do CAM metabolism and habitat influence foliar water uptake in orchids?**

Jéssica Ferreira de Lima; Daniela Boanares; Vladimir Eliodoro Costa; Ana Sílvia Franco

Pinheiro Moreira

# 1 **Capítulo 1: Do CAM metabolism and habitat influence foliar water uptake in orchids?**

2 Jéssica Ferreira de Lima; Daniela Boanares; Vladimir Eliodoro Costa; Ana Sílvia Franco

3 Pinheiro Moreira

## 4 **Resumo**

5 Plantas epífitas e rupícolas habitam ambientes com recursos hídricos limitados. Essas plantas  
6 comumente expressam o Metabolismo Ácido das Crassuláceas (CAM), uma via fotossintética  
7 que funciona acumulando ácidos orgânicos nos vacúolos celulares à noite. Esse acúmulo de  
8 ácidos reduz seu potencial hídrico foliar e favorece a absorção de água. A absorção foliar de  
9 água (FWU) tem sido demonstrada em muitas espécies e auxilia na sobrevivência dessas plantas  
10 durante eventos de seca em ambientes com alto déficit hídrico. Hipotetizamos que a FWU pode  
11 ser uma estratégia para aquisição de água pelas orquídeas epífitas e rupícolas, e que o  
12 metabolismo CAM pode levar à uma maior taxa de absorção de água. Utilizamos 16 orquídeas  
13 epífitas, rupícola e terrestre, e com metabolismo C3 e CAM. Cinco indivíduos foram utilizados  
14 para avaliar sua FWU, suas características estruturais e o balanço hídrico de suas folhas.  
15 Espécies rupícolas e com metabolismo C3 apresentaram uma taxa de FWU maior que as  
16 demais. A FWU apresentou relação com a suculência, massa foliar específica e ao conteúdo  
17 relativo de água das folhas. Esses resultados indicam que as altas densidades de folhas de  
18 orquídeas favorece a FWU, de modo que os espaços para o armazenamento de água aumentam  
19 com a densidade foliar. As características estruturais ligadas ao armazenamento de água (como  
20 altos teores relativos de água), por outro lado, podem limitar as taxas de absorção de água foliar  
21 ao favorecer altos potenciais hídricos foliares. Orquídeas epífitas, rupícolas e terrestres podem  
22 apresentar FWU. Espécies rupícolas apresentaram altos níveis de FWU, provavelmente por  
23 absorção de água principalmente da neblina. No entanto, a suculência em plantas com  
24 metabolismo CAM parece mitigar a FWU.

25 **Palavras-chave:** Estratégias adaptativas; características foliares; Orchidaceae; fotossíntese;  
26 relações hídricas  
27  
28

29 **Abstract**

30 Epiphytic and rupicolous plants inhabit environments with limited water resources. Those  
31 plants commonly express Crassulacean Acid Metabolism (CAM), a photosynthetic pathway  
32 that functions by accumulating organic acids in cell vacuoles at night. That accumulation  
33 reduces their leaf water potential and favors water absorption. Foliar water uptake (FWU) has  
34 been demonstrated in many species, and aids plant survival during drought events in  
35 environments with high water deficits. We hypothesized that FWU represents a strategy  
36 employed by epiphytic and rupicolous orchids for water acquisition and that CAM metabolism  
37 would favor greater rates of water absorption. We examined 16 species of epiphyte, terrestrial,  
38 and rupicolous orchids evidencing C3 or CAM pathways. Five individuals were used to  
39 evaluate their FWU, their structural characteristics, and the water balances of their leaves.  
40 Rupicolous species with C3 metabolism were found to have FWU greater than the others. FWU  
41 was found to be related to succulence, specific leaf mass, and relative leaf water content. Those  
42 results indicated that the high densities of orchid leaves favored FWU, as space for water  
43 storage increases with leaf density. Structural characteristics linked to water storage (such as  
44 high relative water contents), on the other hand, can limit leaf water absorption rates by favoring  
45 high internal leaf water potentials. Epiphytic, rupicolous, and terrestrial orchids can show FWU.  
46 Rupicolous species showed high levels of FWU, probably through water absorption mainly  
47 from the mist. However, succulence in plants with CAM metabolism appears to mitigate FWU.

48

49 **Key-words:** Adaptive strategies; leaf traits; Orchidaceae; photosynthesis; water relations

## 50 **Introduction**

51 Orchids are present in widely diverse habitats throughout the world, exhibiting  
52 morphological and physiological strategies that allow them to adapt to diverse environmental  
53 conditions (Benzing, 1990; Zotz & Heitz, 2001; Zhang *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2016). They  
54 can be described as terrestrial, epiphytic, or rupicolous depending on the type of substrate on  
55 which they develop, with terrestrial orchids growing on soil, epiphytes developing on other  
56 plants (phorophytes), and rupicolous species growing on rocky surfaces (Williams-Linera *et*  
57 *al.*, 1995; Roberts & Dixon, 2008; Swarts & Dixon, 2009; Zhang *et al.*, 2015). These species  
58 encountered greater fluctuations in water and nutrient availabilities; while rupicolous plants are  
59 exposed to intense solar radiation, high temperatures, and strong winds, and likewise have  
60 limited access to water resources (Benzing, 1990; Burke, 2002). That scarcity of water  
61 resources is critical to their survival and growth, as it compromises their metabolism and  
62 becomes one of the most important limiting factors for both groups (Benzing, 1990; Laube &  
63 Zotz, 2003; Zotz *et al.*, 2010; Pereira & Santos, 2015; Zotz, 2016).

64 Adaptations that favor water acquisition and retention can be found in the roots, stems,  
65 and leaves of epiphytic plants (Withner, 1959; Benzing, 1990; Zotz & Hietz, 2001). The roots  
66 of epiphytes (and of many rupicolous plants) can obtain water from the atmosphere, so that  
67 their root systems, in addition to anchorage functions, are capable of absorbing water by the  
68 velamen and exhibit photosynthetic activity (Pridgeon, 1987). The leaves of epiphytes have  
69 thick cuticles, low stomatal densities, and are often succulent (Gibson, 1982; Mantovani, 1999;  
70 Zhang *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2016). Succulent leaves have high water storage capacities and  
71 are frequently capable of Crassulacean Acid Metabolism (CAM), where organic acids produced  
72 during the night are stored in cell vacuoles (Griffiths *et al.*, 1986; Cushman, 2001; Moreira *et*  
73 *al.*, 2009; Pires *et al.*, 2012; Moreira *et al.*, 2013).

74 CAM metabolism favors efficient water use, fixing carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) with  
75 phosphoenolpyruvate (PEP-carboxylase) during the night when water losses by transpiration  
76 are minimal (Winter *et al.*, 2005; Freschi *et al.*, 2007; Moreira *et al.*, 2009; Castillo *et al.*, 2016).  
77 That accumulation of organic acids in vacuoles during the night may reduce the leaf water  
78 potential and maximize water absorption and storage (Lüttge, 2010). In a species of shrub or  
79 tree, *Clusia minor*, organic acid production at night is significantly correlated with the  
80 concentrations of acids in sap that can be extracted from the leaves in the morning – suggesting  
81 that CAM metabolism induction causes reductions in intercellular osmotic potential values (and  
82 consequently, in the leaf's water potential) and aids in water absorption (Herrera *et al.*, 2008).

83 Plant physiological studies have demonstrated that foliar water uptake (FWU) aids  
84 survival during drought in environments with strong water deficits (Burgess & Dawson, 2004;  
85 Eller *et al.*, 2013, 2016; Cavallaro *et al.*, 2020; Schreel *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021). FWU  
86 occurs when water diffuses through the leaf surface and foliar tissues in response to a water  
87 potential gradient caused by a difference in water pressure between the atmosphere and the leaf  
88 interior, thus hydrating that plant organ (Rundel, 1982; Burgess & Dawson, 2004). This  
89 entrance of water through the leaves has a fundamental role in the survival and growth of  
90 diverse species and provides seasonal ecological advantages (Limm *et al.*, 2009; Simonin *et al.*,  
91 2009; Eller *et al.*, 2013; Boanares *et al.*, 2019). Although FWU represents only a small portion  
92 of the water that enters the leaves (in relation to the total amount of water absorbed by the  
93 roots), that absorption has various impacts on leaf physiology as it increases foliar hydration  
94 and water potential, reduces stomatal conductance, and increases water use efficiency – thus  
95 improving the plant's photosynthetic capacity (Burgess & Dawson, 2004; Limm *et al.*, 2009;  
96 Simonin *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010; Eller *et al.*, 2016; Vesala *et al.*, 2017; Berry *et al.*,  
97 2019). FWU has been observed in many species growing in diverse ecosystems, principally



98 localities that experience fog or dew (Breshears *et al.*, 2008; Limm *et al.*, 2009; Eller *et al.*,  
99 2013, 2016; Goldsmith *et al.*, 2013; Cassana *et al.*, 2015; Gotsch *et al.*, 2016).

100         Recent studies have proposed that FWU represents a norm, and is not an exception in  
101 plants (Berry *et al.*, 2019). As such, a better understanding of how FWU occurs, and the factors  
102 that influence that type of water uptake, will contribute to a better understanding of its  
103 importance during drought events (Eller *et al.*, 2013, 2016; Schreel & Steppe, 2020; Liu *et al.*,  
104 2021; Gui *et al.*, 2021). Epiphytic and rupicolous habits impose a series of restrictions on plants,  
105 including low water availability. As such, we raised the hypothesis that FWU can represent a  
106 positive strategy for water acquisition among orchids in those habitats and that CAM  
107 metabolism will result in greater rates of water absorption as that metabolic pathway  
108 accumulates organic acids during the night, with consequent reductions in leaf water potential  
109 during the early morning hours. We, therefore, used orchids as study models to: (1) determine  
110 the FWU capacities of epiphytic, rupicolous and terrestrial orchids; (2) detect variations in  
111 FWU capacities among C3 and CAM species; (3) detect differences in the structural  
112 characteristics of orchid leaves among the different habitats and types of metabolism; and,  
113 (4) determine if their leaf structural characteristics demonstrate consistent relationships with  
114 FWU.

115

## 116 **Materials and methods**

### 117 *Study Material*

118         We utilized six epiphytic orchid species (*Vanilla phaeantha* Rchb.f., *Dendrobium*  
119 *fimbriatum* Hooker, *Cattleya forbesii* Lindl., *Cattleya guttata* Lindl., *Oncidium flexuosum*  
120 Sims, *Prosthechea pachysepala* (Klotzsch) Chiron & V.P.Castro), four terrestrial species  
121 (*Oeceoclades maculata* (Lindl.) Lindl., *Epistephium sclerophyllum* Lindl., *Eulophia alta* (L.)  
122 Fawc. & Rendle, *Habenaria glazioviana* Kraenzl. ex Cogn.), and six rupicolous species

123 (*Epidendrum secundum* Jacq., *Gomesa warmingii* (Rchb.f.) M.W.Chase & N.H.Williams,  
124 *Bulbophyllum weddellii* (Lindl.) Rchb.f., *Prosthechea vespa* (Vell.) W.E.Higgins, *Bifrenaria*  
125 *harrisoniae* (Hook.) Rchb.f., *Maxillaria acicularis* Herb. ex Lindl.) in our experiments (Table  
126 1).

127 *Vanilla phaeantha* a secondary hemiepiphyte with wide geographic distribution, present  
128 in North, Central, and South America, and in the Antilles (Karremans *et al.*, 2020), it was  
129 included within the “epiphyte” group here and was found within a gallery forest in a Permanent  
130 Environmental Preservation Area (PEPA) within the Fazenda Quilombo Farm in the  
131 municipality of Araguari, Minas Gerais State, at 763 m.a.s.l. (18°43'58.5"S x 48°02'58.9"W).  
132 *Dendrobium fimbriatum*, *Cattleya forbesii*, *Cattleya guttata*, *Oncidium flexuosum*, and  
133 *Oeceoclades maculata* were being cultivated behind Block 2D at the Umuarama campus of the  
134 Federal University at Uberlândia. *Epistephium sclerophyllum*, *Eulophia alta*, and *Habenaria*  
135 *glazioviana* were collected in the Panga Ecological Reserve (total area 409 hectares), also in  
136 Uberlândia (19°10'S x 48°23' O). All of those sites are characterized by the Köppen  
137 classification system as having a tropical climate with a dry austral summer (April through  
138 September), and a rainy season between October and March (Alvares *et al.*, 2013). The mean  
139 annual temperature at the REPA is 22 °C, with a yearly mean rainfall total of 1650 mm  
140 (Embrapa, 1982); the mean annual temperature and rainfall rate in the Araguari region are 21.4  
141 °C and 126.7 mm respectively.

142 *Prosthechea pachysepala*, *Epidendrum secundum*, *Gomesa warmingii*, *Bulbophyllum*  
143 *weddellii*, *Prosthechea vespa*, *Bifrenaria harrisoniae*, and *Maxillaria acicularis* were collected  
144 in the Cachoeira das Andorinhas Environmental Protection Area in the municipality of Ouro  
145 Preto, Minas Gerais State (20°21'30"S x 43°30'11"W). The vegetation in that area grows on  
146 thin soils covering rocky outcrops (banded-quartz hematite and hematite schist) or on lateritic  
147 hardpans at mean altitudes of 1492 m.a.s.l. (Valim *et al.*, 2013). The climate there is temperate-

148 humid, with dry winters and warm and humid summers, with mean annual temperatures  
 149 between 14 and 22 °C and mean annual rainfall rates between 1400 and 1800 mm, with frequent  
 150 fog events (Fundação João Pinheiro, 1975; Pedralli *et al.*, 2001).

151

152 **Table 1.** Habitat and photosynthetic metabolism (C3 or CAM) of the 16 orchid species  
 153 analyzed. The type of photosynthetic metabolism of each species was determined through  
 154 comparisons of their  $\delta^{13}\text{C}$  values, with C3 metabolism being characterized by  $\delta^{13}\text{C}$  values  
 155 between -20 and -35‰ and CAM metabolism by values between -10 and -22‰ (Deines, 1980).

Habitat	Species	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Photosynthetic metabolism
Epiphytes	<i>Vanilla phaeantha</i>	-16.42	CAM
	<i>Dendrobium fimbriatum</i>	-29.81	C3
	<i>Oncidium flexuosum</i>	-23.91	C3/CAM
	<i>Cattleya forbesii</i>	-14.95	CAM
	<i>Cattleya guttata</i>	-16.49	CAM
	<i>Prosthechea pachysepala</i>	-28.96	C3
Terrestrial	<i>Oeceoclades maculata</i>	-17.66	CAM
	<i>Eulophia alta</i>	-33.22	C3
	<i>Epistephium scherophyllum</i>	-32.57	C3
	<i>Habenaria glazioviana</i>	-32.52	C3
Rupicolous	<i>Maxillaria aciculares</i>	-29.00	C3
	<i>Bifrenaria harresonie</i>	-26.50	C3
	<i>Prosthechea vespa</i>	-25.27	C3
	<i>Bulbophyllum weddellii</i>	-22.71	C3/CAM
	<i>Gomesa warmingii</i>	-27.34	C3
	<i>Epidendrum secundum</i>	-17.06	CAM

156

#### 157 *Measuring foliar water uptake (FWU)*

158 To evaluate FWU, a mature intact leaf was removed from each of five individuals of  
 159 each species (n = 5) between 05:00 and 07:30 (when the relative humidity of the air was greatest  
 160 and CAM plants still show low water potentials in their leaves). The leaves sheaths were  
 161 immediately sealed with Vaseline and paraffin and removed to the laboratory, where they were  
 162 weighed (fresh weight in mg) using an analytical balance (Shimadzu AUY 220, Japan). The

163 leaves were then immersed in distilled water and weighed again every 15 minutes for 2 h, then  
164 weighed every 30 minutes for 2 h (and then again after one more additional hour) to obtain a  
165 maximum water absorption curve (final weight in mg). Before each weighing, the leaves were  
166 touch-dried using microfiber absorbent towels to remove any surface water (Liang *et al.*, 2009).  
167 Leaf areas were measured using ImageJ software (AxionVision 2.1.0). Water capture by the leaves  
168 was calculated using a differential equation that provides data concerning the maximum foliar water  
169 uptake ( $C_{max}$ ) and the velocity of water absorption ( $k$ ) by leaf area ( $\text{g H}_2\text{O cm}^{-2}$  leaf area)  
170 (Liang *et al.*, 2009; Schreel *et al.*, 2019; Pan *et al.*, 2021). Leaf water uptake (1) and the rate of  
171 water capture by the leaves (2) based on leaf area ( $\text{g cm}^{-2}$ ), were calculated using the equations:

$$172 \quad FWU = \frac{\text{fresh weight} - \text{turgid weight}}{\text{leaf area}} \quad (1)$$

$$173 \quad \Delta C = (C_{max} - C_i) * (1 - e^{-kt}) + C_i \quad (2)$$

174 where  $\Delta C = C - C_i$  is the difference between the current leaf water content and the initial leaf  
175 water content or the increment of leaf water absorption,  $k$  is the absorption exponential  
176 coefficient of the leaf (or the curve number of the absorption function),  $t$  is the absorption time.  
177

#### 178 *Determination of photosynthetic metabolism*

179 The type of photosynthetic metabolism ( $C_3$  or CAM) of each orchid species was  
180 determined based on the isotopic ratio of carbon  $R(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})$ . The processing of the leaf material  
181 followed Ehleringer & Osmond (1989). Leaf fragments from two individuals of each species  
182 were dried at 50 °C and subsequently macerated. The  $R(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})$  of the samples were  
183 determined using a Continuous Flow Isotope Ratio Mass Spectrometry (CF-IRMS) at the Stable  
184 Isotopes Center, UNESP (Botucatu, Brazil). The CF-IRMS equipment is composed of an  
185 elemental analyzer - EA (Flash 2000 – Thermo Scientific, Germany) coupled to an isotope-  
186 ratio mass spectrometry (IRMS) (Delta V Advantage – Thermo Scientific, Germany) through  
187 a gas interface (ConFlo IV – Thermo Scientific, Germany). Samples weighing 0.10 to 0.12 mg

188 each and held in tin capsules were inserted into the EA and converted into CO<sub>2</sub> by combustion.  
189 The  $R(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})$  ratio of the CO<sub>2</sub> was determined in the IRMS, and the results converted to  $\delta^{13}\text{C}$   
190 (‰), representing the relative differences of the isotopic ratios, based on the international  
191 VPDB standard reference according to the equation below (3).

$$192 \quad \delta^{13}\text{C} = \frac{R(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{sample}}}{R(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{standard}}} - 1 \quad (3)$$

193 The CF-IRMS uncertainty was estimated at  $\pm 0.15\%$  for  $\delta^{13}\text{C}$ . The results were  
194 normalized by two-point anchorage (Paul *et al.*, 2007) using the USGS90 and USGS91  
195 standards.

196 The photosynthetic metabolism of the plant was determined by comparing the  $\delta^{13}\text{C}$   
197 values encountered with the values proposed by Deines (1980), in which C3 metabolism is  
198 characterized by  $\delta^{13}\text{C}$  values between -20 and -35‰ and CAM by values between -10 and -  
199 22‰.

200

#### 201 *Determination of saturation water content, relative water content, and specific leaf mass*

202 The analyses of saturation water content (SWC) and relative water content (RWC) were  
203 performed during the morning hours utilizing leaves from each of five individuals of each  
204 species ( $n = 5$ ). The SWC was used as the indicator of succulence and was determined by the  
205 formula  $SWC = (TM - DM)/DM$ , where  $TM$  is the turgid mass after hydration for 24 hours and  
206  $DM$  corresponds to the dry mass of the material after drying at 60 °C to a constant weight  
207 (Ogburn & Edwards, 2012). The relative water content (RWC) of the leaves at the moment of  
208 the collection was calculated using the equation  $RWC = [(FM - DM)/(TM - DM)] * 100$ , where  $FM$   
209 is the leaf fresh mass (Witkowski & Lamont, 1991). Tissue density was evaluated considering  
210 the specific leaf mass (SLM) obtained by the formula  $SLM = DM/A$ , where  $A$  is the leaf surface  
211 area (Witkowski & Lamont, 1991).

212

213 *Data analyses*

214           The data were submitted to the Shapiro-Wilk normality test at a 5% level of significance.  
215 To determine if there were differences in the structural parameters among plant habitats  
216 (epiphytic, rupicolous, and terrestrial) and the types of metabolism (C3 or CAM), the data were  
217 evaluated using the ANOVA test. Nonparametric data were analyzed using the Kruskal-Wallis  
218 test (saturation water content and relative water content). Differences between the parameters  
219 were considered significant at a 5% level of probability. We have included C3/CAM species in  
220 the CAM species data.

221           Generalized linear models (GLMs) with Quasipoisson errors were constructed to verify  
222 if the maximum absorption of water by the leaves ( $C_{max}$ ) and the absorption velocity ( $k$ )  
223 (dependent variables) differed among the habitats and the types of photosynthetic metabolism  
224 (independent variables). The GLM and linear regression were used to evaluate the influences  
225 of leaf area, specific leaf mass, saturation water content, and relative water content on the  
226 maximum foliar water uptake ( $C_{max}$ ) as well as the coefficient of absorption, which we  
227 characterized as the velocity of water absorption ( $k$ ) (dependent variables). The influence of  
228 leaf area, SLM, RWC, and SWC on the FWU in relation to the different habitats was determined  
229 using the data from 14 orchid species (Table 2), as *D. fimbriatum* (epiphyte) and *E.*  
230 *sclerophyllum* (terrestrial) did not demonstrate FWU. To compare FWU between the two types  
231 of photosynthetic metabolism (C3 and CAM) and the effects of the leaf structural parameters  
232 (leaf area, SLM, RWC, and SWC) on FWU, the values of the species *G. warmingii* (C3) and  
233 *B. weddellii* (CAM) that appeared as outliers were not used (Table 3). All of the analyses were  
234 performed using R software (i386 4.1.3).

