

**ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA EM FOLHAS E
PSEUDOBULBOS DE *Cattleya warneri* (CAM) E
Miltonia spectabilis (C₃) SOB DÉFICIT HÍDRICO**

Jadson Bonini Zampirolo

Dissertação de Mestrado em Biodiversidade Tropical

Mestrado em Biodiversidade Tropical

Universidade Federal do Espírito Santo

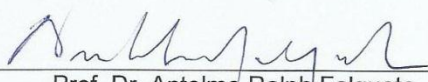
São Mateus, Março de 2016

**“Atividade fotossintética em folhas e pseudobulbos
de *Cattleya warneri* (CAM) e *Miltonia spectabilis* (C3)
sob déficit hídrico”**

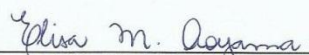
Jadson Bonini Zampirolo

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical, para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Tropical.

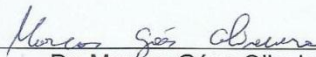
Aprovada: 29/03/2016.



Prof. Dr. Antelmo Ralph Falqueto
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador



Profª. Drª. Elisa Mitsuko Aoyama
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinadora Externa



Dr. Marcos Góes Oliveira
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinador Externo

Dados Internacionais de Catalogação na publicação (CIP)
(Divisão de Biblioteca Setorial do CEUNES - BC, ES, Brasil)

Z26a Zampirollo, Jadson Bonini, 1991-
Atividade fotossintética em folhas e pseudobulbos de *Cattleya warneri* (CAM) e *Miltonia spectabilis* (C3) sob déficit hídrico / Jadson Bonini Zampirollo. – 2016.
105 f. : il.

Orientador: Antelmo Ralph Falqueto.
Coorientador: Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol.
Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Tropical) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Universitário
Norte do Espírito Santo.

1. Pigmentos cloroplastídicos. 2. Déficit hídrico. 3.
Fotossíntese. 4. Orchidaceae. I. Falqueto, Antelmo Ralph. II.
Cuzzuol, Geraldo Rogério Faustini. III. Universidade Federal do
Espírito Santo. Centro Universitário Norte do Espírito Santo. IV.
Título.

CDU: 502

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais Domingos e Dalva...

...Aos meus irmãos Jonathan e Fabrício...

...A minha namorada Nair...

...Aos meus amigos...

Dedico este trabalho.

A dúvida é o princípio da sabedoria.

Aristóteles

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por tudo que têm feito por mim. Por ter me permitido viver momentos incríveis, por ter me ajudado a superar todas as dificuldades, por ter me permitido chegar até aqui.

Ao professor Antelmo Ralph Falqueto, por me orientar mais uma vez. Obrigado por aceitar esse projeto que propus, por aceitar comigo este desafio. Obrigado por me instruir, por colaborar, por me aconselhar e por me mostrar o caminho. Obrigado Mestre!

Aos meus amados pais Domingos Zampirolo e Dalva Bonini Zampirolo, pelo apoio de sempre, pelas palavras de conforto, ou mesmo pelas broncas que sempre vêm na hora certa. Amo vocês!

Aos meus queridos irmãos Jonathan e Fabrício, pela verdadeira amizade e companheirismo, pelas conversas sem sentido, brincadeiras, e pelas brigas também. Elas são importantes.

À minha namorada Nair. Você foi peça fundamental durante o mestrado e vêm sendo na minha vida. Obrigado por me inspirar e não me deixar desistir. Obrigado por aguentar meus surtos. Obrigado por brigar comigo quando necessário. Mas principalmente obrigado por ser minha companheira, por se dedicar por mim e para mim. Te amo!

Aos amigos de longa data, aos quais sempre posso contar, especialmente Luiz Henrique, Jerônimo e Lorrán. Vocês são incríveis.

Agradeço aos colegas e amigos do laboratório, que estiveram em parte ou durante todo o meu Mestrado. Obrigado por fazerem do laboratório um ambiente agradável, por muitas vezes contribuírem com o meu trabalho. Verônica, Thaís, Renata, Rodrigo, Lourdes e André, foi muito bom conviver e compartilhar de ótimos momentos com todos vocês.

Aos colegas e companheiros do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBT), pela construção e troca de conhecimentos, pela diversão. Em especial a Aline, Gabriel e ao Renan, que sempre estiveram mais próximos, inclusive nos momentos das risadas