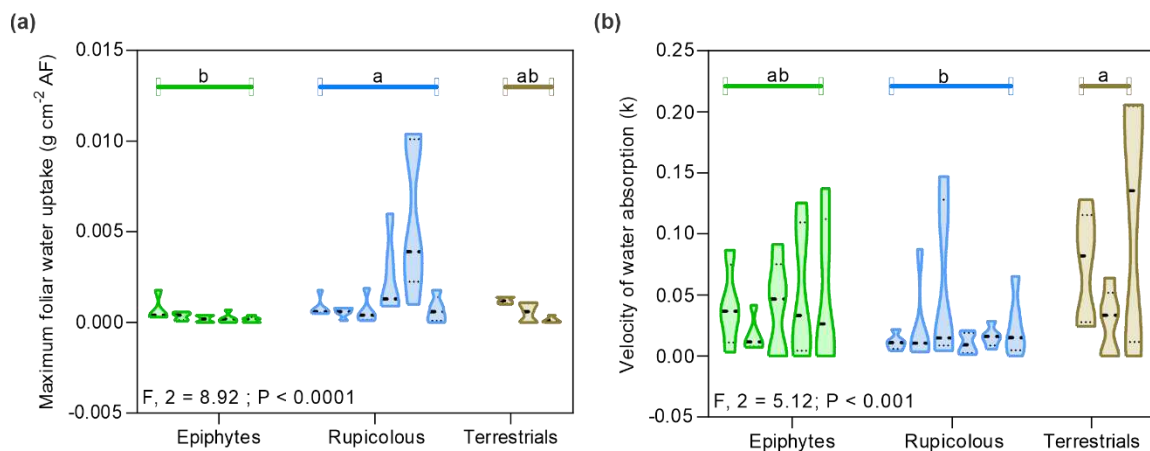
235

236 **Results**

237 *Foliar water uptake and structural variations in relation to habitat*

238 Most of the orchids analyzed demonstrated FWU, except *D. fimbriatum* (epiphyte) and  
239 *E. sclerophyllum* (terrestrial). The  $C_{max}$  was greatest in rupicolous orchids as compared to  
240 epiphytes (Fig. 1a). The (k) was found to be inversely proportional to  $C_{max}$ . The velocity of  
241 water absorption (k) of terrestrials were greater than those of rupicolous species (Fig. 1b).

242



243 **Figure 1.** Foliar water uptake (FWU) parameters of 14 orchid species [epiphytes (5 species),  
244 rupicolous (6 species), and terrestrials (3 species)]. *Dendrobium fimbriatum* (epiphyte) and *E.*  
245 *sclerophyllum* (terrestrial) did not demonstrate FWU and were therefore not represented in these  
246 graphs. Each boxplot represents the variations in the maximum water absorption (a) and  
247 velocity of water absorption (b) of each species evaluated (n =5 for each species). The letters  
248 represent differences among the habitats using generalized linear models (GLM) (P < 0.05).

249

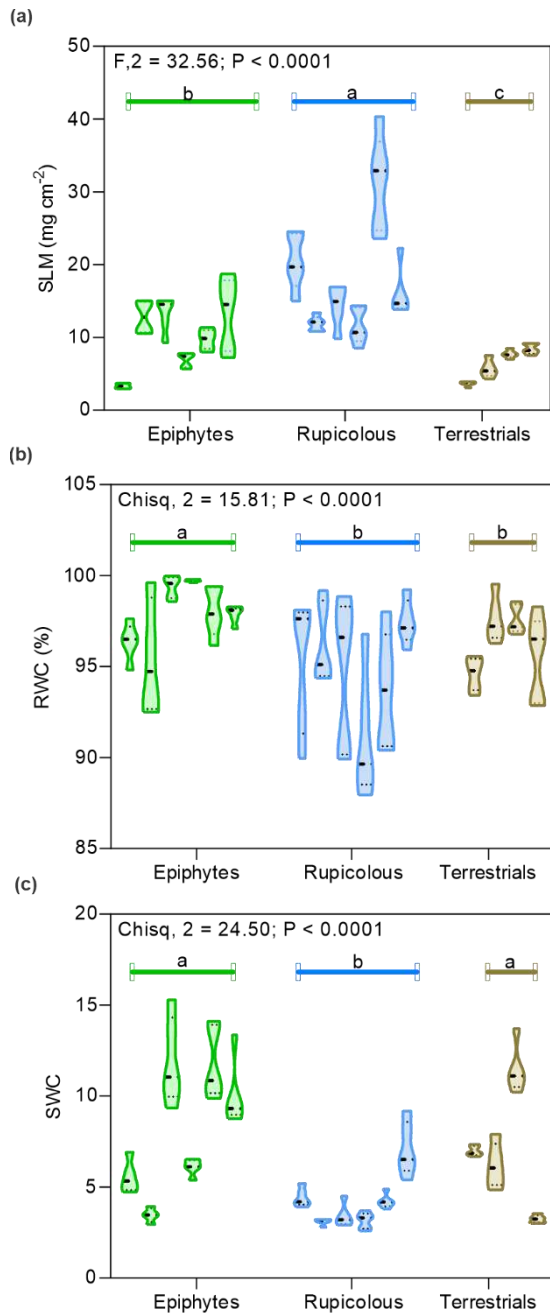
250 The SLM was different among the different habitats (Fig. 2), being greater in rupicolous  
251 species and lower among terrestrials (Fig. 2a). Epiphyte species evidenced RWC greater than  
252 rupicolous or terrestrial species (Fig. 2b). The SWC of epiphytes and terrestrials were greater  
253 than those of rupicolous species (Fig. 2c).

254

255

256

257



258

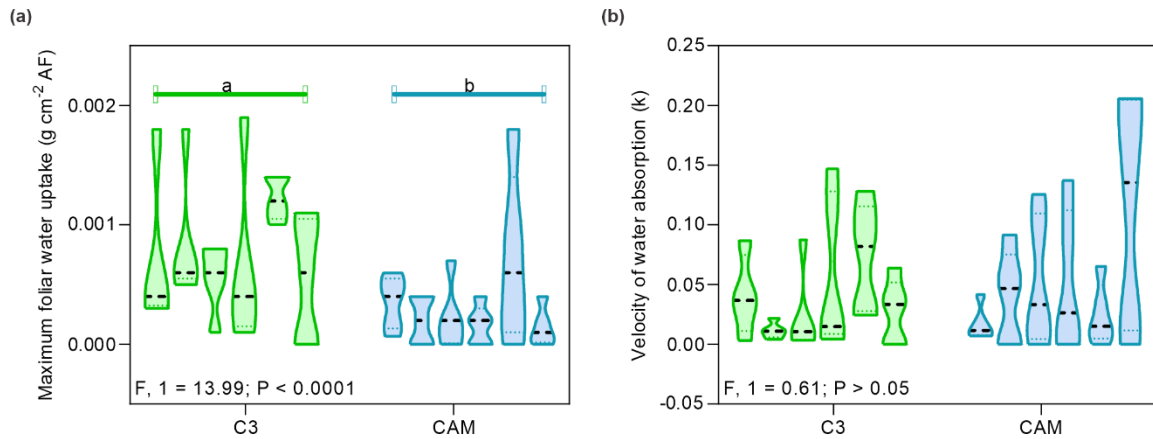
259 **Figure 2.** Variations in leaf structures and the foliar water balances of 16 orchid species in  
 260 relation to epiphytic, rupicolous, and terrestrial habitats (n =5). (a) Specific leaf mass (SLM),  
 261 (b) relative water content (RWC), and (c) saturation water content (SWC). Different letters  
 262 indicate significant differences between the habitats by ANOVA, with posterior comparisons  
 263 of the means using the Tukey test ( $P < 0.05$  was considered for both).

264

265 *Foliar water uptake and structural characteristics in relation to photosynthetic metabolism*

266 The species having C3 metabolism evidenced foliar water uptake rates greater than  
 267 CAM species (Fig. 3a), although their water velocity of water absorption was similar (Fig. 3b).





269 **Figure 3.** Foliar water uptake (FWU) parameters of 12 orchid species having C3 (6 species)  
 270 and CAM (6 species) metabolism. The C3 species *Dendrobium fimbriatum* and *E.*  
 271 *sclerophyllum* did not demonstrate any FWU, and were therefore not represented in these  
 272 graphs. Each boxplot represents variations in the maximum foliar water absorption rate - Cmax  
 273 (a) and the velocity of water absorption - k (b) of each of the evaluated species (n =5 for each  
 274 species). *Dendrobium fimbriatum* (epiphyte) and *E. sclerophyllum* (terrestrial) did not  
 275 demonstrate FWU; *G. warmingii* and *B. weddellii* were considered outliers; thus, they were not  
 276 represented in these graphs. The letters represent significant differences between the habitats  
 277 using generalized linear models (GLM) (P < 0.05).

278

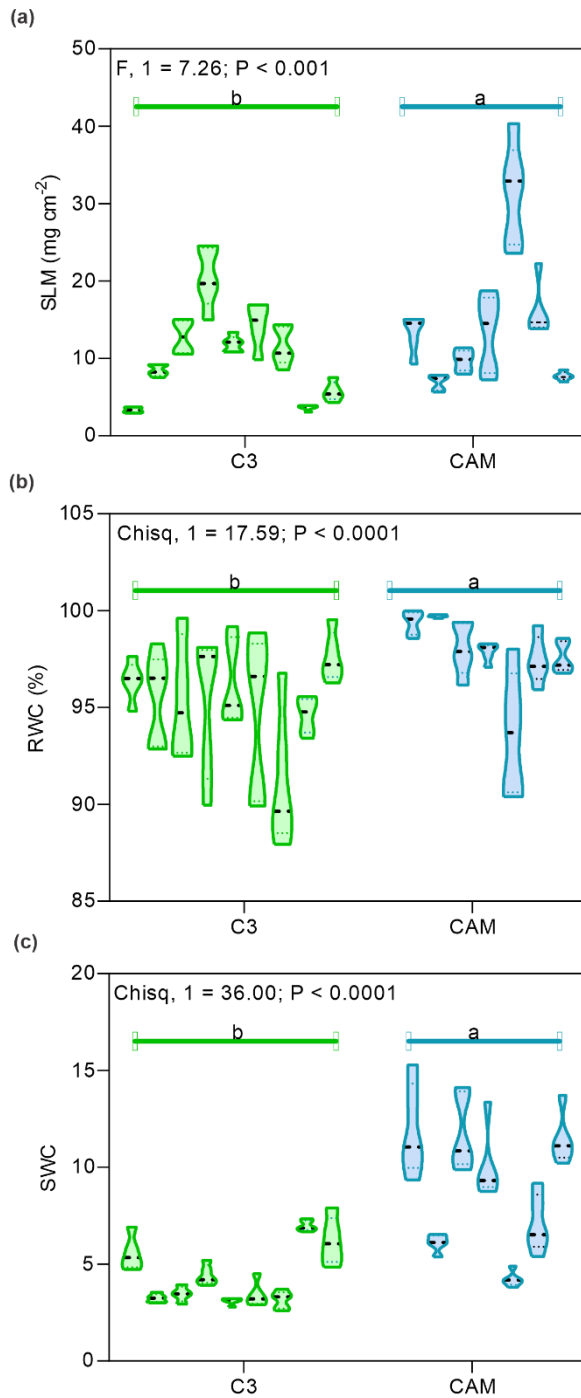
279 Species having CAM metabolism demonstrated greater SLM values than C3 species  
 280 (Fig. 4a), while the RWC and the SWC of CAM species were greater than those of C3 species  
 281 (Fig. 4b,c).

282

283

284

285



286

287

288

289

290

291

292

**Figure 4.** Variations in the structures and foliar water balances of 16 Orchidaceae species in relation to their photosynthetic metabolism, C3 or CAM (n =5). (a) Specific leaf mass (SLM), (b) relative water content (RWC), and (c) saturation water content (SWC). Different letters indicate significant differences between the habitats by ANOVA, with posterior comparisons of the means using the Tukey test ( $P < 0.05$  was considered for both).

293 *Foliar water uptake and structural characteristics*

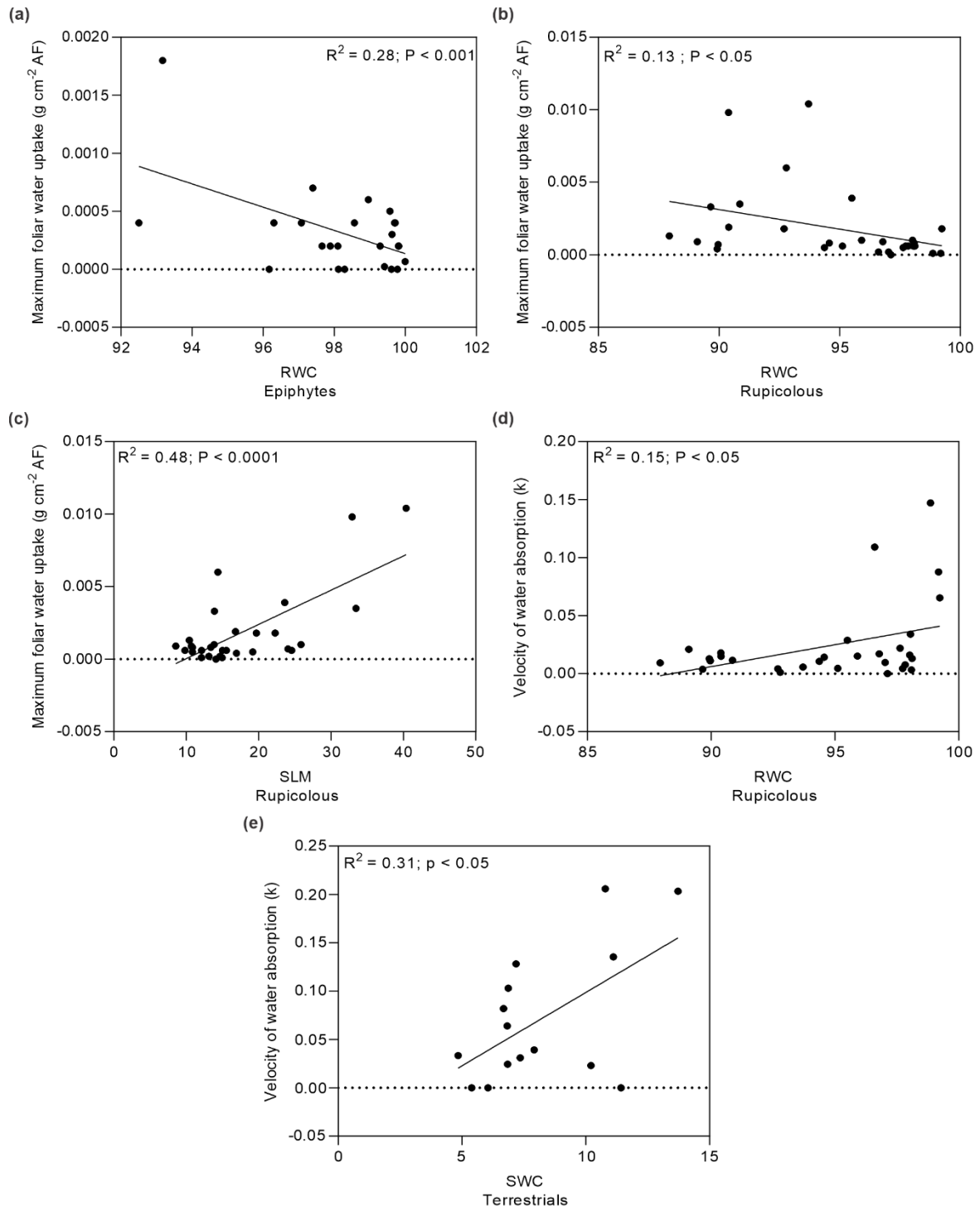
294 In terms of the orchids studied here, C<sub>max</sub> demonstrated a positive relationship with  
 295 leaf area and with SLM, but was negatively correlated with RWC; the (k) was not influenced  
 296 by the structural parameters of the leaves (Table 2).

297 **Table 2.** Effects or influences of the structural parameters of the leaves on the maximum rates  
 298 of water absorption (C<sub>max</sub>) and the water absorption velocities (k) of 14 orchid species in  
 299 relation to their habitats. LA, Leaf area; SLM, specific leaf mass; RWC, relative water content;  
 300 SWC, saturation water content. *Dendrobium fimbriatum* (epiphyte) and *E. sclerophyllum*  
 301 (terrestrial) did not demonstrate FWU, and were therefore not represented in these graphs. The  
 302 data were analyzed using generalized linear models (GLM), considering a 5% level of  
 303 probability.

Dependent variables	Independent variables	Estimate ( $\beta$ )	Std. Error	t value	P value
C <sub>max</sub>	LA	0.006664	0.002786	2.392	< 0.01
	SLM	0.077589	0.010356	7.492	< 0.0001
	RWC	-0.126127	0.036261	-3.478	< 0.0001
	SWC	-0.079128	0.052884	-1.496	> 0.05
k	LA	0.004996	0.003344	1.494	> 0.05
	SLM	-0.020962	0.027669	-0.758	> 0.05
	RWC	0.100903	0.065817	1.533	> 0.05
	SWC	0.031931	0.043027	0.742	> 0.05

304

305 Analyses of the plant habitats separately showed the epiphytic orchids as having a  
 306 negative relationship between RWC and C<sub>max</sub> (Fig. 5a), and neither of those parameters had  
 307 apparent effects on the velocity of water absorption (k). Among rupicolous species, the C<sub>max</sub>  
 308 was negatively related to RWC and positively related to SLM (Fig. 5b,c); their (k) was  
 309 positively related to RWC (Fig. 5d). The C<sub>max</sub> of terrestrial orchids were not related to any  
 310 structural leaf parameters, although their (k) were found to be positively related to SWC (Fig.  
 311 5e). The other leaf parameters did not demonstrate any relationships to C<sub>max</sub> or (k).



312 **Figure 5.** Relationships between the relative water content (RWC), saturation water content  
 313 (SWC), and specific leaf mass (SLM) with the maximum foliar water absorption rate ( $C_{\text{max}}$ )  
 314 and the velocity of water absorption velocity ( $k$ ) of 14 epiphyte, terrestrial, and rupicolous  
 315 orchid species. *Dendrobium fimbriatum* (epiphyte) and *E. sclerophyllum* (terrestrial) did not  
 316 demonstrate FWU, and were therefore not represented in these graphs. Negative relationships  
 317 can be observed between the RWC and the  $C_{\text{max}}$  of the epiphyte (a) and rupicolous orchids  
 318 (b). Positive relationships can be observed in rupicolous orchids between SLM and  $C_{\text{max}}$  with

319 (c), and between RWC and k (d). Positive relationships in terrestrial orchids can be observed  
 320 between SWC and k (e). The data correspond to linear regression analyses considering  $P < 0.05$ .  
 321

322 In terms of photosynthetic metabolism, the  $C_{max}$  in all of the species were related to  
 323 both the SLM and their RWC; (k) was not found to have any influence on leaf structural  
 324 characteristics (Table 3).

325

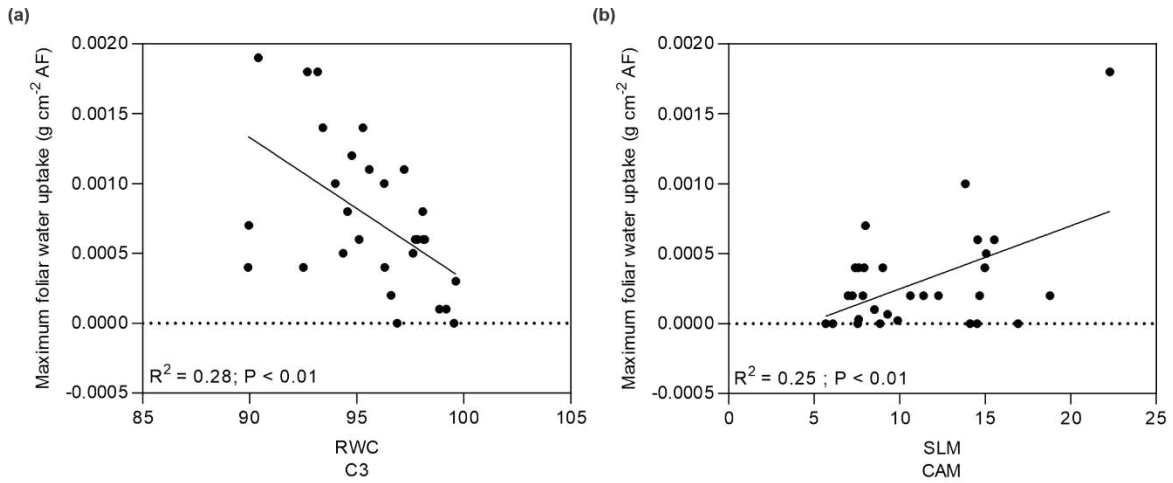
326 **Table 3.** Effects of the leaf structural parameters on the maximum rates of water absorption  
 327 ( $C_{max}$ ) and the water absorption velocities (k) of 12 orchid species in relation to their  
 328 photosynthetic metabolism. LA, Leaf area; SLM, specific leaf mass; RWC, relative water  
 329 content; SWC, saturation water content. *Dendrobium fimbriatum* (epiphyte) and *E.*  
 330 *sclerophyllum* (terrestrial) did not demonstrate FWU; *G. warmingii* and *B. weddellii* were  
 331 considered outliers; thus, they were not represented in these graphs. The data were analyzed  
 332 using generalized linear models (GLM), considering a 5% level of probability.

Dependent variables	Independent variables	Estimate ( $\beta$ )	Std. Error	t value	P value
C <sub>max</sub>	LA	0.0058	0.0026	2.169	< 0.01
	SLM	0.0234	0.0276	0.848	> 0.05
	RWC	-0.1111	0.0432	-2.567	< 0.01
	SWC	-0.0598	0.0422	-1.415	> 0.05
k	LA	0.0046	0.0038	1.214	> 0.05
	SLM	-0.0175	0.0369	-0.474	> 0.05
	RWC	0.0897	0.0830	1.081	> 0.05
	SWC	0.0270	0.0467	0.580	> 0.05

333

334 In analyzing the relationships between FWU and structural characteristics of the leaves  
 335 within CAM and C3 metabolism, structural characteristics evidenced influence only on the  
 336  $C_{max}$ . Among species having C3 metabolism and considering all of the structural  
 337 characteristics, only the RWC had a negative influence on the quantities of water absorbed by  
 338 the leaves (Fig. 6a); the  $C_{max}$  of the species having CAM was only positively influenced by  
 339 the SLM (Fig. 6b).

340



341 **Figure 6.** Relationships between foliar relative water content (RWC) and specific leaf mass  
342 (SLM) with the maximum foliar water uptake rate (Cmax) in 12 orchid species having C3 and  
343 CAM photosynthetic metabolism. Negative relationships can be observed between RWC and  
344 the Cmax of C3 orchids (a). Positive relationships can be observed between SLM and Cmax of  
345 CAM orchids (b). *Dendrobium fimbriatum* (epiphyte) and *E. sclerophyllum* (terrestrial) did not  
346 demonstrate FWU; *G. warmingii* and *B. weddellii* were considered outliers; thus, they were not  
347 represented in these graphs. The data correspond to linear regression analyses, considering P  
348 < 0.05.

349

## 350 Discussion

351 Both FWU and leaf structures were found to differ in relation to the different habitats  
352 (terrestrial, rupicolous and epiphytic) and different photosynthetic pathways (C3 or CAM).  
353 Rupicolous orchids absorb larger quantities of water through their leaves (FWU) than epiphyte  
354 species. Foliar water uptake is related to habitat conditions and the morphological traits of the  
355 leaves associated with water use. As such, water stress/low water availability is reflected in  
356 strategies that can maximize water uptake and promote its efficient use, such as FWU. The  
357 presence of mist in campo rupestre (typical vegetation on rocky outcrops above 800 m a.s.l.)  
358 areas appears to facilitate the entrance of water by that alternative pathway. We were also able  
359 to demonstrate that species having C3 metabolism evidence greater rates of FWU as compared  
360 to CAM species. FWU was found to be related to leaf structural characteristics related to water

361 storage in leaf tissues, such as SLM, SWC, and the leaf water status (RWC). The relationship  
362 between FWU and the SWC of the leaves evidenced the balance that exists between FWU in  
363 orchid species and their capacity to store water.

364

365 *Foliar water uptake in relation to habitat and the structural characteristics of the leaves*

366 Foliar water uptake has been reported in species present in diverse ecosystems,  
367 principally in localities where fog, mist, and dew are frequent (Burgess & Dawson, 2004;  
368 Breshears *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2016; Steppe *et al.*, 2018; Cavallaro *et al.*, 2020). We  
369 observed here that almost all of the orchids studied here, independent of their habitat (epiphytic,  
370 rupicolous, or terrestrial), are capable of FWU. Rupicolous species present in areas where mist  
371 is common, such as in campos rupestres (Scatena & Nunes, 1996), demonstrated greater rates  
372 of foliar water absorption ( $C_{max}$ ), while their ( $k$ ) was inversely proportional to  $C_{max}$ , as has  
373 been reported by other researchers (Boanares *et al.*, 2018). In contrast to terrestrial orchids that  
374 grow fixed in the soil, rupicolous and epiphytic orchids are exposed to more stressful  
375 conditions, with low availabilities of both water and nutrients. In the case of rupicolous species,  
376 there is also the factors of high light intensities, strong winds, variable temperatures, and thin  
377 soils (Burke, 2002; Silveira *et al.*, 2016). Due to those conditions, it would be expected that  
378 epiphytic plants, and principally rupicolous species, would develop specializations related to  
379 the acquisition and conservation of their water resources (Negreiros *et al.*, 2014), with FWU  
380 being a strategy already recorded in orchids, and observed among epiphytes such as the genus  
381 *Dendrobium* (Pan *et al.*, 2021).

382 The amount of water absorbed through plant leaves is related to the relative humidity of  
383 the air (Li *et al.*, 2014; Kerhoulas *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021), so that the rupicolous species  
384 analyzed can benefit from mist events and absorb water by FWU in quantities greater than  
385 epiphyte species. Mist or fog events associated with the wetting of leaves will improve their

386 functioning, as those events can maximize water use efficiency during water deficit conditions  
387 (Eller *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2014a, b; Fu *et al.*, 2016; Bittencourt *et al.*, 2019; Hayes *et*  
388 *al.*, 2020), and can be considered important sources of water (through FWU) for vascular  
389 epiphytes (Gotsch *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2018). FWU occurs in response to a water potential  
390 gradient between the atmosphere and the intercellular spaces of the leaf mesophyll (which are  
391 more negative) (Burgess & Dawson, 2004). We observed the low relative water content values  
392 (RWC) among rupicolous orchid leaves maximize absorption by FWU. FWU presents various  
393 advantages to the physiology of the plant, as it improves leaf water content (and therefore the  
394 leaf water potential), and foliar photosynthetic outputs by improving carbon gains and reducing  
395 stomatal conductance (Limm *et al.*, 2009; Simonin *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2015; Eller *et al.*,  
396 2016; Guzmán-Delgado *et al.*, 2018; Holanda *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019).

397         The morphological characteristics of the leaves of the rupicolous and epiphyte species  
398 analyzed here were similar to those reported in the literature (Watkins & Cardelús, 2012; Zhang  
399 *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2016), that is, high SLM values can be related to environmental  
400 conditions and strongly influence the leaf water balance (Zotz & Bader, 2009). Additionally,  
401 leaf mass provides information concerning the manners in which resources are used by the  
402 plants (Vendramini *et al.*, 2002; Poorter & Bongers, 2006; Poorter *et al.*, 2009). The greater  
403 densities of the leaves of rupicolous and epiphyte species can be related to water storage by  
404 their tissues and their drought resistance, as seen with epiphytic species of *Cymbidium*, which  
405 have high SLM and succulence as compared to terrestrial species (Negreiros *et al.*, 2014; Zhang  
406 *et al.*, 2015). Specific leaf mass, one of the aspects considered as an index of sclerophylly, is  
407 an indicator of the structural strategies developed in response to a scarcity of water in the  
408 environment, where greater SLM (denser leaves) would be expected (Grime, 2001; Wright *et*  
409 *al.*, 2001; Westoby *et al.*, 2002; Silveira *et al.*, 2015). Similarly, in our study, we observed  
410 greater SLM values in rupicolous species, that grew in an environment considered xeric (campo



411 rupestre). On the other hand, the low leaf densities (low SLM values) encountered in terrestrial  
412 orchids may be related to their efficiency in capturing water resources (Wright *et al.*, 2004;  
413 Poorter *et al.*, 2009).

414 In relation to leaf succulence (as evaluated by SWC) and water status (RWC), the leaves  
415 of epiphyte and terrestrial orchids examined in this work were more succulent, and the  
416 epiphytes evidenced greater quantities of water in their tissues. Succulence is an adaptive  
417 strategy to compensate for scarce water resources, as it allows for water storage in the leaves  
418 that will improve the plant's water balance (Eggli & Nyffeler, 2009), and can be considered a  
419 strategy for avoiding water stress at the cellular level (Zotz & Bader, 2009; Ogburn & Edwards,  
420 2012). Epiphytic orchids generally demonstrate morphological characteristics distinct from  
421 terrestrial species, as the leaves of the epiphytes are more succulent, and their leaf water  
422 contents are greater and linked to greater efficiency in water retention and storage (Zhang *et*  
423 *al.*, 2015). That high investment in water storage among epiphytic orchids studied here, reflect  
424 their lesser efficiency of FWU, as represented by their low values of Cmax (as has been reported  
425 for other epiphytes) (Gotsch *et al.*, 2015; Pan *et al.*, 2021).

426

#### 427 *Foliar water uptake in relation to the types of photosynthetic metabolism*

428 Both the C3 and CAM metabolism species demonstrated FWU. However, different  
429 from our hypothesis, the C3 species evidenced greater foliar water uptake rates (Cmax).  
430 Additionally, C3 plants had lower values of leaf structural characteristics related to water  
431 storage (SWU and SLM). As such, the C3 species analyzed indicated a greater FWU capacity  
432 while their investments in structures related to leaf water storage were relatively low. Gotsch *et*  
433 *al.*, (2015) and Pan *et al.*, (2021) reported that species evidencing low succulence and low SLM  
434 values had higher FWU levels.

435 CAM species, on the other hand, evidenced low foliar water absorption rates, but  
436 demonstrated greater leaf densities (high SLM values), high relative water contents, and greater  
437 leaf succulence. CAM metabolism is an adaptive strategy to occupy dry environments that  
438 improves water use efficiency (Kluge & Ting, 1978). Leaf succulence is a typical characteristic  
439 of plants with CAM (Gibson, 1982; Smith *et al.*, 1996; Winter & Smith, 1996; Nelson *et al.*,  
440 2005, 2008; Lüttge, 2019), as the vacuoles of the leaf cells are used to store water and  
441 accumulate organic acids (Griffiths *et al.*, 1986; Cushman, 2001; Moreira *et al.*, 2009;  
442 Niechayev *et al.*, 2019). *Tillandsia utriculata* L. (Bromeliaceae), for example, is an epiphytic  
443 CAM species of Cerrado vegetation (neotropical savannas, typical of central Brazil) that  
444 evidences various characteristics linked to water conservation, including leaf succulence  
445 (Rosado-Calderón *et al.*, 2018). The accumulations of water in those plant tissues aid in  
446 reducing water stress (Lüttge, 1986; Martin *et al.*, 2009) and can be considered a strategy of  
447 drought avoidance at cellular and tissue levels (Orburn & Edwards, 2012). Our analyses,  
448 therefore, indicated that species that demonstrate CAM metabolism invest more in structures  
449 linked to water storage capacities to alleviate water stress (Zotz & Bader, 2009; Ogburn &  
450 Edwards, 2013; Pivovarovoff *et al.*, 2014) than in FWU. Among the species studied here, the  
451 observed reductions of their water potentials during the night does not seem to be linked to  
452 other leaf structural characteristics that would favor water absorption.

453

#### 454 *Leaf structural characteristics and FWU*

455 The morphological and physiological characteristics of plant leaves influence the  
456 quantities of water they can absorb (Wang *et al.*, 2016; Bittencourt *et al.*, 2019). We observed  
457 here that some morphological traits, such as SLM, SWC and RWC, demonstrate relationships  
458 to FWU. Among rupicolous orchids and plant species having CAM metabolism, the quantities  
459 of water absorbed by their leaves increases proportionally to leaf density (greater SLM). SLM

460 is a factor associated with strategies linked to increasing productivity and resource  
461 conservation, such as longer leaf longevity (Grime, 2001; Westoby *et al.*, 2002; de la Riva *et*  
462 *al.*, 2016). Therefore, high SLM values, as encountered in rupicolous plants and those having  
463 CAM metabolism, can also exercise relevant roles in FWU strategies, as the numbers of leaf  
464 cells proportionally increase leaf density, and provide more spaces for water storage.

465 As FWU re-hydrates leaf tissues, it increases their water contents and their water  
466 potential levels (Munné-bosch, 2010; Yan *et al.*, 2015; Guzmán-Delgado *et al.*, 2018; Wang *et*  
467 *al.*, 2019; Liu *et al.*, 2021). However, it has been demonstrated with some vascular epiphytes  
468 common in the tree canopies of cloud forests, such as bromeliads and ferns (Kohler *et al.*, 2007),  
469 that as their water contents increase, their rates of water absorption from mist decrease (Tobón  
470 *et al.*, 2011). That observation indicates that the RWC has a negative relationship with the  
471 quantities of water absorbed by the leaves ( $C_{max}$ ), in a manner similar to the epiphyte and  
472 rupicolous species and those evidencing C3 metabolism in the present study. The difference in  
473 water potential between the atmosphere and the leaf corresponds to the driving force for FWU,  
474 with an antagonistic relationship to  $C_{max}$  (Rundel, 1982; Boanares *et al.*, 2019). As such, the  
475 relationship between high RWC values and a high leaf water potential will limit foliar water  
476 uptake ( $C_{max}$ ) in epiphyte and rupicolous plants and in those species studied here with C3  
477 metabolism. In addition, leaf structures in epiphyte species, such as a thick cuticle, are generally  
478 related to resistance to water losses to the environment, but can also reduce FWU (Yang *et al.*,  
479 2016; Wu *et al.*, 2018; Pan *et al.*, 2021), as seen in the epiphytic orchid species studied here.

480 In relation to the velocity of water absorption ( $k$ ), the absorption velocity in rupicolous  
481 species increases as the RWC of the leaf also increases, while in terrestrial species, the foliar  
482 water absorption rate is proportional to the SWC. That relationship between  $k$  and RWC may  
483 be linked to the rapid hydration of the leaf tissues, as the velocity of water absorption ( $k$ ) is  
484 intimately related to the water balance of the plant (Boanares *et al.*, 2019). The terrestrial

485 species studied here evidenced greater succulence and a consequently greater capacity for  
486 storing water, as proposed by other authors (Kluge & Ting, 1978; Mantovani, 1999). As the  
487 foliar water absorption rate was relatively low among terrestrial species, and  $k$  is inversely  
488 proportional to  $C_{max}$  (Boanares *et al.*, 2018), the velocity of water absorption can increase as  
489 water storage space increases. Some vascular epiphytes, for example, evidence a strategy of  
490 compensation between their FWU and water storage, in which species with very succulent  
491 leaves demonstrate limited FWU (Gotsch *et al.*, 2015; Pan *et al.*, 2021). Therefore, the  
492 terrestrial species studied here investing in structures related to water storage.

493         We observed that almost all of the orchid species studied here are capable of absorbing  
494 water through their leaves. However, the FWU and leaf structures differed among terrestrial,  
495 rupicolous and epiphytic species and between species having C3 or CAM metabolism. Among  
496 the different habitats, the rupicolous species evidenced greater foliar water absorption rates,  
497 favoring water conservation in the unfavorable conditions of their natural environment. In  
498 relation to photosynthetic metabolism, the C3 species evidenced greater leaf water absorbance  
499 rates than the CAM species. The C3 species also demonstrated low investments in leaf water  
500 storage structures as compared to CAM species, where leaf succulence appears to generate a  
501 water balance unfavorable to FWU. The structural characteristics of leaves linked to water  
502 storage (SLM and SWC) and to leaf water status (RWC) are related to FWU. The greater leaf  
503 densities observed in rupicolous orchids and those having CAM metabolism are positively  
504 related to FWU, as the spaces available for water storage increase with increasing leaf density  
505 (with the numbers of cells). Among the epiphyte and rupicolous orchids, and those studied here  
506 having C3 metabolism, the quantities of water stored in their leaves can limit the foliar water  
507 absorption rate ( $C_{max}$ ) by generating a high leaf water potential.

508

509 **Acknowledgments**

510 This study was supported by CAPES, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e  
511 Tecnológico (CNPq) (nº 309044/2021-9), and Programa de Pós-graduação em Ecologia,  
512 Conservação e Biodiversidade (PPGECO) of the Universidade Federal de Uberlândia (UFU).  
513 The authors thank Roy Funch for English revision.

514

## 515 **References**

516 Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, Gonçalves JDM, Sparovek G. (2013). Köppen's climate  
517 classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, **22**, 711-728.

518 <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>

519 Benzing DH. (1990). Vascular epiphytes: general biology and related biota. Cambridge  
520 University Press, Cambridge, UK. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511525438>

521 Berry ZC, Emery NC, Gotsch SG, Goldsmith GR. (2019). Foliar water uptake: processes,  
522 pathways, and integration into plant water budgets. *Plant, Cell & Environment*, **42**, 410-  
523 423. <https://doi.org/10.1111/pce.13439>

524 Bittencourt PR, Barros FDV, Eller CB, Müller CS, Oliveira RS. (2019). The fog regime in a  
525 tropical montane cloud forest in Brazil and its effects on water, light and microclimate.

526 *Agricultural and Forest Meteorology*, **265**, 359-369.

527 <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2018.11.030>

528 Boanares D, Isaias RMS, Sousa HC, Kozovits AR. (2018). Strategies of leaf water uptake based  
529 on anatomical traits. *Plant Biology*, **20**, 848–856. <https://doi.org/10.1111/plb.12832>

530 Boanares D, Kozovits AR, Lemos-Filho JP, Isaias RMS, Solar RRC, Duarte AA, França MGC.  
531 (2019). Foliar water-uptake strategies are related to leaf water status and gas exchange in

532 plants from a ferruginous rupestrian field. *American Journal of Botany*, **106**, 935-942.

533 <https://doi.org/10.1002/ajb2.1322>

534 Breshears DD, McDowell NG, Goddard KL, Dayem KE, Martens SN, Meyer CW, Brown KM.  
535 (2008). Foliar absorption of intercepted rainfall improves woody plant water status most  
536 during drought. *Ecology*, **89**, 41–47. <https://doi.org/10.1890/07-0437.1>

537 Burgess SSO, Dawson TE. (2004). The contribution of fog to the water relations of *Sequoia*  
538 *sempervirens* (D. Don): foliar uptake and prevention of dehydration. *Plant, Cell &*  
539 *Environment*, **27**, 1023-1034. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2004.01207.x>

540 Burke A. (2002). Island–matrix relationships in Nama Karoo inselberg landscapes Part II: Are  
541 some inselbergs better sources than others? *Plant Ecology*, **158**, 41–48.

542 Cassana FF, Eller CB, Oliveira RS, Dillenburg LR. (2015). Effects of soil water availability on  
543 foliar water uptake of *Araucaria angustifolia*. *Plant and Soil*, **399**, 147–157.  
544 <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2685-0>

545 Castillo RJ, Cervera JC, Navarro-Alberto J. (2016). Drought and extreme temperature tolerance  
546 for *Tillandsia dasyliriifolia*, an epiphytic bromeliad from the northern coastal dune  
547 scrubland in Yucatan, Mexico. *Botanical Sciences*, **94**, 121-126.  
548 <https://doi.org/10.17129/botsci.68>

549 Cavallaro A, Carbonell Silleta L, Pereyra DA, Goldstein G, Scholz FG, Bucci SJ. (2020). Foliar  
550 water uptake in arid ecosystems: seasonal variability and ecophysiological consequences.  
551 *Oecologia*, **193**, 337–348. <https://doi.org/10.1007/s00442-020-04673-1>

552 Cushman JC. (2001). Crassulacean Acid Metabolism: a plastic photosynthetic adaptation to  
553 arid environments. *Plant Physiology*, **127**, 1439–1448. <https://doi.org/10.1104/pp.010818>

554 Cuzzuol GRF, Clippel JK. (2009). Aspectos ecofisiológicos de *Sinningia aghensis* Chautems  
555 em condições de campo. *Hoehnea*, **36**, 73-81. <https://doi.org/10.1590/S2236-89062009000100002>

556  
557 Dawson TE, Goldsmith GR. (2018). The value of wet leaves. *New Phytologist*, **219**, 1156–  
558 1169. <https://doi.org/10.1111/nph.15307>

559 Deines, P. (1980). The isotopic composition of reduced organic carbon. In Fritz P, Fontes J,  
560 (Eds.) Ch. *Handbook of environmental isotope geochemistry. The Terrestrial Environment.*  
561 Elsevier, New York, USA: 329-406. [https://doi.org/10.1016/B978-0-444-41780-0.50015-](https://doi.org/10.1016/B978-0-444-41780-0.50015-8)  
562 [8](https://doi.org/10.1016/B978-0-444-41780-0.50015-8)

563 de la Riva EG, Olmo M, Poorter H, Ubersa JL, Villar R. (2016). Leaf mass per area (LMA) and  
564 its relationship with leaf structure and anatomy in 34 Mediterranean woody species along  
565 a water availability gradient. *PloS One*, **11**, e0148788.  
566 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148788>

567 Eggli U, Nyffeler R. (2009). Living under temporarily arid conditions-succulence as an  
568 adaptive strategy. *Bradleya*, **2009**, 13-36. <https://doi.org/10.25223/brad.n27.2009.a10>

569 Ehleringer JR, Osmond CB. (1989). Stable isotopes. In Pearcy RW, Ehleringer JR, Mooney  
570 HA, Rundel PW. *Plant physiological ecology: field methods and instrumentation.* (Eds.)  
571 Chapman & Hall, 281-300. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-2221-1\\_13](https://doi.org/10.1007/978-94-009-2221-1_13)

572 Eller CB, Lima AL, Oliveira RS. (2013). Foliar uptake of fog water and transport belowground  
573 alleviates drought effects in the cloud forest tree species, *Drimys brasiliensis*  
574 (Winteraceae). *New Phytologist*, **199**, 151–162. <https://doi.org/10.1111/nph.12248>

575 Eller CB, Lima AL, Oliveira RS. (2016). Cloud forest trees with higher foliar water uptake  
576 capacity and anisohydric behavior are more vulnerable to drought and climate change. *New*  
577 *Phytologist*, **211**, 489–501. <https://doi.org/10.1111/nph.13952>

578 Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (1982). Levantamento de  
579 reconhecimento de média intensidade dos solos e avaliação da aptidão agrícola das terras  
580 do Triângulo Mineiro. Rio de Janeiro, 526 (Boletim de Pesquisa, 1).

581 Freschi L, Azevedo LVG, Purgatto E, Mercier H. (2007). Sinalização hormonal da indução da  
582 fotossíntese CAM em bromélia epífita C3-CAM facultativa submetida ao estresse hídrico.  
583 *Revista Brasileira de Biociências*, **5**, 468-470.

584 Fu PL, Liu WJ, Fan ZX, Cao KF. (2016). Is fog an important water source for woody plants in  
585 an Asian tropical karst forest during the dry season? *Ecohydrology*, **9**, 964–972.  
586 <https://doi.org/10.1002/eco.1694>

587 Fundação João Pinheiro. (1975). Plano de Conservação, Valorização e Desenvolvimento de  
588 Ouro Preto e Mariana. Minas Gerais: Belo Horizonte.

589 Gibson AC. (1982). The anatomy of succulence. In: Ting IP, Gibbs M, eds. *Crassulacean Acid*  
590 *Metabolism*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, USA: 1–17.

591 Gui Z, Li L, Qin S, Zhang Y. (2021). Foliar water uptake of four shrub species in a semi-arid  
592 desert. *Journal of Arid Environments*, **195**, 104629.  
593 <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2021.104629>

594 Goldsmith GR, Matzke NJ, Dawson TE. (2013). The incidence and implications of clouds for  
595 cloud forest plant water relations. *Ecology Letters*, **16**, 307–314.  
596 <https://doi.org/10.1111/ele.12039>

597 Gotsch SG, Asbjornsen H, Goldsmith GR. (2016). Plant carbon and water fluxes in tropical  
598 montane cloud forests. *Journal of Tropical Ecology*, **32**, 404–420.  
599 <https://doi.org/10.1017/S0266467416000341>

600 Gotsch SG, Nadkarni N, Darby A, Glunk A, Dix M, Davidson K, Dawson T. (2015). Life in  
601 the treetops: ecophysiological strategies of canopy epiphytes in a tropical montane cloud  
602 forest. *Ecological Monographs*, **85**, 393–412. <https://doi.org/10.1890/14-1076.1>

603 Griffiths H, Lüttge Ü, Stimmel KH, Crook CE, Griffiths NM, Smith JAC. (1986). Comparative  
604 ecophysiology of CAM and C3 bromeliads. III. Environmental influences on CO<sub>2</sub>  
605 assimilation and transpiration. *Plant, Cell & Environment*, **9**, 385–393.  
606 <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1986.tb01752.x>

607 Grime JP. (2001). *Plant strategies, vegetation processes and ecosystem properties*. (2nd ed).  
608 John Wiley & Sons, Chichester, UK: 417.



609 Guzmán-Delgado P, Mason Earles J, Zwieniecki MA. (2018). Insight into the physiological  
610 role of water absorption via the leaf surface from a rehydration kinetics perspective. *Plant,*  
611 *Cell & Environment*, **41**, 1886-1894. <https://doi.org/10.1111/pce.13327>

612 Hágater E, Soto-Arenas MÁ, Salazar-Chávez GA, Jiménez R, López-Rosas MA, Dressler RL.  
613 (2005). *Las orquídeas de México*. Instituto Chinoín México, México, D.F: 304.

614 Hayes MA, Chapman S, Jesse A, O'Brien E, Langley JA, Bardou R, Devaney J, Parker JD,  
615 Cavanaugh KC. (2020). Foliar water uptake by coastal wetland plants: A novel water  
616 acquisition mechanism in arid and humid subtropical mangroves. *Journal of Ecology*, **108**,  
617 2625-2637. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13398>

618 Herrera A, Ballestrini C, Tezara W. (2008). Nocturnal sap flow in the C3-CAM species, *Clusia*  
619 *minor*. *Trees*, **22**, 491–497. <https://doi.org/10.1007/s00468-008-0209-8>

620 Holanda AER, Souza BC, Carvalho ECD, Oliveira RS, Martins FR, Muniz CR, Costa RC,  
621 Soares AA. (2019). How do leaf wetting events affect gas exchange and leaf lifespan of  
622 plants from season- ally dry tropical vegetation? *Plant Biology*, **21**, 1097-1109.  
623 <https://doi.org/10.1111/plb.13023>

624 Karremans AP, Chinchilla IF, Rojas-Alvarado G, Cedeño-Fonseca M, Damián A, Léotard G.  
625 (2020). A reappraisal of neotropical *Vanilla*. With a note on taxonomic inflation and the  
626 importance of alpha taxonomy in biological studies. *Lankesteriana*, **20**, 395-497.  
627 <http://dx.doi.org/10.15517/lank.v20i3.45203>

628 Kerhoulas LP, Weisgrau AS, Hoeft EC. (2020). Vertical gradients in foliar physiology of tall  
629 *Picea sitchensis* trees. *Tree Physiology*, **40**, 321-332.  
630 <https://doi.org/10.1093/treephys/tpz137>

631 Kluge M, Ting IP. (1978). *Crassulacean Acid Metabolism: analysis of an ecological*  
632 *adaptation*. Ecological Studies. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.  
633 <https://doi.org/10.1007/978-3-642-67038-1>

- 634 Laube S, Zotz G. (2003). Which abiotic factors limit vegetative growth in a vascular epiphyte?  
635 *Functional Ecology*, **17**, 598-604. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.2003.00760.x>
- 636 Li S, Xiao HL, Zhao L, Zhou MX, Wang F. (2014). Foliar water uptake of *Tamarix ramosissima*  
637 from an atmosphere of high humidity. *The Scientific World Journal*, **2014**, 1-10.  
638 <https://doi.org/10.1155/2014/529308>
- 639 Liang X, Su D, Yin S, Wang Z. (2009). Leaf water absorption and desorption functions for  
640 three turfgrasses. *Journal of Hydrology*, **376**, 243-248.  
641 <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2009.07.035>
- 642 Limm EB, Simonin KA, Bothman AG, Dawson TE. (2009). Foliar water uptake: a common  
643 water acquisition strategy for plants of the redwood forest. *Oecologia*, **161**, 449-459.  
644 <https://doi.org/10.1007/s00442-009-1400-3>
- 645 Liu Z, Zhang H, Yu X, G. Jia, Jiang J. (2021). Evidence of foliar water uptake in a conifer  
646 species. *Agricultural Water Management*, **255**, 106993.  
647 <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2021.106993>
- 648 Lüttge U. (1986). Nocturnal water storage in plants having Crassulacean acid metabolism.  
649 *Planta*, **168**, 287-289.
- 650 Lüttge U. (2010). Ability of Crassulacean acid metabolism plants to overcome interacting  
651 stresses in tropical environments. *AoB Plants*, **2010**, plq005.  
652 <https://doi.org/10.1093/aobpla/plq005>
- 653 Lüttge U. (2019). Functional diversity of photosynthesis, plant-species diversity, and habitat  
654 diversity. In *Progress in Botany*, Springer, Cham, **81**, 323-351.  
655 [https://doi.org/10.1007/124\\_2019\\_28](https://doi.org/10.1007/124_2019_28)
- 656 Mantovani A. (1999). Leaf morpho-physiology and distribution of epiphytic aroids along a  
657 vertical gradient in a Brazilian rain forest. *Selbyana*, **20**, 241-249.

658 Martin CE, von Willert DJ. (2000). Leaf epidermal hydathodes and the ecophysiological  
659 consequences of foliar water uptake in species of *Crassula* from the Namib Desert in  
660 southern Africa. *Plant Biology*, **2**, 229–242. <https://doi.org/10.1055/s-2000-9163>

661 Martin CE, Hsu RC, Lin TC. (2009). The relationship between CAM and leaf succulence in  
662 two epiphytic vines, *Hoya carnos*a and *Dischidia formosana* (Asclepiadaceae), in a  
663 subtropical rainforest in northeastern Taiwan. *Photosynthetica*, **47**, 445-450.  
664 <https://doi.org/10.1007/s11099-009-0068-6>

665 Moreira ASFP, Lemos-Filho JP, Zotz G, Isaias RMS. (2009). Anatomy and photosynthetic  
666 parameters of roots and leaves of two shade-adapted orchids, *Dichaea cogniauxiana* Shltr.  
667 and *Epidendrum secundum* Jacq. *Flora*, **204**, 604-611.  
668 <https://doi.org/10.1016/j.flora.2008.08.003>

669 Moreira ASFP, de Lemos Filho JP, dos Santos Isaias RM. (2013). Structural adaptations of two  
670 sympatric epiphytic orchids (Orchidaceae) to a cloudy forest environment in rocky  
671 outcrops of Southeast Brazil. *Revista de Biología Tropical*, **61**, 1053-1065.

672 Munné-Bosch S. (2010). Direct foliar absorption of rainfall water and its biological significance  
673 in dryland ecosystems. *Journal of Arid Environments*, **74**, 417-418.  
674 <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2009.09.001>

675 Negreiros D, Le Stradic S, Fernandes GW, Rennó HC. (2014). CSR analysis of plant functional  
676 types in highly diverse tropical grasslands of harsh environments. *Plant ecology*, **215**, 379–  
677 388. <https://doi.org/10.1007/s11258-014-0302-6>

678 Nelson EA, Sage TL, Sage RF. (2005). Functional leaf anatomy of plants with Crassulacean  
679 acid metabolism. *Functional Plant Biology*, **32**, 409-419. <https://doi.org/10.1071/FP04195>

680 Nelson EA, Sage RF. (2008). Functional constraints of CAM leaf anatomy: tight cell packing  
681 is associated with increased CAM function across a gradient of CAM expression. *Journal*  
682 *of experimental botany*, **59**, 1841-1850. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm346>

683 Niechayev NA, Pereira PN, Cushman JC. (2019). Understanding trait diversity associated with  
684 Crassulacean acid metabolism (CAM). *Current Opinion in Plant Biology*, **49**, 74-85.  
685 <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.06.004>

686 Ogburn RM, Edwards EJ. (2012). Quantifying succulence: a rapid, physiologically meaningful  
687 metric of plant water storage. *Plant, Cell & Environment*, **35**, 1533-1542.  
688 <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2012.02503.x>

689 Ogburn RM, Edwards EJ. (2013). Repeated origin of three-dimensional leaf venation releases  
690 constraints on the evolution of succulence in plants. *Current Biology*, **23**, 722–726.  
691 <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.03.029>

692 Oliveira RS, Dawson TE, Burgess SSO, Nepstad DC. (2005). Hydraulic redistribution in three  
693 Amazonian trees. *Oecologia*, **145**, 354–363. <https://doi.org/10.1007/s00442-005-0108-2>

694 Oliveira RS, Christoffersen BO, Barros FV, Teodoro GS, Bittencourt P, Brum-Jr MM, Viani  
695 RAG. (2014a). Changing precipitation regimes and the water and carbon economies of  
696 trees. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, **26**, 65–82.  
697 <https://doi.org/10.1007/s40626-014-0007-1>

698 Oliveira RS, Eller CB, Bittencourt PR, Mulligan M. (2014b). The hydroclimatic and  
699 ecophysiological basis of cloud forest distributions under current and projected climates.  
700 *Annals of Botany*, **113**, 909–920. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu060>

701 Pan ZL, Guo W, Zhang YJ, Schreel JD, Gao JY, Li YP, Yang SJ. (2021). Leaf trichomes of  
702 *Dendrobium* species (epiphytic orchids) in relation to foliar water uptake, leaf surface  
703 wettability, and water balance. *Environmental and Experimental Botany*, **190**, 104568.  
704 <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104568>

705 Paul D, Skrzypek G, Fórizs I. (2007). Normalization of measured stable isotopic compositions  
706 to isotope reference scales – a review. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*,  
707 **21(18)**, 3006–3014. <https://doi.org/10.1002/rcm.3185>

708 Pedralli G, Guimarães-Neto AS, Teixeira MD. (2001). Diversidade de anfíbios na região de  
709 Ouro Preto. *Ciência Hoje*, **30**, 70-76.

710 Pereira-Dias F, Santos M. (2015). Adaptive strategies against water stress: a study comparing  
711 leaf morphoanatomy of rupicolous and epiphytic species of Gesneriaceae. *Brazilian  
712 Journal of Botany*, **38**, 911-919. <https://doi.org/10.1007/s40415-015-0180-8>

713 Pires MV, de Almeida AAF, Abreu PP, da Costa Silva D. (2012). Does shading explain  
714 variation in morphophysiological traits of tropical epiphytic orchids grown in artificial  
715 conditions? *Acta Physiologiae Plantarum*, **34**, 2155-2164. [https://doi.org/10.1007/s11738-  
716 012-1016-9](https://doi.org/10.1007/s11738-012-1016-9)

717 Pivovarov A, Sharifi R, Scoffoni C, Sack L, Rundel P. (2014). Making the best of the worst of  
718 times: traits underlying combined shade and drought tolerance of *Ruscus aculeatus* and  
719 *Ruscus microglossum* (Asparagaceae). *Functional Plant Biology*, **41**, 11–24.  
720 <https://doi.org/10.1071/FP13047>

721 Poorter L, Bongers F. (2006). Leaf traits are good predictors of plant performance across 53  
722 rain forest species. *Ecology*, **87**, 1733-1743. [https://doi.org/10.1890/0012-  
723 9658\(2006\)87\[1733:LTAGPO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2006)87[1733:LTAGPO]2.0.CO;2)

724 Poorter H, Niinemets Ü, Poorter L, Wright IJ, Villar R. (2009). Causes and consequences of  
725 variation in leaf mass per area (LMA): a meta-analysis. *New phytologist*, **182**, 565-588.  
726 <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02830.x>

727 Pridgeon AM. (1987). The velamen and exodermis of orchid roots. In: Arditti J. (Eds.) *Orchid  
728 Biology: Reviews and Perspectives*, **4**, 141– 192.

729 Roberts DL, Dixon KW. (2008). Orchids. *Current Biology*, **18**, R325-R329.  
730 <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.02.026>

731 Rodrigues MA, Freschi L, Purgato E, Lima VFGAP, Kerbauy GB. (2013). Ethylene modulates  
732 the developmental plasticity and the growth balance between shoot and root systems in the

733 in vitro grown epiphytic orchid *Catasetum fimbriatum*. *Journal of plant growth regulation*,  
734 **33**, 513-525. <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9399-4>

735 Rosado-Calderón AT, Tamayo-Chim M, de la Barrera E, Ramírez-Morillo IM, Andrade JL,  
736 Briones O, Reyes-García C. (2018). High resilience to extreme climatic changes in the CAM  
737 epiphyte *Tillandsia utriculata* L. (Bromeliaceae). *Physiologia Plantarum*, **168**, 547-562.  
738 <https://doi.org/10.1111/ppl.12805>

739 Rundel PW. (1982). *Water uptake by organs other than roots*. In *Physiological plant ecology*  
740 II. Springer, Berlin, Heidelberg: 111-134. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-68150-9\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-68150-9_5)

741 Scatena VL, Nunes AC. (1996). Anatomia de “*Pleurothallis rupestris*” Lindl. (Orchidaceae)  
742 dos campos rupestres do Brasil. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo*, **15**,  
743 35-43.

744 Schreel JD, Steppe K. (2020). Foliar Water Uptake in Trees: Negligible or Necessary? *Trends*  
745 *in Plant Science*, **25**, 590-603. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.01.003>

746 Schreel JD, von der Crone JS, Kangur O, Steppe K. (2019). Influence of drought on foliar water  
747 uptake capacity of temperate tree species. *Forests*, **10**, 562.  
748 <https://doi.org/10.3390/f10070562>

749 Schreel JD, Leroux O, Goossens W, Brodersen C, Rubinstein A, Steppe K. (2020). Identifying  
750 the pathways for foliar water uptake in beech (*Fagus sylvatica* L.): a major role for  
751 trichomes. *The Plant Journal*, **103**(2), 769-780. <https://doi.org/10.1111/tpj.14770>

752 Schwinning S, Ehleringer JR. (2001). Water use trade-offs and optimal adaptations to pulse-  
753 driven arid ecosystems. *Journal of Ecology*, **89**, 464-480. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.2001.00576.x>

754  
755 Silveira FA, Negreiros D, Barbosa NP, Buisson E, Carmo FF, Carstensen DW, Conceição AA,  
756 et al. (2016). Ecology and evolution of plant diversity in the endangered *campo rupestre*:

757 a neglected conservation priority. *Plant and Soil*, **403**, 129-152.  
758 <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2637-8>

759 Simonin KA, Santiago LS, Dawson TE. (2009). Fog interception by *Sequoia sempervirens* (D.  
760 Don) crowns decouples physiology from soil water deficit. *Plant, Cell & Environment*, **32**,  
761 882–892. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01967.x>

762 Smith JAC, Ingram J, Tsiantis MS, Barkla BJ, Bartholomew DM, Bettey M, Pantoja O,  
763 Pennington AJ. (1996). Transport across the vacuolar membrane in CAM plants. In: Winter  
764 K, Smith JAC, eds. *Crassulacean acid metabolism: biochemistry, ecophysiology and*  
765 *evolution*. Springer, Berlin, Heidelberg: 53-71. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-79060-](https://doi.org/10.1007/978-3-642-79060-7_5)  
766 [7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-79060-7_5)

767 Steppe K, Vandegehuchte MW, Van de Wal BAE, Hoste P, Guyot A, Lovelock CE, Lockington  
768 DA. (2018). Direct uptake of canopy rainwater causes turgor-driven growth spurts in the  
769 mangrove *Avicennia marina*. *Tree Physiology*, **38**, 979– 991.  
770 <https://doi.org/10.1093/treephys/tpy024>

771 Swarts ND, Dixon KW. (2009). Perspectives on orchid conservation in botanic gardens. *Trends*  
772 *in Plant Science* **14**: 590-598. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.07.008>

773 Szarzynski J. (2000). Xeric islands: environmental conditions on inselbergs. In *Inselbergs*.  
774 Springer, Berlin, Heidelberg: 37-48. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-59773-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-59773-2_3)

775 Tobón C, Köhler L, Frumau KFA, Bruijnzeel LA, Burkard R, Schmid S. (2011). Water  
776 dynamics of epiphytic vegetation in a lower montane cloud forest: fog interception, storage,  
777 and evaporation. In *Tropical Montane Cloud Forests: Science for Conservation and*  
778 *Management*. Cambridge University Press, Cambridge, UK: 261–267.  
779 <https://doi.org/10.1017/CBO9780511778384.028>

- 780 Valim EAR, Nalini Jr HA, Kozovits AR. (2013). Litterfall dynamics in a iron-rich rock outcrop  
781 complex in the southeastern portion of the Iron Quadrangle of Brazil. *Acta Botanica*  
782 *Brasilica*, **27**, 286-293. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062013000200005>
- 783 Vendramini F, Diaz S, Gurvich DE, Wilson PJ, Thompson K, Hodgson JG. (2002). Leaf traits  
784 as indicators of resource-use strategy in flora with succulent species. *New phytologist*, **154**,  
785 147–157. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00357.x>
- 786 Vesala T, Sevanto S, Grönholm T, Salmon Y, Nikinmaa E, Hari P, Hölttä T. (2017). Effect of  
787 leaf water potential on internal humidity and CO<sub>2</sub> dissolution: reverse transpiration and  
788 improved water use efficiency under negative pressure. *Frontiers in Plant Science*, **8**, 54.  
789 <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00054>
- 790 Wang X, Xiao H, Cheng Y, Ren J. (2016). Leaf epidermal water absorbing scales and their  
791 absorption of unsaturated atmospheric water in *Reaumuria soongorica*, a desert plant from  
792 the northwest arid region of China. *Journal of Arid Environments*, **128**, 17–29.  
793 <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2016.01.005>
- 794 Wang L, Kaseke KF, Ravi S, Jiao W, Mushi R, Shuuya T, Maggs-Kölling G. (2019).  
795 Convergent vegetation fog and dew water use in the Namib Desert. *Ecohydrology*, **12**,  
796 e2130. <https://doi.org/10.1002/eco.2130>
- 797 Watkins JE, Cardelús CL. (2012). Ferns in an angiosperm world: cretaceous radiation into the  
798 epiphytic niche and diversification on the forest floor. *International Journal of Plant*  
799 *Sciences*, **173**, 695–710. <https://doi.org/10.1086/665974>
- 800 Westoby M, Falster DS, Moles AT, Vesk PA, Wright IJ. (2002). Plant ecological strategies:  
801 some leading dimensions of variation between species. *Annual review of ecology and*  
802 *systematics*, **33**, 125–159. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.33.010802.150452>
- 803 Williams-Linera G, Sosa V, Platas T. (1995). The fate of epiphytic orchids after fragmentation  
804 of a Mexican cloud forest. *Selbyana*, **16**, 36-40.



805 Winter K, Aranda J, Holtum JAM. (2005). Carbon isotope composition and water-use  
806 efficiency in plants with Crassulacean acid metabolism. *Functional Plant Biology*, **32**,  
807 381–388. <https://doi.org/10.1071/FP04123>

808 Winter K, Smith JAC. (1996). An introduction to Crassulacean Acid Metabolism: biochemical  
809 principles and ecological diversity. In: Winter K, Smith JAC. (Eds), *Crassulacean Acid*  
810 *Metabolism. Biochemistry, ecophysiology and evolution*. Berlin, Heidelberg: Springer 1–  
811 13. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-79060-7>

812 Withner CL. (1959). Orchid physiology. In: *The orchids: a scientific survey*. Ronald Press, New  
813 York, NY, USA.

814 Witkowski ETF, Lamont BB. (1991). Leaf specific mass confounds leaf density and thickness.  
815 *Oecologia*, **88**, 486-493. <https://doi.org/10.1007/BF00317710>

816 Wright IJ, Reich PB, Westoby M. (2001). Strategy shifts in leaf physiology, structure and  
817 nutrient content between species of high-and low-rainfall and high-and low-nutrient  
818 habitats. *Functional Ecology*, **15**, 423-434. [https://doi.org/10.1046/j.0269-](https://doi.org/10.1046/j.0269-8463.2001.00542.x)  
819 [8463.2001.00542.x](https://doi.org/10.1046/j.0269-8463.2001.00542.x)

820 Wright IJ, Reich PB, Westoby M, Ackerly DD, Baruch Z, Bongers F, Cavender-Bares J, et al.  
821 (2004). The worldwide leaf economics spectrum. *Nature*, **428**, 821–827.  
822 <https://doi.org/10.1038/nature02403>

823 Wu Y, Song L, Liu W, Liu W, Li S, Fu P, Shen Y, Wu J, Wang P, Chen Q, Lu H. (2018). Fog  
824 water is important in maintaining the water budgets of vascular epiphytes in an Asian  
825 Tropical Karst Forests during the dry season. *Forests*, **9**, 1–14.  
826 <https://doi.org/10.3390/f9050260>

827 Yan X, Zhou M, Dong X, Zou S, Xiao H, Ma XF. (2015). Molecular mechanisms of foliar  
828 water uptake in a desert tree. *AoB Plants*, **7**, plv129. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plv129>

829 Yang Q, Xiao H-l, Zhao L-j, Xiao S-c, Zhou M-x, Li C-z, Zhao L. (2010). Research progress  
830 on water uptake through foliage. *Acta Ecologica Sinica*, **30**, 172–177.  
831 <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2010.04.008>

832 Yang SJ, Sun M, Yang QY, Ma RY, Zhang JL, Zhang SB. (2016). Two strategies by epiphytic  
833 orchids for maintaining water balance: thick cuticles in leaves and water storage in  
834 pseudobulbs. *AoB Plants*, **8**, plw046. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plw046>

835 Zhang SB, Dai Y, Hao GY, Li JW, Fu XW, Zhang JL. (2015). Differentiation of water-related  
836 traits in terrestrial and epiphytic *Cymbidium* species. *Frontiers in Plant Science*, **6**, 260.  
837 <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00260>

838 Zhang Z, Y Yan, Y Tian, J Li, J He, Z Tang. (2015). Distribution and conservation of orchid  
839 species richness in China. *Biological Conservation*, **181**, 64-72.  
840 <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.10.026>

841 Zotz G, Bader MY. (2009). *Epiphytic plants in a changing world global: change effects on*  
842 *vascular and non-vascular epiphytes*. In: Luttge U, Beyschlag W, Budel B, Francis D,  
843 (Eds), *Progress in Botany*, 147–170 pp. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-68421-3\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-540-68421-3_7)

844 Zotz G, Hietz P. (2001). The physiological ecology of vascular epiphytes: current knowledge,  
845 open questions. *Journal of Experimental Botany*, **52**, 2067-2078.  
846 <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.364.2067>

847 Zotz G, Bogusch W, Hietz P, Ketteler N. (2010). Growth of epiphytic bromeliads in a changing  
848 world: the effects of CO<sub>2</sub>, water and nutrient supply. *Acta Oecologica*, **36**, 659-665.  
849 <https://doi.org/10.1016/j.actao.2010.10.003>

850 Zotz G. (2016). *Plants on plants-the biology of vascular epiphytes*. Springer International  
851 Publishing, Cham, Switzerland: 282 pp. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-39237-0>

852 Zotz G, Weigelt P, Kessler M, Kreft H, Taylor A. (2021). EpiList 1.0: A global checklist of  
853 vascular epiphytes. *Ecology*, **102**, e03326. <https://doi.org/10.1002/ecy.3326>

## **Capítulo 2:**

(Normas da revista *Australian Journal of Botany*)

**Hábito aéreo e terrestre das raízes adventícias da hemiepífita *Vanilla  
phaeantha* (Orchidaceae) afeta a composição de epitopos da parede celular ao  
longo da maturação celular**

Jéssica Ferreira de Lima, Vinícius Coelho Kuster, Denis Coelho de Oliveira e

Ana Sílvia Franco Pinheiro Moreira

**Capítulo 2: Hábito aéreo e terrestre das raízes adventícias da hemiepífita *Vanilla phaeantha* (Orchidaceae) afeta a composição de epitopos da parede celular ao longo da maturação celular**

Jéssica Ferreira de Lima, Vinícius Coelho Kuster, Denis Coelho de Oliveira e  
Ana Sílvia Franco Pinheiro Moreira

**Resumo**

Em resposta às restrições impostas pelo hábito epifítico, as orquídeas desenvolveram adaptações que permitem uma maior eficiência no uso da água, por exemplo, um sistema radicular complexo constituído por raízes adventícias. A estrutura e composição da parede celular influenciam na permeabilidade, absorção e no armazenamento de água em raízes. Este trabalho, teve como objetivo avaliar a composição da parede celular em níveis de proteínas, hemicelulose e pectinas em raízes adventícias que crescem aderidas ao forófito, fixadas no solo ou livre de *Vanilla phaeantha*, bem como ao estágio de maturação delas. Análises imunocitoquímica foram utilizadas para verificar a composição das paredes celulares das raízes aéreas e terrestres nos estágios jovem e maduro. Os diferentes tipos de proteínas, hemiceluloses e pectinas foram detectados de forma distinta entre os tipos de raízes e estágios de maturação celular. As raízes aéreas apresentaram uma maior complexidade e presença de pectinas, o que pode favorecer o influxo de água e nutrientes. A baixa marcação de epitopos de pectinas nas raízes terrestres, pode estar relacionada com o transporte apoplástico de íons. Em relação à maturação das raízes, o hábitat aéreo e terrestre, pode modificar os padrões de deposição de compostos como homogalacturonanos. A deposição de xiloglucanos e das proteínas extensinas e arabinogalactanas nas raízes aderidas ao forófito dá suporte mecânico para a epiderme livre. A marcação de hemiceluloses e pectinas nas raízes aéreas, aumentam a rigidez e sustentabilidade celular, corroborando nossa hipótese. Em síntese, o hábito das raízes pode interferir na estrutura das suas paredes celulares.

**Palavras-chave:** desenvolvimento, hemiepífitas, pectinas, proteínas, hemicelulose, Cerrado, Brazil

## **Abstract**

In response to the restrictions imposed by the epiphytic habit, orchids have developed adaptations that allow greater efficiency in the use of water, for example, a complex root system consisting of adventitious roots. The structure and composition of the cell wall influence the permeability, absorption, and storage of water in roots. This work aimed to evaluate the cell wall composition in protein, hemicellulose, and pectin levels in adventitious roots that grow attached to the phorophyte, fixed in the soil or free from *Vanilla phaeantha*, as well as their maturation stage. Immunocytochemical analyzes were used to verify the composition of the cell walls of aerial and terrestrial roots in the young and mature stages. Different types of proteins, hemicelluloses, and pectins were detected differently among root types and cell maturation stages. Aerial roots showed greater complexity and presence of pectins, which may favor the influx of water and nutrients. The low labeling of pectin epitopes in terrestrial roots may be related to the apoplastic transport of ions. Regarding root maturation, aerial and terrestrial habitats can modify deposition patterns of compounds such as homogalacturonans. The deposition of xyloglucans and extensin and arabinogalactan proteins in the roots attached to the phorophyte provides mechanical support to the free epidermis. The labeling of hemicelluloses and pectins in aerial roots increases cellular rigidity and sustainability, corroborating our hypothesis. In summary, the habit of roots can interfere with the structure of their cell walls.

**Keywords:** development, hemiepiphytes, pectins, proteins, hemicellulose, Cerrado, Brazil

## **Introdução**

Plantas epífitas crescem em condições ambientais desfavoráveis, como flutuação na disponibilidade de água e de nutrientes. Tais condições são geralmente atenuadas por traços morfológicos, anatômicos e fisiológicos específicos (Benzing 1990; Proença e Sajo 2008; Macedo 2013; Sailo *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2015; Yang *et al.* 2016; Hoeber e Zotz 2021; Pan *et al.* 2021). Dentre as plantas epífitas, as orquídeas destacam-se com 75% de frequência nesse hábito (Zotz *et al.* 2021). Exibem um sistema radicular especializado e complexo composto por raízes adventícias que permitiram crescer sobre outras plantas (Benzing 1990; Zotz e Winkler, 2013). Essas raízes são aéreas e possuem a função de fixação e absorção de água e minerais dada a presença de tecidos especializados, além de realizarem fotossíntese (Benzing 1990; Moreira *et al.* 2013; Joca *et al.* 2017).

Dentre estes tecidos, destaca-se à presença do velame, uma epiderme especializada simples ou múltipla e constituída por células mortas na maturidade (Benzing 1990; Zotz e Winkler 2013). O velame proporciona uma rápida absorção de água, minimiza a perda de água das raízes, fornece proteção contra os raios UV-B, proteção mecânica e absorção e retenção de nutrientes (Zotz e Winkler, 2013; Chomicki *et al.* 2015; Joca *et al.* 2017; 2020). Além do velame, que pode variar em número de camadas e espessura, com uma forte relação na absorção de água e nutrientes, as raízes aéreas das orquídeas foram reportadas com outras características relacionadas as condições de estresse hídrico, tais como córtex com células grandes e diferentes espessamentos parietais (facilitam o transporte apoplástico), endoderme e exoderme com evidente espessamento de parede, e arcos do xilema maiores que nas suas raízes terrestres (Moreira e Isaias 2008, Thangavelu e Ayyasamy 2017; Joca *et al.* 2017).

Modificações na composição e na estrutura da parede celular vegetal já foram reportadas frente a diferentes fatores abióticos e hábitos de vida, interferindo na

diferenciação e na estrutura celular final (Houston *et al.* 2016; Lorenzo *et al.* 2019; Lana *et al.* 2020). A parede celular é constituída por microfibrilas de celulose, hemiceluloses, pectinas e proteínas (Macedo 2013; Albersheim *et al.* 2011). A celulose é um polissacarídeo constituído por unidades de (1 → 4) -β-D-glucopiranosose que conferem à parede celular resistência à tração, com aumento da porosidade, da adesão e da flexibilidade das células quando associadas às pectinas (Jarvis 1984; Newman 2004; Albersheim *et al.* 2010). As hemiceluloses são bem frequentes na parede celular e são formadas por esqueletos compostos principalmente de hexoses ou pentoses, que podem formar xiloglucanos, heteromananos, heteroxilanos e glucanos de ligação (Pauly *et al.* 2013). Os xiloglucanos (XG) são as hemiceluloses mais encontradas na parede celular e proporcionam o seu afrouxamento e expansão, contribuindo assim na arquitetura e propriedades mecânicas da parede celular (Pauly *et al.* 2013; Kaku *et al.* 2004).

As pectinas são polissacarídeos estruturais relacionados a adesão, rigidez, porosidade e manutenção da hidratação da parede celular. Além disso, podem estar envolvidas com o seu afrouxamento e remodelagem (Albersheim *et al.* 2011; Hamant e Haswell 2017). As pectinas são divididas em três grupos principais, os homogalacturonanos (HGs), rhamnogalacturonanos-I (RGI) e rhamnogalacturonanos (RG) (Ridley *et al.* 2001; Willats *et al.* 2001; Albersheim *et al.* 2011). As proteínas atuam também na estruturação das paredes celulares vegetais, com destaque para as arabinogalactanas (AGPs) e as extensinas (EXTs) por estarem relacionadas com a morfogênese das células vegetais durante o seu crescimento e a sua diferenciação (Gao e Showalter 2000; Albersheim *et al.* 2011). Nas raízes, por exemplo, já foi demonstrado que as AGPs podem auxiliar no alongamento e na expansão das células ao longo do seu desenvolvimento (Willats e Knox, 1996). As EXTs reforçam a parede celular e são

frequentemente encontradas em tecidos maduros após o fim do crescimento primário (Cassab 1998; Sabba e Lulai 2005; Lamport *et al.* 2011).

Alterações na disposição da celulose e composição dos elementos não celulósicos da parede celular influenciam na permeabilidade, absorção e no armazenamento de água em raízes (Albersheim *et al.* 1996, 2011; Joca *et al.* 2017, 2020). Em geral, a presença de uma parede celular rígida com arranjo dinâmico e complexo contribui para o crescimento, desenvolvimento e para a especialização funcional dos tecidos e órgãos, através de eventos de sinalização (Knox 2014; Lorenzo *et al.* 2019). Para 4 espécies de *Catleya* (Orchidaceae), o início da formação da parede primária foi marcado pela deposição de pectinas HGs de alta metilesterificação, seguida pela demetilesterificação durante o seu amadurecimento, bem como deposição de lignina e lipídios no velame, marcado assim a transição para a deposição da parede secundária (Lana *et al.* 2020). Essas e outras características estruturais interferem no fluxo de água e nutrientes nas raízes (Joca *et al.* 2017), porém os estudos com esta temática ainda são incipientes diante da diversidade de plantas e tipos de raízes. Desta forma, estudos com foco na estrutura e composição da parede celular podem auxiliar na compreensão das formas e funções desempenhadas pelas raízes, nos permitindo compreender o papel da parede celular estrutura nos diferentes tipos de raízes.

No gênero *Vanilla* (Orchidaceae) ocorrem espécies com raízes aéreas e terrestres que possuem diferenças estruturais que afetam os seus traços fisiológicos, como o maior calibre do metaxilema nas raízes terrestres, que interfere nas taxas de absorção de água (Stern e Judd 1999). Nas raízes aéreas, ainda são reportados dois subtipos, as que ocorrem fixadas no forófito e as que se encontram livres, como em *Vanilla phaeantha* (Alconcerro 1968; Ferreira *et al.* 2017; Karremans *et al.* 2020). Em trabalho anterior (Lima e Moreira 2022), mostramos que estas raízes possuem diferenças estruturais, como os



espessamentos pericliniais externos da exoderme junto à epiderme e a presença de pelos radiculares. As raízes aéreas e livres apresentam um maior espessamento de parede da exoderme, enquanto as raízes aderidas apresentam pelos radiculares na região em contato com o forófito, e as terrestres em toda a sua circunferência (Lima e Moreira 2022).

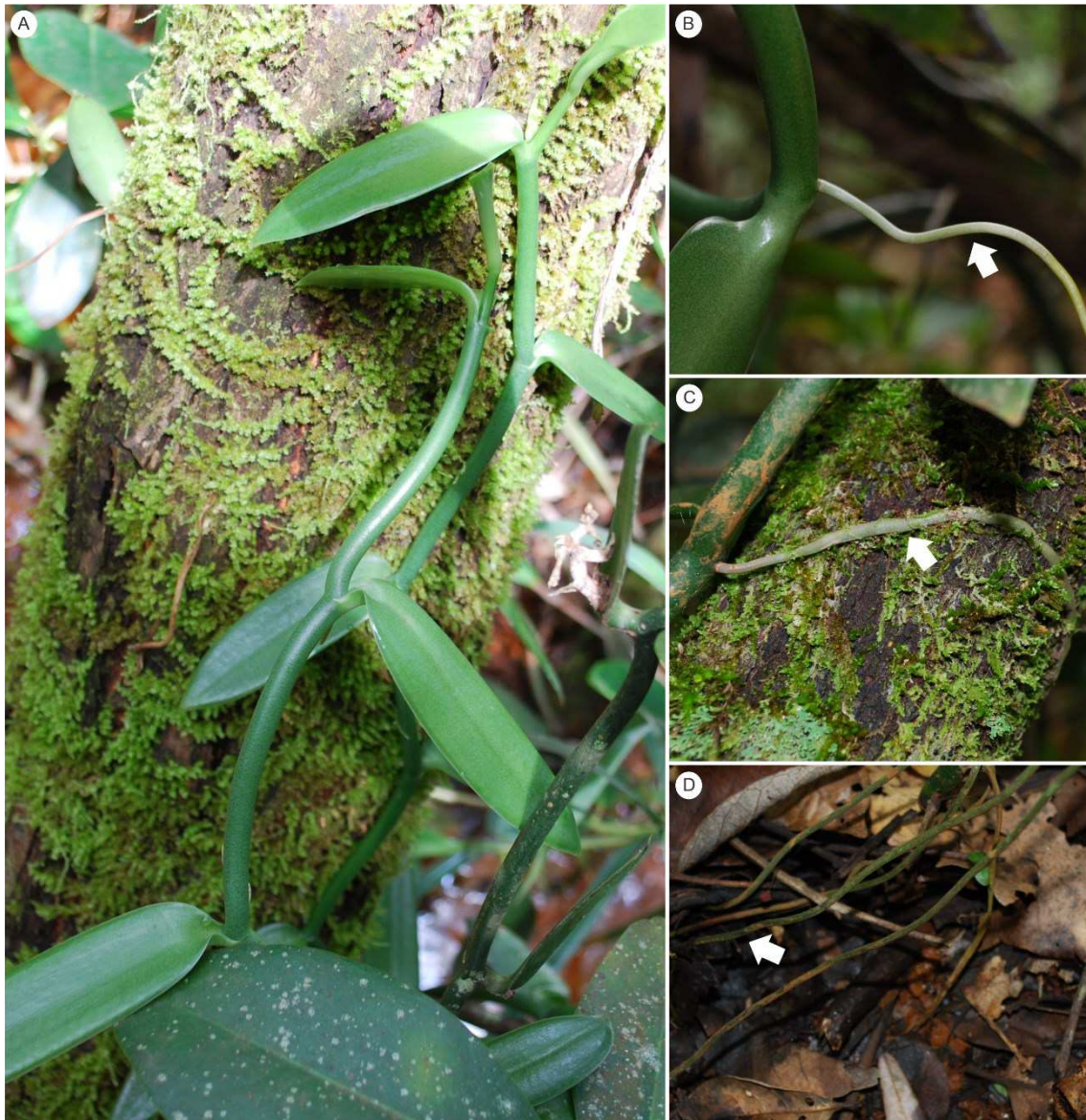
Diante disso, o objetivo do presente trabalho é avaliar a composição de epitopos de proteínas, hemiceluloses e pectinas da parede celular em raízes aéreas (tanto nas fixadas ao forófito quanto nas que crescem livres) e terrestres de *Vanilla phaeantha*, bem como em diferentes estágios de maturação. Aqui, hipotetizamos que epitopos relacionados à sustentação da parede celular, como EXTs e XG, serão marcados principalmente nas raízes aéreas, permitindo maior rigidez dos tecidos e consequente fortalecimento do órgão. Além disso, acreditamos que haverá marcação das HGs de alta metilesterificação e RGI com galactanos nas raízes jovens, permitindo o crescimento, alongamento e flexibilidade celular. Ao mesmo tempo, raízes maduras devem apresentar HGs de baixa metilesterificação e RG com arabinanos, proporcionando aumento na porosidade da parede celular e redução na capacidade de expansão celular.

## **Material e métodos**

### *Área de estudo e espécie vegetal*

O estudo foi realizado no Cerrado em uma mata de galeria (18°43'58.5"S 48°02'58.9"W) localizada no município de Araguari, Minas Gerais, Brasil, a 763 m de altitude. O clima local segundo a classificação de Köppen é tropical com inverno seco (abril a setembro) e estação chuvosa entre os meses de outubro e março. A temperatura e precipitação médias anuais são de 21,4 °C e 126,7 mm, respectivamente (Alvares *et al.* 2013).

*Vanilla* Mill é constituído por 110 espécies predominantemente hemiepífitas e distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais da América do Norte, América do Sul, África e Ásia (Cameron 2011). *Vanilla phaeantha* Rchb.f. pode ser encontrada na América do Norte, Central e América do Sul e Antilhas (Karremans *et al.* 2020). É considerada uma hemiepífita secundária por germinar no solo e estabelecer contato inicial com o forófito, tornando-se epífita pela presença de raízes aderentes, e se reconectando com o solo por meio de suas raízes aéreas (Alconcer 1968; Ferreira *et al.* 2017) (Fig. 1). Nestas plantas, é comum observarmos a presença de três diferentes tipos de raízes adventícias; aquelas que crescem aderidas ao forófito, as que crescem livres nos ramos mais altos em direção ao solo e aquelas que crescem no solo (Lima 2019). As raízes aéreas e livres não apresentam pelos radiculares e possuem um maior espessamento de parede da exoderme. Já as raízes aderidas, apresentam a região livre semelhante às raízes aéreas e a região aderida com características semelhantes às raízes terrestres (pelos radiculares). O número de pólos de xilema nas raízes livres e aderidas ao forófito foi maior que nas fixadas no solo. As raízes que se desenvolvem no hábito terrestre (fixadas ao solo) apresentam diâmetro maior, pelos radiculares e alta infestação de micorrizas (Lima 2019).



**Figura 1:** *Vanilla phaeantha* encontrada em mata de galeria na região de Araguari. Visão geral mostrando o crescimento da hemiepífita sobre o forófito (A). Detalhe das raízes aéreas que crescem livres (B), fixadas ao forófito (C) ou diretamente no solo (raízes terrestres) (D) (setas). (Fotos: Jéssica Ferreira)

#### *Análises imunocitoquímicas*

Para as análises imunocitoquímicas foram coletados no campo fragmentos das raízes de *Vanilla phaeantha* nas porções que crescem livres, aderidas ao forófito e fixadas no solo, nos estágios jovem (1 mm do ápice da raiz) e maduro (3 cm do ápice da raiz) (n = 3). Os fragmentos foram fixados em FAA<sub>50</sub> (formalina, ácido acético, álcool etílico

50% na proporção de 1:1:18 v/v) por 48 horas e armazenados em etanol 70% (Johansen 1940). As amostras foram desidratadas em série etanólica e incluídas em 2-hidroxietil metacrilato Historesin® (Historesin® Leica, Alemanha). Posteriormente, foram seccionadas nos planos transversal e longitudinal em micrótomo rotativo (YD315, ANCAP, Brasil) com 8 µm de espessura, utilizando-se navalhas de aço inox de alto perfil. Os cortes foram colocados em lâminas histológicas e sujeitos às análises de imunocitoquímica.

Para as análises imunocitoquímicas, anticorpos monoclonais que marcam epítopos de proteínas, hemiceluloses e pectinas foram selecionados (Tabela 1). Previamente a incubação com anticorpos monoclonais para detecção de hemiceluloses, as amostras foram pré-tratadas por 2h com 10 µg ml<sup>-1</sup> de pectatoliase (Sigma-Aldrich) em 2 mM do tampão CaCl<sub>2</sub>, 50 mM do ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanossulfônico (CAPS) (Sigma-Aldrich, USA), pH 10. Em seguida, deu-se continuidade com um protocolo único a todas as amostras, sendo os cortes imersos durante 30 min em uma solução bloqueadora de leite em pó Molico®/ tampão fosfato-salino (PBS). Em seguida, os cortes foram incubados em anticorpos primários monoclonais JIM5, JIM7, LM1, LM2, LM5, LM6, LM11, LM15 e LM21 (Centre for Plant Sciences, University of Leeds, UK) (Tabela 1), diluídos 1:10 em leite / PBS, por 2 h. Ao término da incubação, os cortes foram lavados em PBS e novamente incubados no anticorpo secundário FITC (1:100 em 3% leite/PBS), por 2 horas no escuro. O controle foi estabelecido por meio da supressão da incubação com os anticorpos primários.

As lâminas foram montadas em glicerina 50% e observadas no microscópio de fluorescência (DM4000 LED, Leica, Alemanha) acoplado com câmera monocromática HD (DFC3000 G). Foram utilizados os comprimentos de onda de excitação de 450–490 nm e filtro de emissão de 515 nm com filtro DAPI para marcação da autofluorescência

(Chomick *et al.* 2014; Vilela *et al.* 2021), em uma função de sobreposição do software do microscópio para mostrar melhor os resultados de anticorpos monoclonais. Os resultados positivos (+) foram marcados com a coloração verde, enquanto os negativos (-) de azul.

**Tabela 1:** Anticorpos monoclonais primários e epitopos utilizados durante as análises de imunocitoquímica das raízes adventícias de *Vanilla phaeantha* (Orchidaceae).

Monoclonal antibodies	Epitopes	References
<b>Pectins</b>		
<i>Homogalacturonan</i>		
<b>JIM5</b>	Partially (40%) Methylesterified / no ester	Clausen <i>et al.</i> (2003)
<b>JIM7</b>	Partially (15-80%) Methylesterified	Clausen <i>et al.</i> (2003)
<i>Rhamnogalacturonan</i>		
<b>LM6</b>	(1→5)- $\alpha$ -L-arabinan	Willats <i>et al.</i> (1998), Verhertbruggen <i>et al.</i> (2009)
<i>Rhamnogalacturonan-I / Galactan +</i>		
<b>LM5</b>	(1→4)- $\beta$ -D-galactan	Jones <i>et al.</i> (1997), Andersen <i>et al.</i> (2016)
<b>Hemicelluloses</b>		
<i>Heteroxylan</i>		
<b>LM11</b>	(1→4)- $\beta$ -D-xylan / arabinoxylan	McCartney <i>et al.</i> (2005)
<i>Xyloglucan</i>		
<b>LM15</b>	XXXG motif of xyloglucan	Marcus <i>et al.</i> (2008), Ruprecht <i>et al.</i> (2017)
<b>LM21</b>	Heteromannan	Marcus <i>et al.</i> (2010)
<b>Proteins</b>		
<i>Arabinogalactan-protein (AGP) glycan</i>		
<b>LM2</b>	1-linked-GlcA in AGP glycan	Yates <i>et al.</i> (1996), Smallwood <i>et al.</i> (1996)
<i>Extensin</i>		
<b>LM1</b>	Extensin	Smallwood <i>et al.</i> (1995)

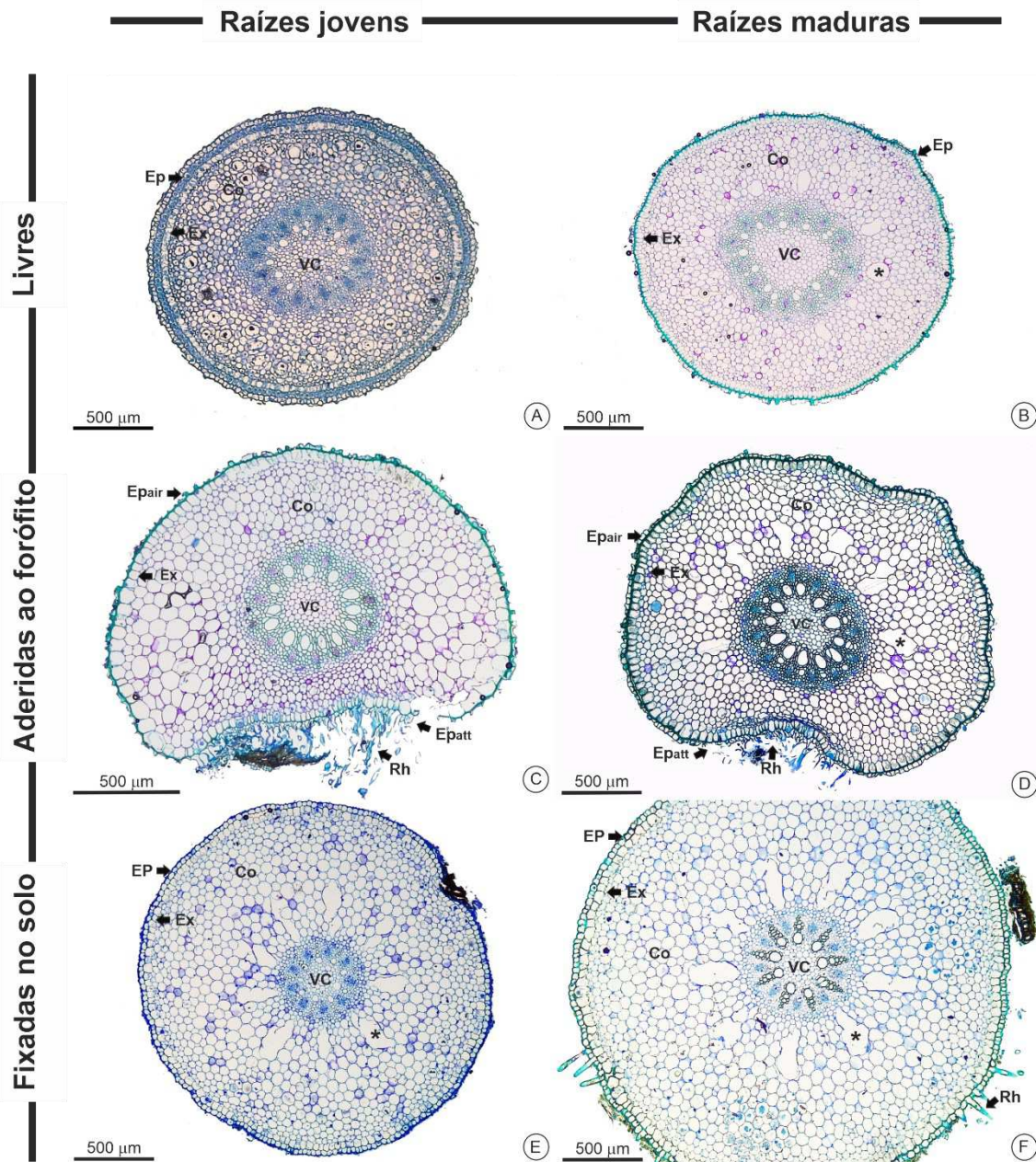
## Resultados

A estrutura radicular de *V. phaeantha* é similar entre as porções que crescem aderidas ao forófito, fixadas no solo e livres, sendo constituída por uma epiderme simples, um córtex parenquimático com lacunas e endoderme e exoderme evidentes (Fig. 2). O cilindro vascular é constituído por xilema poliarco, floema e medula. Nas raízes fixas ao substrato ocorre um abaulamento na região de contato com o forófito, contendo porções

da epiderme livres e aderidas (Fig. 2C e D). As porções aderidas apresentam pelos radiculares, que também aparecem amplamente distribuídos na superfície das raízes terrestres maduras. Em relação aos estágios de maturação, as raízes jovens, livres e aderidas ao forófito, ainda não desenvolveram as lacunas. Nos três tipos de raízes o xilema primário é pouco desenvolvido mesmo nas raízes jovens, enquanto nas maduras o metaxilema já aparece mais evidente.

Os diferentes tipos de proteínas, hemiceluloses e pectinas foram detectados de forma distinta pelos anticorpos monoclonais entre as raízes aéreas, ou seja, aquelas que crescem de forma livre ou aderidas ao forófito, e as raízes terrestres, assim como nos estágios de maturação das raízes (Tabela 2).





**Figura 2:** Secções transversais das raízes de *Vanilla phaeantha* (Orchidaceae) no estágio jovem (A, C e E) e maduro (B, D e F) mostrando a epiderme (seta), exoderme (seta), parênquima cortical, lacunas do aerênquima (\*), o cilindro vascular e os pelos radiculares. A e B: Raiz livre, (A) no estágio jovem (A) e maduro (B). C e D) Raiz aderida ao forófito no estágio jovem (C) e maduro (D). E e F: Raiz fixada no solo no estágio jovem (E) e maduro (F). *Abreviações:* Ep, epiderme; Epair, epiderme livre; Epatt, epiderme aderida ao forófito; Ex, exoderme; Co, parênquima cortical; VC, cilindro vascular; Rh, pelo radicular.

**Tabela 2:** Resultados dos anticorpos primários monoclonais nas raízes livres, aderidas ao forófito e terrestres de *Vanilla phaeantha* (Orchidaceae) nos estágios jovem e maduro. Resultado positivo (+) e negativo (-).

Raiz	Estágio de maturação	Tecido	Anticorpos										
			JIM5	JIM7	LM1	LM2	LM5	LM6	LM11	LM15	LM21		
Livre	Jovem	Ep	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Ex	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
		Co	Pc	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
			En	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
		CV	Fl	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
			Xi	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
	Me	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-		
	Madura	Ep	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
		Ex	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	
		Co	Pc	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
			En	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
		CV	Fl	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
			Xi	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
	Me	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-		
	Aderidas ao forófito	Jovem	Ep	Li	-	-	-	-	-	-	-	+	+
				Ad	+	-	-	-	-	-	-	-	-
			Ex	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
			Co	Pc	+	+	-	-	+	-	-	-	-
En				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CV			Fl	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-
		Xi	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Me		+	+	-	-	+	-	-	-	-	-		
Madura		Ep	Li	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
			Ad	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
		Ex	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	
		Co	Pc	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
			En	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		CV	Fl	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-
Xi			+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	
Me		+	+	-	-	-	-	-	-	-	-		
Fixadas no solo		Jovem	Ep	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Ex	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	Co		Pc	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
			En	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	CV		Fl	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
			Xi	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	Me	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-		
	Madura	Ep	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Ex	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Co	Pc	+	-	-	-	+	-	-	+	+	
			En	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		CV	Fl	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
			Xi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Me	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		



*Abreviações:* Co, Cortex; CV, Cilindro vascular; Ep, Epiderme; Li, Livre; Ad, Aderida; Ex, Exoderme; Pc, Parênquima cortical; En, Endoderme; Fl, Floema; Xi, Xilema e Me, Medula.

#### *Mobilização dos compostos da parede celular durante a maturação*

*Raízes aderidas ao forófito-* Nas raízes jovens, os epitopos de HG de baixa metilesterificação, reconhecidos por JIM5, foram marcados na epiderme na região aderida ao forófito, parênquima cortical e cilindro vascular (Fig. 3A e B). Já os epitopos reconhecidos pelo JIM7, detectaram a presença de epitopos de HG de alto teor de metilesterificação na exoderme, parênquima cortical, floema e medula (Fig. 3C). Os epitopos de XG, identificados pelo LM15 e pelo LM21, foram marcados na epiderme da região livre, no floema e na exoderme (Fig. 3D). O LM6 reconheceu epitopos de (1→5)- $\alpha$ -L-arabinanos somente no floema das raízes jovens. Epitopos de (1→4)- $\beta$ -D-galactanos, reconhecido por LM5, foram marcados no parênquima cortical, floema e medula (Fig. 3E). Nas raízes maduras aderidas ao forófito, os epitopos de HG de baixa metilesterificação, reconhecidos pelo JIM5, foram detectados na epiderme na região livre, parênquima cortical e cilindro vascular (Fig. 4A e B). O JIM7 reconheceu HGs de alta metilesterificação na epiderme da região livre, parênquima cortical e cilindro vascular (Fig. 4C e D). Os epitopos de XG, reconhecidos pelo LM15 e pelo LM21, foram marcados na epiderme, tanto na região livre quanto aderida ao forófito, exoderme, parênquima cortical e floema (Fig. 4E-H). O LM6 foi detectado na epiderme da região livre e no floema, enquanto que o LM5 foi marcado na epiderme da região livre, parênquima cortical, floema e xilema. Os epitopos de EXTs e AGPs, reconhecidos por LM1 e LM2, foram marcados somente na epiderme livre (Fig. 4K e L) e os epitopos de HX, identificados pelo LM11, foram marcados na epiderme da região livre e no floema das raízes maduras (Fig. 4M).

*Raízes livres-* Os epitopos de RGI, XG e HGs foram identificados em ambos os estágios de maturação (Fig. 5). Nas raízes jovens, os epitopos de (1→4)-β-D-galactanos, reconhecidos por LM5, foram identificados na exoderme, parênquima cortical e cilindro vascular (Fig. 5A e B). Os epitopos de HG com baixa metilesterificação, reconhecidos pelo anticorpo JIM5, foram marcados só na epiderme, enquanto os epitopos de HG de alta metilesterificação, reconhecidos pelo JIM7, foram marcados no parênquima cortical, floema, xilema e medula da raiz jovem (Fig. 5C). Os epitopos de xiloglucanos, reconhecidos por LM15, foram encontrados no parênquima cortical e floema (Fig. 5D). Na raiz madura, o LM5 reconheceu epitopos de (1→4)-β-D-galactanos no córtex e no cilindro vascular, enquanto as HGs com baixa metil-esterificação foram amplamente reconhecidos, ocorrendo na epiderme, parênquima cortical, floema, xilema primário e medula (Fig. 5E e F). Os epitopos marcados pelo JIM7, correspondente aos HG com alta metilesterificados, foram reconhecidos no parênquima cortical, floema e xilema (Fig. 5G). Os epitopos de xiloglucanos, marcados pelo LM15, foram identificados na epiderme e exoderme (Fig. 5H). Os epitopos de RG, HX e XG foram marcados somente nos tecidos das raízes maduras. Os epitopos de (1→5)-α-L-arabinanos, detectados por LM6, foram marcados na epiderme e no floema. Os epitopos heteroxilanos foram marcados na epiderme e na exoderme. Os epitopos de heteromananos, identificados por LM21, foram detectados na epiderme, exoderme e parênquima cortical da raiz (Fig. 5I). Os epitopos de EXTs e AGPs, identificados por LM1 e LM2 respectivamente, não foram detectados.

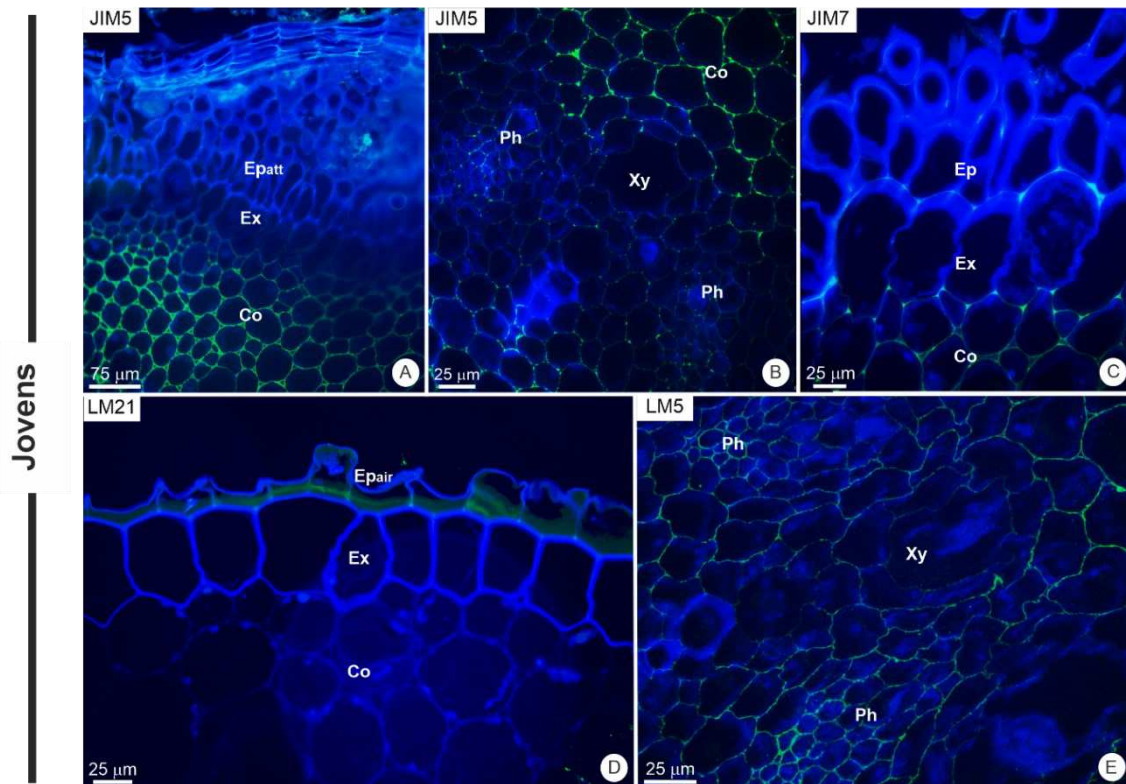
*As raízes fixadas no solo / terrestres--* Ambos os estágios de maturação foram marcados pelos epitopos de rhamnogalacturonanos I (RGI). No estágio jovem, os epitopos de (1→4)-β-D-galactanos, reconhecidos por LM5, foram amplamente detectados em todo o córtex e cilindro vascular (Fig. 6A), enquanto que os epitopos de (1→5)-α-L-arabinanos, reconhecidos por LM6, foram marcados no floema. No estágio

maduro, o epitopo de (1→4)-β-D-galactanos e epitopos de homogalacturano, detectados por LM5 e JIM5 respectivamente, foram marcados no parênquima cortical (Fig. 6B e C). Os epitopos de xiloglucanos, identificados por LM15, foram marcados no parênquima cortical e floema (Fig. 6D), enquanto o LM21 só mostrou heteromananos no parênquima cortical (Fig. 6E). Os epitopos de HG com alta metilesterificação, EXTs, AGPs e heteroxilanos não foram marcados em nenhum dos estágios de maturação.

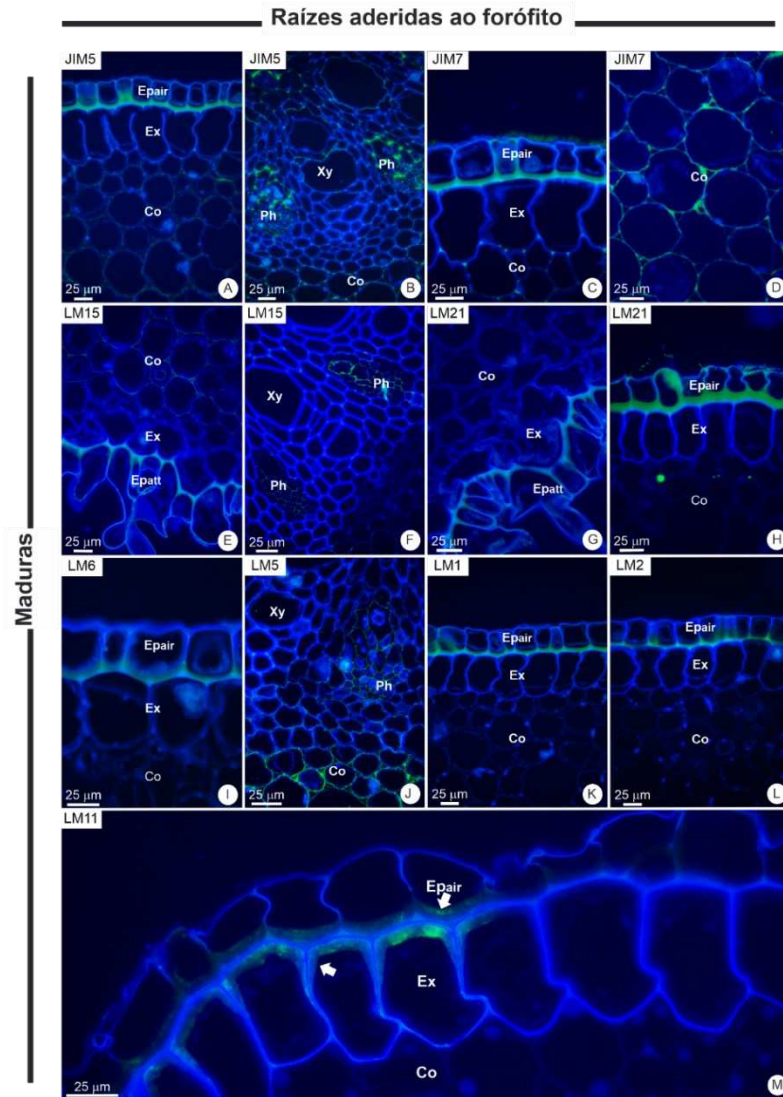
#### *Composição da parede celular em relação ao hábito aéreo e terrestre*

Considerando a relação entre as raízes maduras aéreas livres, aderidas e terrestres. As raízes aderidas ao forófito foram marcadas com todos os anticorpos analisados, ou seja, com epitopos de EXTs, AGPs, heteroxilanos (HX), HGs, RGs e XG. Nas raízes livres somente os epitopos de EXTs, marcados pelo LM1, e AGPs, identificados pelo LM2, não foram detectados. Nas raízes que crescem fixadas no solo, os epitopos de HG de baixa metilesterificação, XG, RG foram marcados. De modo que, os compostos que auxiliam no suporte estrutural da parede celular, ou seja, EXTs e XG, foram detectados em diferentes tipos de raízes. Ambos epitopos foram detectados nas raízes aderidas ao forófito, enquanto somente os epitopos de EXTs e de XG foram detectados nas raízes livres e nas fixadas no solo, respectivamente (Fig. 7).

### Raízes aderidas ao forófito

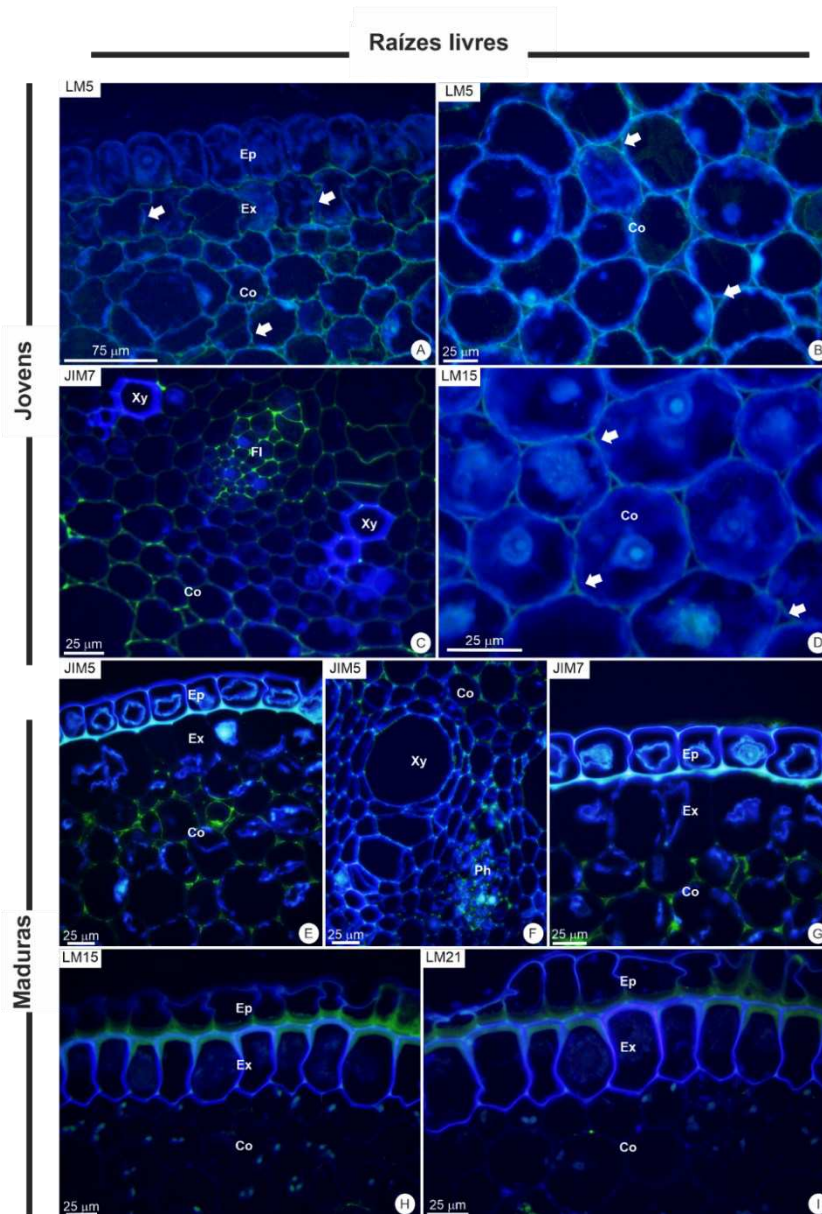


**Figura 3:** Imunocitoquímica para epitopos péciticos e hemicelulósicos em raízes jovens aderidas ao forófito de *Vanilla phaeantha* (Orchidaceae). A e B: HG de baixa metilesterificação, reconhecido pelo JIM5, no parênquima cortical e cilindro vascular. C: HG de alta metilesterificação, reconhecidos pelo JIM7, na exoderme e parênquima cortical. D: Heteromananos, marcados pelo LM21, na epiderme da região livre. D: Epitopos de (1→4)-β-D-galactanos, reconhecido por LM5, no floema e na medula. Marcações em verde indicam resultados positivos, enquanto as azuis os negativos. *Abreviações:* Ep, epiderme; Epair, epiderme livre; Epatt, epiderme aderida ao forófito; Ex, exoderme; Co, parênquima cortical; Ph, floema; Xy, xilema.



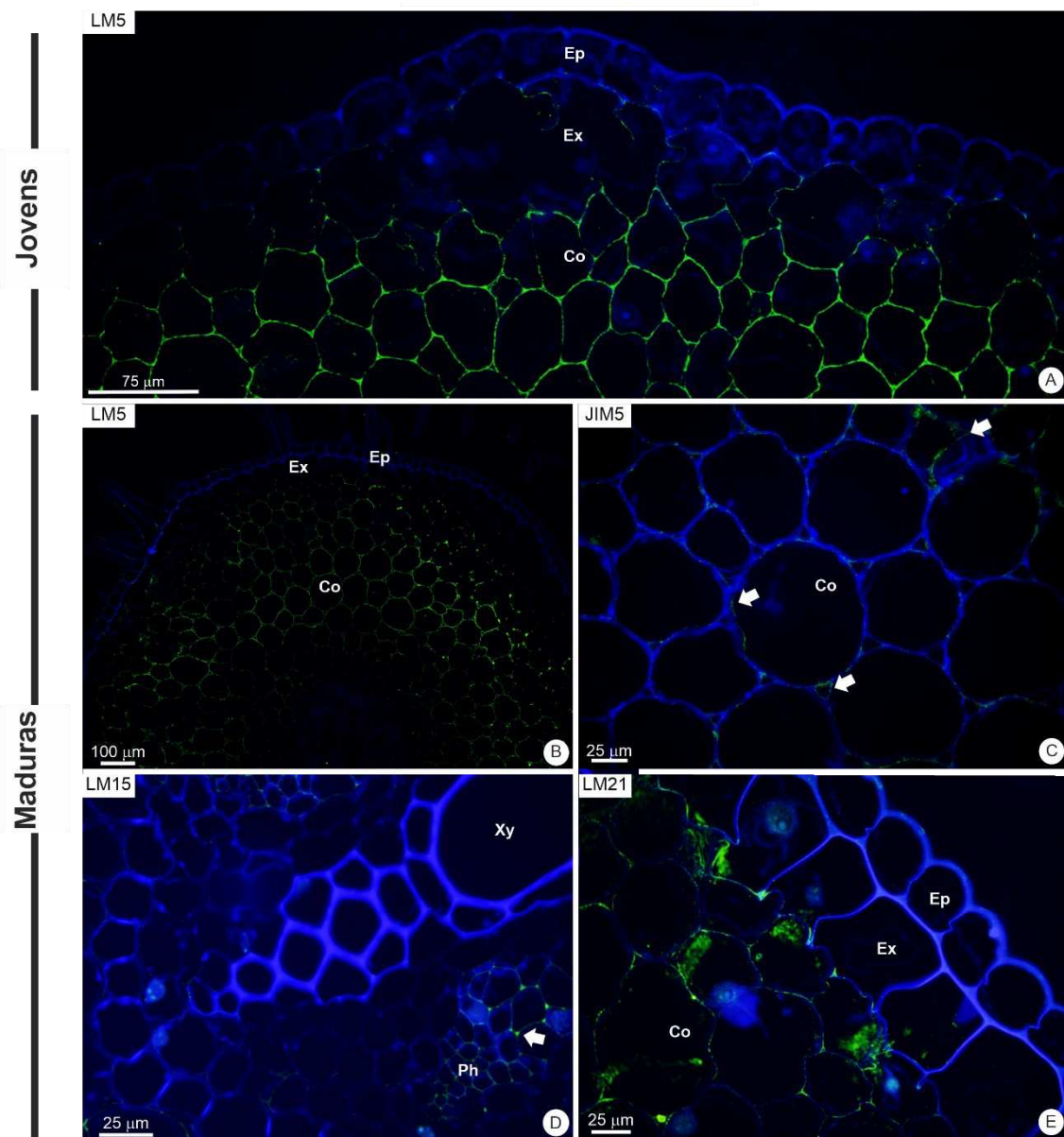
**Figura 4:** Imunocitoquímica para epitopos pécnicos, proteicos e hemicelulósicos em raízes maduras aderidas ao forófito de *Vanilla phaeantha* (Orchidaceae). A e B: HG de baixa metilesterificação, reconhecido pelo JIM5, na epiderme na região livre, parênquima cortical e cilindro vascular. C e D: HG de alta metilesterificação, reconhecidos pelo JIM7, na epiderme da região livre e parênquima cortical. E ao H: Xiloglucanos, marcados pelo LM15 e LM21, na epiderme, tanto na região livre quanto aderida ao forófito, exoderme, parênquima cortical e floema. I: Epitopos de (1→5)- $\alpha$ -L-arabinanos, reconhecidos pelo LM6, na epiderme da região livre. J: Epitopos de (1→4)- $\beta$ -D-galactanos, reconhecido por LM5, na epiderme da região livre, parênquima cortical, floema e xilema. K e L: Extensinas e AGPs, marcados por LM1 e LM2, presentes somente na epiderme livre. M: Heteroxilanos, identificados pelo LM11, na epiderme da região livre. Marcações em verde indicam resultados positivos, enquanto as azuis os negativos. *Abreviações:* Ep, epiderme; Epair, epiderme livre; Epatt, epiderme aderida ao forófito; Ex, exoderme; Co, parênquima cortical; Ph, floema; Xy, xilema.



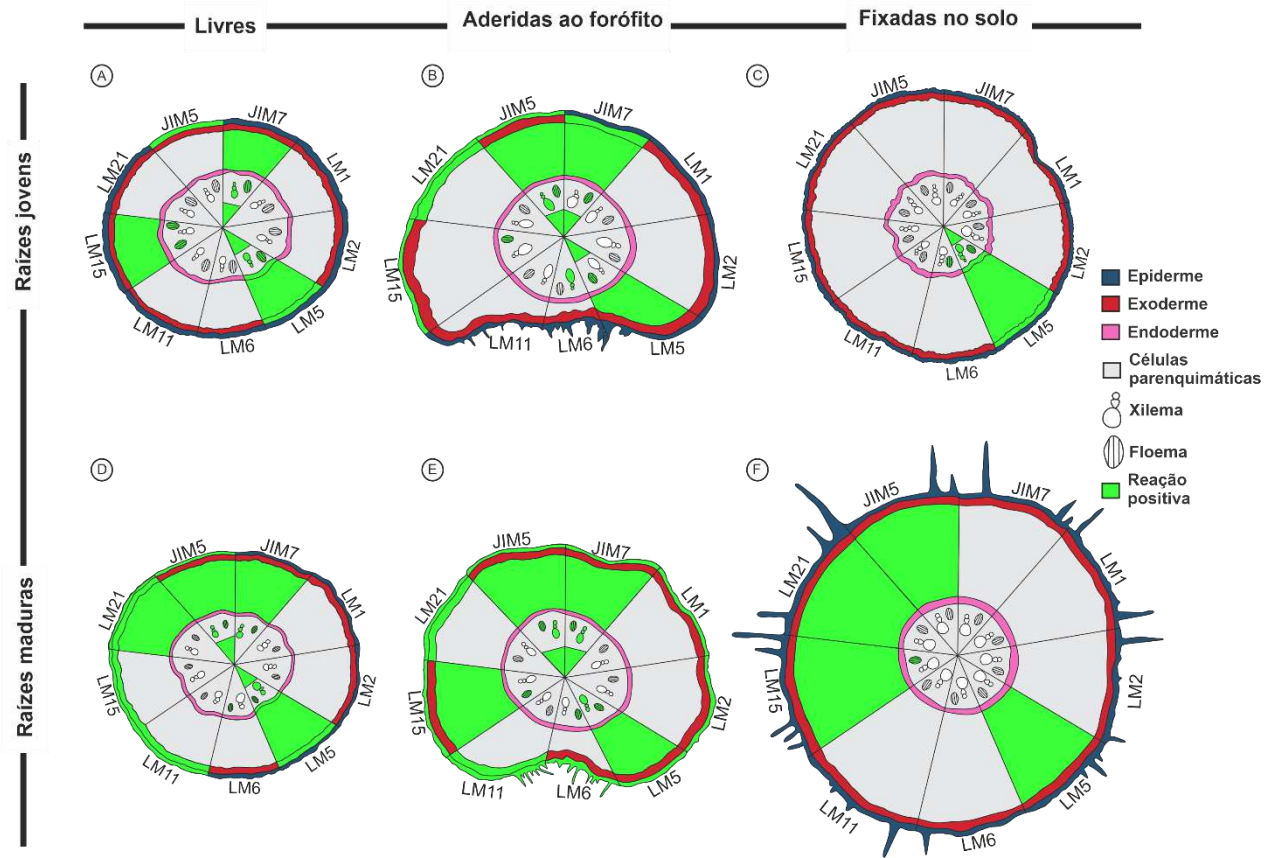


**Figura 5:** Imunocitoquímica para epitopos péclicos e hemicelulósicos de raízes livres (aéreas) no estágio jovem (A-D) e maduro (E-I) de *Vanilla phaeantha* (Orchidaceae). A - B: Epitopos de (1→4)-β-D-galactanos, reconhecido por LM5, na exoderme, parênquima cortical e cilindro vascular. C: HG de alta metilesterificação, reconhecidos pelo JIM7, no parênquima cortical, floema, xilema e medula. D: Xiloglucanos, reconhecidos pelo LM15, no parênquima cortical e floema. E e F: HG com baixa metilesterificação, reconhecido pelo JIM5, amplamente presentes na epiderme, parênquima cortical, floema, xilema primário e medula. G: HG de alta metilesterificação, reconhecidos pelo JIM7, no parênquima cortical. H e I: Xiloglucanos, marcados pelo LM15, na epiderme e exoderme. J: Heteromananos, marcados pelo LM21, detectados na epiderme. Marcações em verde indicam resultados positivos, enquanto as azuis os negativos. *Abreviações:* Ep, epiderme; Ex, exoderme; Co, parênquima cortical; Ph, floema; Xy, xilema.

Raízes fixadas no solo



**Figura 6:** Imunocitoquímica para epitopos pécticos e hemicelulósicos em raízes fixadas no solo (terrestres) jovens (A) e maduras (B-E) de *Vanilla phaeantha* (Orchidaceae). A: Epitopos de (1→4)-β-D-galactanos, reconhecido por LM5, marcados em todo o córtex. B e C: Epitopos de (1→4)-β-D-galactanos, reconhecido por LM5, e HG com baixa metilesterificação, reconhecido pelo JIM5, detectados no parênquima cortical. D e E: Xiloglucanos, marcados pelo LM15 e LM21, no floema e parênquima cortical. Marcações em verde indicam resultados positivos, enquanto as azuis os negativos. *Abreviações:* Ep, epiderme; Ex, exoderme; Co, parênquima cortical; Ph, floema; Xy, xilema.



**Figura 7:** Distribuição de epitopos pécicos, proteicos e hemicelulósicos em raízes aéreas livres (A e D), aderidas ao forófito (B e E) e fixadas no solo (terrestres – C e F) jovens (A-C) e maduras (D-F) de *Vanilla phaeantha* (Orchidaceae). JIM5, HG de baixa metilesterificação; JIM7, HG de alta metilesterificação; LM1, extensinas; LM2, AGPs; LM5, epitopos de RG com galactanos; LM6, epitopos de RG com arabinanos; LM11, heteroxilanos; LM15, xiloglucanos; e LM21, heteromananos.



## Discussão

As raízes adventícias de *V. phaeantha* apresentam uma similaridade estrutural entre os hábitos aéreo e terrestre, porém há uma elevada dissimilaridade na composição de elementos não celulósicos das paredes celulares das suas células, afetando a funcionalidade exercida por elas. Nas raízes aéreas, há um elevado investimento em compostos pécticos, principalmente homogalacturonanos e rhamnogalacturonanos-I, que podem favorecer o influxo de nutrientes e água (Joca *et al.* 2020). Ao mesmo tempo, a parede celular das células das raízes aéreas contém epitopos que promovem maior sustentação estrutural, favorecendo o hábito aéreo. O processo de demetilesterificação dos HGs durante a maturação das raízes seguiu três caminhos distintos, mostrando o papel do ambiente na seleção de características específicas das paredes celulares em raízes.

### *Composição da parede celular em relação ao hábito aéreo e terrestre*

As raízes áreas e terrestres de *Vanilla* geralmente apresentam diferenças anatômicas marcantes (Stern e Judd 1999), porém para *Vanilla phaeantha* a estrutura de suas raízes é bem similar. As características mais plásticas em relação as três condições, livres, aderidas ao forófito e terrestres, foram o diâmetro da raiz, espessamentos periclinais externos da exoderme junto à epiderme e o maior número de lacunas de ar (Lima 2019). Variações ambientais contribuem para alterações estruturais nos órgãos vegetativos, a estrutura da raiz é uma característica adaptativa importante em resposta ao seu ambiente (Pabst e Dungs 1975; Moreira *et al.* 2013; Kong *et al.* 2014). O maior diâmetro das raízes poderia estar relacionado com o maior uso de nutrientes e carbono por unidade de área para sua construção e um menor investimento em área superficial (Zotz 1999; Kong *et al.* 2014). Variações na disponibilidade hídrica no ambiente que as raízes crescem influênciam na maturação da exoderme, e consequentemente, no

desenvolvimento de paredes secundárias na exoderme (Enstone *et al.* 2003). A rápida maturação da exoderme está associada à interrupção do movimento apoplástico de íons e à menores taxas de absorção de água (Enstone *et al.* 2003). O desenvolvimento das lacunas nas raízes pode estar relacionado ao armazenamento de oxigênio (Stern 1997), visto que, solos mais úmidos geralmente aumenta a quantidade de aerênquimas nas raízes (Thangavelu e Ayyasamy 2017). A ausência de pelos radiculares nas raízes livres, corroborando com observações anteriores (Stern e Carlsward 2009; Moreira *et al.* 2013), enquanto a presença de pelos radiculares observados por toda a circunferência das raízes fixadas no solo, evidenciando seu papel na absorção de água e nutrientes.

De forma singular, essa similaridade estrutural foi construída através de paredes celulares com compostos não celulósicos distintos entre raízes aéreas e terrestres, principalmente em relação aos compostos pécnicos e hemicelulósicos. Desta forma, os nossos dados suportam a ideia que a composição da parede celular dos tecidos de *V. phaeantha* não interferiu drasticamente no formato e estrutura de suas células entre os tipos de raízes, mas sim na funcionalidade exercidas por elas. De forma geral, as raízes aéreas possuíram maior marcação de epitopos pécnicos, hemicelulósicos e proteicos que trazem fortalecimento as paredes de suas células, corroborando a nossa hipótese. As pectinas e as hemiceluloses são polissacarídeos sintetizadas no complexo de Golgi das células vegetais e transportados até a parede celular por vesículas (Cosgrove 2005). As pectinas controlam fatores com a adesão celular, força, porosidade, o nível de hidratação e o pH, que reflete na regulação da atividade de proteínas responsáveis por modular a parede celular (Ridley *et al.* 2001; Willats *et al.* 2001).

Para *V. phaeantha*, as raízes aéreas apresentaram ampla marcação de epitopos pécnicos, como os homogalacturonanos de alta e baixa metilesterificação e rhamnogalacturonanos I, em diferentes tecidos, algo pouco observado para as raízes

subterrâneas. As modificações na estrutura dos compostos pécnicos, como no grau de metilesterificação e interação com cátions podem determinar características físicas e funções biológicas da parede celular (Willats *et al.* 2001; Albersheim *et al.* 2011; Oliveira *et al.* 2014; Martini *et al.* 2019). Para orquídeas, as pectinas atuam na estabilidade e sustentação celular, principalmente no velame, além de auxiliar na absorção de nutrientes (Joca *et al.* 2020). As pectinas também são responsáveis pela formação de um gel que aumenta a retenção de água (Albersheim *et al.* 2010; Liu *et al.* 2013;). Nesse sentido, a presença de compostos pécnicos nas paredes celulares das raízes aéreas de *V. phaeantha*, pouco presentes no sistema radicular subterrâneo, aparenta promover uma maior eficiência na captação de água e nutrientes geralmente menos disponíveis nesse ambiente. Além disso, a marcação de homogalacturonanos de baixa metilesterificação nas raízes aéreas, identificados por JIM5, demonstram que ocorre demetilesterificação na parede das células desse órgão, com presença  $Ca_2^+$ , e possível enrijecimento celular (Liu *et al.* 2013; Albersheim *et al.* 2010), promovendo suporte mecânico essencial para raízes aéreas. Assim, a ausência de velame nas raízes aéreas de *V. phaeantha* parece ser suprida pelos tecidos epidérmico, cortical e vascular com potencial para absorção de água e nutrientes. Investimento em pectinas em raízes aéreas também foi reportado para outras espécies de orquídeas epífitas, podendo maximizar a absorção de água pelo velame de suas raízes (Lana *et al.* 2020) ou dar suporte mecânico ao enrijecer as paredes celulares, demonstrado para *Dendrobium fimbriatum* e *Gongora unicolor* (Joca *et al.* 2020).

Nas raízes das orquídeas, o transporte de água da epiderme até o cilindro vascular ocorre via apoplástica através dos espaços intercelulares e parede celular (Willats *et al.* 2001). O grau de metilesterificação das pectinas na parede celular das podem estar relacionados na absorção, retenção e transporte de água (Willats *et al.* 2001; Joca *et al.* 2017, 2020). As pectinas são ricas em ácido galacturônico que contém grupos

carboxílicos de carga negativa (COO<sup>-</sup>) e que funcionam como agentes de troca catiônica (Ridley *et al.* 2001; Willats *et al.* 2001). A presença de pectinas na parede celular promove o acúmulo e transporte de cátions no apoplasto, enquanto os ânions são repelidos (Barberon e Geldner 2014). Em associação, a superfície dos colóides sólidos do solo normalmente possui carga negativa (Uehara e Gillman 1981). A matriz péptica no velame das raízes aéreas de algumas orquídeas epífitas, possui uma correlação com a absorção de nutrientes, sugerindo que a passagem de nutrientes no velame não ocorre inteiramente como fluxo livre, mas também via simplasto (Joca *et al.* 2017). Assim, uma alta presença de pectinas principalmente em tecidos externos em contato com o solo em raízes subterrâneas poderia dificultar o transporte apoplástico de íons, o que pode explicar parcialmente a baixa marcação de epitopos pépticos nas raízes subterrâneas de *V. phaeantha*.

Os compostos hemicelulósicos, encontrados nas raízes aéreas e terrestres de *V. phaeantha*, ficam inseridos na matriz péptica e conferem estabilidade a parede celular (Scheller e Ulvskov 2010). As hemiceluloses mais abundantes na parede celular são os xiloglucanos, e estão conectados fortemente as cadeias de celulose através de ligações de hidrogênio (Hayashi 1989). Em *V. phaeantha*, os xiloglucanos, marcados por LM15 e LM21, foram reportados principalmente para as raízes aéreas, possibilitando suporte mecânico às suas células. A quebra desta ligação de hidrogênio resulta no relaxamento da parede celular e proporciona o crescimento das células (Cosgrove 2005). Em *Nicotiana tabacum*, a quantidade de hemiceluloses na parede celular aumentou após o estresse hídrico, levando a diminuição da expansão celular (Iraki *et al.* 1989), uma vez que os xiloglucanos podem evitar o deslizamento das microfibrilas e, assim, limitar a expansão celular (Cassab 1998). O suporte mecânico promovido na parede das células das raízes aéreas parece ter sido reforçado principalmente na epiderme livre das raízes aderidas ao forófito de *V. phaeantha*, que além de possuírem marcação para xiloglucanos nos estágios

jovem e maduro, também apresentaram marcações para proteínas, como as extensinas e as arabinogalactanas.

As arabinogalactanas são fundamentais para o desenvolvimento das raízes e estão presentes na membrana plasmática, espaços intercelulares e na parede celular (Fincher *et al.* 1983; Komalavilas *et al.* 1991; Hromadová *et al.* 2021). As arabinogalactanas, marcadas por LM2, tem relação com a diferenciação e prevenção da ruptura das células da parede celular (Lamport *et al.* 2006; Mastroberti e Mariath 2008; Hromadová *et al.* 2021). No milho, por exemplo, as arabinogalactanas participam do desenvolvimento das raízes e foram reconhecidos na superfície das raízes e nos pelos radiculares (Samaj *et al.* 1999; Hromadová *et al.* 2021). Já as extensinas, marcadas por LM1, servem para mensurar o enrijecimento da parede celular uma vez que esta possui a função de reforço da mesma (Sabba e Lulai 2005; Lamport *et al.* 2011). Esses dois componentes proteicos ocorreram exclusivamente na epiderme livre das raízes aderidas ao forófito de *V. phaeantha*, demonstrando ter um papel efetivo na diferenciação, prevenção da ruptura e enrijecimento da parede celular da epiderme dessas raízes.

#### *Composição da parede celular em relação a maturação*

A estrutura dos polissacarídeos pécticos varia em resposta a tensões durante o crescimento do órgão vegetal (Ridley *et al.* 2001; Willats *et al.* 2001; Burton *et al.* 2010; Albersheim *et al.* 2011). Dentre as pectinas de parede, destacamos aqui os homogalacturonanos (HGs) que são moléculas constituídas por ácido (1-4)  $\alpha$ -ligado-D-galacturônico sintetizados no complexo de Golgi em um estado de alta metilesterificação (Albersheim *et al.* 2011). Os HGs podem estar relacionados com a proteção mecânica das células e a absorção de água, uma vez que a presença de íons cálcio pode enrijecer a parede celular e levar a formação de géis capazes de maximizar a retenção de água

(Albersheim *et al.* 1996; Willats *et al.* 2001; Liu *et al.* 2013; Albersheim *et al.* 2011). Os HGs são geralmente depositados na parede celular em desenvolvimento na forma metilesterificada, auxiliando no desenvolvimento vegetal, como observado em galhas jovens de *Matayba guianensis* (Wolf e Greiner 2012; de Melo Silva *et al.* 2021).

Naturalmente, as HGs passam por um processo de demetilesterificação mediado pelas enzimas metilesterases (PME) ou poligalacturonases (PG), resultando em novas funções para a parede celular, como o endurecimento (Willats *et al.* 2001; Hongo *et al.* 2012; Jolie *et al.* 2010). Três padrões de deposição e dinâmica de mobilização dos HGs foram encontrados para as raízes de *V. phaeantha*. Para as raízes terrestres a marcação dos HGs ocorreu de forma rara e isolada. As paredes das células das raízes aéreas livres passaram pelo processo demetilesterificação dos HGs entre os estágios de desenvolvimento, permitindo a expansão celular no estágio jovem e um enrijecimento celular final no estágio maduro. Em contrapartida, as raízes aéreas aderidas ao forófito de *V. phaeantha* já apresentaram HGs demetilesterificados no estágio jovem, o que pode indicar um amadurecimento celular precoce. Isso demonstra que as raízes aéreas de *V. phaeantha* possuem padrões de amadurecimento e dinâmica de demetilesterificação dos HGs distintas e de acordo com a aderência ou não ao forófito, trazendo à tona a importância do ambiente na estruturação da parede celular desta espécie.

As raízes aéreas e terrestres de *V. phaeantha* apresentaram elevada marcação de ramnogalacturonanos I com cadeias de (1 → 4)-β-D-galactanos, identificadas pelos LM5, e baixa para cadeias de (1 → 5) α-L-arabinanos, reconhecidas pelo LM6, demonstrando predominância de epitopos associados com a expansão e alongamento celular, como exemplificado em raízes de *Arabidopsis thaliana* (McCartney *et al.* 2003). Para as raízes livres de *V. phaeantha*, a marcação foi constante entre os estágios jovem e maduro, mostrando que as células maduras permanecem funcionalmente abertas para a expansão

de suas células. Nas raízes terrestres, a mobilização desse epitopo é intensa, sendo amplamente marcado no estágio jovem e quase inexistente no maduro. Desta forma, raízes terrestres perdem quase todos os epitopos pécnicos na fase adulta, utilizando apenas os ramnogalacturonanos I com cadeias de (1 → 4)-β-D-galactanos para expansão e alongamento inicial do órgão.

As hemiceluloses nas raízes de *V. phaeantha* foram pouco presentes no estágio jovem, surgindo principalmente após a maturação dos tecidos. Os heteroxilanos e xiloglucanos, como os heteromananos, são polissacarídeos que se reticulam com microfibrilas de celulose e proporcionam paredes celulares mais rígidas (Chen *et al.* 2019), tanto na parede primária quanto na secundária. Para as paredes celulares das raízes de *V. phaeantha*, os diferentes tipos de hemiceluloses testados foram indicadores da maturação celular, porém de forma mais efetiva nas raízes aéreas. Nas raízes aéreas, a marcação ainda se concentrou na epiderme e no córtex, principalmente na exoderme. A exoderme é uma camada externa do córtex que atua como barreira apoplástica, que impede a entrada de determinadas substâncias no cilindro vascular, bem como dificulta o retorno da água do córtex para o solo ou a atmosfera (Ma e Peterson 2003). O espessamento da exoderme, em U ou O, geralmente é associado com a deposição de celulose, lignina e suberina (Ma e Peterson 2003), entretanto os dados obtidos para as raízes de *V. phaeantha* também podem indicar um importante papel das hemiceluloses no espessamento da exoderme e na funcionalidade exercida por ela.

## **Conclusão**

Neste estudo, encontramos diferenças substanciais na composição de componentes não celulósicos da parede celular entre as raízes aéreas e as terrestres da orquídea hemiepífita *Vanilla phaeantha*, bem como durante o processo de maturação

celular. Ramnogalacturonanos I com cadeias de (1 → 4)-β-D-galactanos foram bem presentes nas raízes de *V. phaeantha*, auxiliando no processo de expansão celular. Entretanto, a marcação desse epitopo caiu drasticamente nas raízes terrestres durante a maturação celular, se associando a baixa marcação dos demais compostos pécnicos testados. Desta forma, as raízes aéreas foram as apresentaram uma maior complexidade e presença de pectinas, o que pode favorecer o influxo de água e nutrientes. Além disso, hemiceluloses e pectinas que acentuam a rigidez e sustentabilidade celular apresentaram marcação principalmente nas raízes aéreas, corroborando nossa hipótese. A maturação celular nas raízes de *V. phaeantha* foi marcada por diferentes padrões de deposição e dinâmica de mobilização dos HGs, indicando que o hábito das raízes pode interferir na estrutura das suas paredes celulares.

## Referências

- Albersheim P, Darvill AG, O'Neill MA, Schols HA, Voragen AGJ (1996) An hypothesis: the same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants. In 'Pectins and Pectinases.' (Eds J Visser, AGJ Voragen) pp. 47-53. (Elsevier Sciences B.V.: Amsterdam). [https://doi.org/10.1016/S0921-0423\(96\)80245-0](https://doi.org/10.1016/S0921-0423(96)80245-0)
- Albersheim P, Darvill A, Roberts K, Sederoff A, Staehelin A (2010) 'Plant Cell Walls: from Chemistry to Biology.' (Garland Science: New York). <https://doi.org/10.1201/9780203833476>
- Albersheim, P., Darvill, A., Roberts, K., Sederoff, R., & Staehelin, A. (2011). Cell walls and plant anatomy. Plant Cell Walls; *Garland Science*, New York, NY, USA, 1-42. <https://doi.org/10.1201/9780203833476>
- Alconero R (1968) *Vanilla* root anatomy. *Phyton* **25**, 103-110.
- Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, Goncalves JLM, Sparovek G (2013) Köppen's



- climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift* **22**(6), 711-728.  
<https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>
- Barberon M, Geldner N (2014) Radial transport of nutrients: the plant root as a polarized epithelium. *Plant Physiology* **166**(2), 528-537.  
<https://doi.org/10.1104/pp.114.246124>
- Benzing D (1990) 'Vascular Epiphytes.' (Cambridge University Press: New York).  
<https://doi.org/10.1017/CBO9780511525438>
- Burton RA, Gidley MJ, Geoffrey BF (2010) Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nature Chemical Biology* **10**, 724-732.  
<https://doi.org/10.1038/nchembio.439>
- Cameron KM (2011) *Vanilla* phylogeny and classification. *Handbook of vanilla science and technology* 241-255. <https://doi.org/10.1002/9781444329353.ch14>
- Cassab GI (1998) Plant cell wall proteins. *Annual review of plant biology* **49**(1), 281-309.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.281>
- Chen D, Melton LD, Zujovic Z, Harris PJ (2019) Developmental changes in collenchyma cell-wall polysaccharides in celery (*Apium graveolens* L.) petioles. *BMC plant biology* **19**(1), 1-19. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1648-7>
- Chomicki G, Bidet LPR, Jay-Allemand C (2014) Exodermis structure controls fungal invasion in the leafless epiphytic orchid *Dendrophylax lindenii* (Lindl.) Benth. ex Rolfe. *Flora* **209**, 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2014.01.001>
- Chomicki G, Bidet LPR, Ming F, Coiro M, Zhang X, Wang Y, Baissac Y, Jay-Allemand C, Renner SS (2015) The velamen protects photosynthetic orchid roots against UV-B damage, and a large dated phylogeny implies multiple gains and losses of this function during the Cenozoic. *New Phytologist* **205**, 1330–1341.  
<https://doi.org/10.1111/nph.13106>

- Cosgrove DJ (2005) Growth of the plant cell wall. *Nature reviews molecular cell biology* **6**, 850–861. <https://doi.org/10.1038/nrm1746>
- De Melo Silva AF, Lana LG, Kuster VC, Oliveira DC (2021) Chemical composition of cell wall changes during developmental stages of galls on *Matayba guianensis* (Sapindaceae): perspectives obtained by immunocytochemistry analysis. *The Science of Nature* **108**, 16. <https://doi.org/10.1007/s00114-021-01732-2>
- De Oliveira DC, Magalhaes TA, Ferreira BG, Teixeira CT, Formiga AT, Fernandes GW, Isaias RMDS (2014) Variation in the degree of pectin methylesterification during the development of *Baccharis dracunculifolia* kidney-shaped gall. *PLoS One* **9**(4), e94588. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094588>
- Enstone DE, Peterson CA, Ma F (2003) Root endoderm and exoderm: structure, function, and responses to the environment. *Journal of Plant Growth Regulation* **21**, 335-351. <https://doi.org/10.1007/s00344-003-0002-2>
- Ferreira AWC, de Oliveira MS, Silva EO, Campos DS, Pansarin ER, Guarçoni EAE (2017) *Vanilla bahiana* Hoehne and *Vanilla pompona* Schiede (Orchidaceae, Vanilloideae): two new records from Maranhão state, Brazil. *Check List* **13**, 1131. <https://doi.org/10.15560/13.6.1131>
- Fincher GB, Stone BA, Clarke AE (1983) Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis, and function. *Annual Review of Plant Physiology* **34**(1), 47-70. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.34.060183.000403>
- Gao M, Showalter AM (2000) Immunolocalization of LeAGP-1, a modular arabinogalactan-protein, reveals its developmentally regulated expression in tomato. *Planta* **210**(6), 865-874. <https://doi.org/10.1007/s004250050691>
- Hamant O, Haswell ES (2017) Life behind the wall: sensing mechanical cues in plants. *BMC biology* **15**(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0403-5>

- Hayashi T (1989) Xyloglucans in the primary cell wall. *Annual review of plant biology* **40**(1), 139-168. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.40.060189.001035>
- Hoeber V, Zotz G (2021). Not so stressful after all: Epiphytic individuals of accidental epiphytes experience more favourable abiotic conditions than terrestrial conspecifics. *Forest Ecology and Management* **479**, 118529. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2020.118529>
- Hongo S, Sato K, Yokoyama R, Nishitani K (2012) Demethylesterification of the primary wall by pectin methylesterase provides mechanical support to the *Arabidopsis* stem. *The Plant Cell* **24**(6), 2624-2634. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.099325>
- Houston K, Tucker MR, Chowdhury J, Shirley N, Little A (2016) The plant cell wall: a complex and dynamic structure as revealed by the responses of genes under stress conditions. *Frontiers in plant science* **7**, 984. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00984>
- Hromadová D, Soukup A, Tylová E (2021) Arabinogalactan Proteins in Plant Roots—An Update on Possible Functions. *Frontiers in Plant Science* **12**, 674010. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.674010>
- Iraki NM, Singh N, Bressan RA, Carpita NC (1989) Cell walls of tobacco cells and changes in composition associated with reduced growth upon adaptation to water and saline stress. *Plant Physiology* **91**(1), 48-53. <https://doi.org/10.1104/pp.91.1.48>
- Jarvis MC (1984) Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. *Plant Cell and Environment* **7**, 153-164. <https://doi.org/10.1111/1365-3040.ep11614586>
- Joca TAC, Oliveira DC de, Zotz G, Winkler U, Moreira ASFP (2017) The velamen of epiphytic orchids: Variation in structure and correlations with nutrient absorption. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **230**, 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2017.03.009>

- Joca TAC, de Oliveira DC, Zotz G, Cardoso JCF, Moreira ASFP (2020) Chemical composition of cell walls in velamentous roots of epiphytic Orchidaceae. *Protoplasma* **257**, 103–118. <https://doi.org/10.1007/s00709-019-01421-y>
- Johansen DA (1940) 'Plant Microtechnique'. (Tata McGraw-Hill Book Company: India)
- Jolie RP, Duvetter T, Van Loey AM, Hendrickx ME (2010) Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: a review. *Carbohydrate Research* **345**(18), 2583-2595. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.10.002>
- Kaku T, Tabuchi A, Wakabayashi K, Hoson T (2004) Xyloglucan oligosaccharides cause cell wall loosening by enhancing xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase activity in azuki bean epicotyls. *Plant and cell physiology* **45**(1), 77-82. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch007>
- Karremans AP, Chinchilla IF, Rojas-Alvarado G, Cedeño-Fonseca M, Damián A, Léotard G (2020) A reappraisal of neotropical *Vanilla*. With a note on taxonomic inflation and the importance of alpha taxonomy in biological studies. *Lankesteriana* **20**, 395-497. <http://dx.doi.org/10.15517/lank.v20i3.45203>
- Knox P (2014) Plant cell walls. Disponível em <https://plantcellwalls.leeds.ac.uk/>  
[Verificado 18 Julho 2022]
- Komalavilas PADMINI, Zhu JK, Nothnagel EA (1991) Arabinogalactan-proteins from the suspension culture medium and plasma membrane of rose cells. *Journal of Biological Chemistry* **266**(24), 15956-15965. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)98501-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)98501-7)
- Kong D, Ma C, Zhang Q, Li L, Chen X, Zeng H, Guo D (2014) Leading dimensions in absorptive root trait variation across 96 subtropical forest species. *New Phytologist* **203**(3), 863-872. <https://doi.org/10.1111/nph.12842>
- Lampert DT, Kieliszewski MJ, Showalter AM (2006) Salt-stress upregulates

- arabinogalactan-proteins: using salt-stress to analyse AGP function. *New Phytologist* **169**, 479–492. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01591.x>
- Lampert DT, Kieliszewski MJ, Chen Y, Cannon MC (2011) Role of the extensin superfamily in primary cell wall architecture. *Plant physiology* **156**(1), 11-19. <https://doi.org/10.1104/pp.110.169011>
- Lana LG, Silva AFDM, Buss A, Oliveira DCD, Moreira ASFP (2020) Early development of epiphytic roots: perspectives based on the composition of the velamen cell wall. *Acta Botanica Brasilica* **34**, 633-644. <https://doi.org/10.1590/0102-33062020abb0140>
- Lima JFD. (2019) Plasticidade estrutural das raízes da hemiepífita *Vanilla bahiana* Hoehne (Orchidaceae) em função de suas mudanças funcionais. Universidade Federal de Uberlândia (Dados não publicados).
- Lima JF, Moreira ASFP (2022) Structural plasticity in roots of the hemiepiphyte *Vanilla phaeantha* Rchb.f. (Orchidaceae): a relationship between environment and function. *The Science of Nature* **109**, 46. <https://doi.org/10.1007/s00114-022-01816-7>
- Liu Q, Talbot M, Llewellyn DJ (2013) Pectin methylesterase and Pectin remodelling differ in fibre walls of two *Gossypium* species with very different fibre properties. *PLoS ONE* **8**(6), e65131. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065131>
- Lorenzo G, Ferrari S, Giovannoni M, Mattei B, Cervone F (2019) Cell wall traits that influence plant development, immunity, and bioconversion. *The Plant Journal* **97**, 134–147.
- Ma F, Peterson CA (2003) Current insights into the development, structure, and chemistry of the endodermis and exodermis of roots. *Canadian Journal of Botany* **81**(5), 405-421. <https://doi.org/10.1139/b03-042>
- Macedo AM (2013) Efeito da luminosidade em *Dendrobium*. *UNINGÁ Review* **14**, 85-

98.

- Mastroberti AA, de Araujo Mariath JE (2008) Development of mucilage cells of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). *Protoplasma* **232**(3), 233-245. <https://doi.org/10.1007/s00709-007-0274-7>
- Martini VC, Moreira ASFP, Kuster VC, Oliveira DC (2019) Galling insects as phenotype manipulators of cell wall composition during the development of galls induced on leaves of *Aspidosperma tomentosum* (Apocynaceae). *South African Journal of Botany* **127**, 226-233. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.09.006>
- McCartney L, Steele-King CG, Jordan E, Knox JP (2003) Cell wall pectic (1→4)-β-d-galactan marks the acceleration of cell elongation in the *Arabidopsis* seedling root meristem. *The Plant Journal* **33**(3), 447-454. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01640.x>
- Moreira ASFP, dos Santos Isaias RM (2008) Comparative anatomy of the absorption roots of terrestrial and epiphytic orchids. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **51**, 83–93. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132008000100011>
- Moreira ASFP, de Lemos Filho JP, dos Santos Isaias RM (2013) Structural adaptations of two sympatric epiphytic orchids (Orchidaceae) to a cloudy forest environment in rocky outcrops of Southeast Brazil. *Revista de Biología Tropical* **61**, 1053-1065.
- Newman RH (2004) Homogeneity in cellulose crystallinity between samples of *Pinus radiata* wood. 91-96. <https://doi.org/10.1515/HF.2004.012>
- Pabst GFJ, Dungs F (1975) *Orchidaceae Brasiliensis*. Brücke-Verlag Schmersow.
- Pan ZL, Guo W, Zhang YJ, Schreel JD, Gao JY, Li YP, Yang SJ (2021) Leaf trichomes of *Dendrobium* species (epiphytic orchids) in relation to foliar water uptake, leaf surface wettability, and water balance. *Environmental and Experimental Botany* **190**, 104568. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104568>

- Pauly M, Gille S, Liu L, Mansoori N, de Souza A, Schultink A, Xiong G (2013) Hemicellulose biosynthesis. *Planta* **238**(4), 627-642. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1921-1>
- Proença SL, Sajo MDG (2008) Rhizome and root anatomy of 14 species of Bromeliaceae. *Rodriguésia* **59**, 113-128. <https://doi.org/10.1590/2175-7860200859106>
- Ridley BL, O'Neill MA and Mohnen D (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* **57**(6), 929-967. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00113-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00113-3)
- Sabba RP, Lulai EC (2005) Immunocytological analysis of potato tuber periderm and changes in pectin and extensin epitopes associated with periderm maturation. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **130**(6), 936-942. <https://doi.org/10.21273/JASHS.130.6.936>
- Sailo N, Rai D, De LC (2014) Physiology of temperate and tropical orchids-an overview. *International Journal of Scientific Research* **3**, 3e7.
- Šamaj J, Baluška F, Bobák M, Volkmann D (1999) Extracellular matrix surface network of embryogenic units of friable maize callus contains arabinogalactan-proteins recognized by monoclonal antibody JIM4. *Plant cell reports* **18**(5), 369-374. <https://doi.org/10.1007/s002990050588>
- Scheller HV, Ulvskov P (2010) Hemicelluloses. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**, 263–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>
- Stern WL (1997) Vegetative anatomy of subtribe Habenariinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **125**, 211-227. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1997.tb02255.x>
- Stern WL, Carlswald BS (2009) Comparative vegetative anatomy and systematics of Laeliinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **160**(1), 21-41.

<https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2009.00818.x>

Stern WL, Judd WS (1999) Comparative vegetative anatomy and systematics of *Vanilla* (Orchidaceae). *Botanical journal of the Linnean Society* **131**(4), 353-382.

<https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1999.tb01520.x>

Thangavelu M, Ayyasamy K (2017) Comparative anatomy of aerial and substrate roots of *Acampe praemorsa* (Rox.) Blatt. & McCann. *Flora* **226**, 17-28.

<https://doi.org/10.1016/j.flora.2016.11.001>

Uehara G, Gillman G (1981) 'The mineralogy, chemistry, and physics of tropical soils with variable charge clays.' (Westview Press: Colorado, USA)

Vilela RMIF, Kuster VC, Magalhães TA, Moraes CA, de Paula Filho AC, de Oliveira DC (2021) Impact of *Meloidogyne incognita* (nematode) infection on root tissues and cell wall composition of okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench, Malvaceae).

*Protoplasma* **258**, 979–990. <https://doi.org/10.1007/s00709-021-01618-0>

Willats WG, McCartney L, Mackie W, Knox JP (2001) Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant molecular biology* **47**(1), 9-27.

<https://doi.org/10.1023/A:1010662911148>

Willats WG, Knox JP (1996) A role for arabinogalactan-proteins in plant cell expansion: evidence from studies on the interaction of  $\beta$ -glucosyl Yariv reagent with seedlings of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **9**(6), 919-925.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.9060919.x>

Wolf S, Greiner S (2012) Growth control by cell wall pectins. *Protoplasma* **249**(2), 169-175. <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0371-5>

Yang SJ, Sun M, Yang QY, Ma RY, Zhang JL, Zhang SB (2016) Two strategies by epiphytic orchids for maintaining water balance: thick cuticles in leaves and water storage in pseudobulbs. *AoB Plants* **8**, plw046.



<https://doi.org/10.1093/aobpla/plw046>

Zhang SB, Dai Y, Hao GY, Li JW, Fu XW, Zhang JL (2015) Differentiation of water-related traits in terrestrial and epiphytic *Cymbidium* species. *Frontiers in Plant Science* **6**, 260. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00260>

Zotz G (1999) What are backshoots good for? Seasonal changes in mineral, carbohydrate and water content of different organs of the epiphytic orchid, *Dimerandra emarginata*. *Annals of Botany* **84**, 791–798. <https://doi.org/10.1006/anbo.1999.0983>

Zotz G, Weigelt P, Kessler M, Kreft H, Taylor A (2021) EpiList 1.0: A global checklist of vascular epiphytes. *Ecology*, **102**, e03326. <https://doi.org/10.1002/ecy.3326>

Zotz G, Winkler U (2013) Aerial roots of epiphytic orchids: the velamen radicum and its role in water and nutrient uptake. *Oecologia* **171**, 733–741. <https://doi.org/10.1007/s00442-012-2575-6>

## Considerações finais

No decorrer desta dissertação, foi possível avaliar as estratégias desenvolvidas nas folhas e raízes das orquídeas para lidar com as condições abióticas presentes no ambiente em que crescem. Dentre essas estratégias, podemos citar a absorção foliar de água presente nas orquídeas rupícolas, epífitas e terrestres. As espécies rupícolas vivem em um ambiente com eventos de neblina frequentes e tiveram uma taxa de absorção foliar de água maior que as orquídeas epífitas, indicando a conservação deste recurso. Nossos dados indicam que a FWU está relacionada com as características estruturais das folhas, como a densidade foliar, cujos espaços para o armazenamento de água aumentam com a densidade foliar. Por outro lado, conteúdo de água na folha pode limitar a taxa de absorção foliar de água ao favorecer um alto potencial hídrico foliar. A absorção de água pelas folhas auxilia essas espécies a lidar com as condições de estresse hídrico presentes no ambiente ao promover a hidratação foliar. Além disso, diferentemente do que propusemos no início deste trabalho, a FWU não foi favorecida pelo metabolismo CAM.

Também foi possível concluir que, a composição da parede celular nas raízes adventícias de *V. phaeantha* se alteram durante o processo de maturação celular e varia entre os hábitos aéreo e terrestre. A maior complexidade observada nas raízes aéreas e a forte marcação de compostos pécticos (homogalacturonanos e rhamnogalacturonanos-I) podem favorecer a absorção de água e de nutrientes. A baixa marcação de epitopos pécticos nas raízes terrestres de *V. phaeantha* pode estar relacionada com o transporte apoplástico de íons. Em relação à maturação das raízes, o tipo de hábitat, aéreo ou terrestre, pode interferir na estrutura da parede celular, modificando os padrões de deposição de compostos como homogalacturonanos. Nos estágios jovem e maduro, a deposição de xiloglucanos e das proteínas extensinas e arabinogalactanas dá suporte mecânico para a epiderme livre na região posterior das raízes aderidas ao forófito. As variações na

demetilesterificação dos HGs nas raízes aéreas de *V. phaeantha* possuem padrões de amadurecimento distintos de acordo com a aderência ou não ao forófito, trazendo à tona a importância do ambiente na estruturação da parede celular desta espécie. Já as hemiceluloses foram pouco presentes nas raízes durante seu desenvolvimento, indicando sua relação com a maturação dos tecidos, de forma mais efetiva nas raízes aéreas.

Diante da absorção foliar de água como uma estratégia desenvolvida pelas orquídeas para lidar com a baixa disponibilidade de água do ambiente, esse trabalho traz novas perspectivas para estudos mais aprofundados sobre este processo. Apesar da evidência de que o metabolismo CAM não aumenta as taxas de FWU, pouco se sabe sobre como estes dois processos se relacionam. Mais especificamente, será que o acúmulo dos ácidos orgânicos e a dinâmica de carboidratos associados ao metabolismo CAM podem reduzir o potencial hídrico foliar no período da madrugada e levar à uma maior taxa de absorção de água neste momento. E, considerando a sazonalidade hídrica do Cerrado, será que a taxa de FWU seria maior nos períodos de seca quando a expressão deste metabolismo pode ser favorecida?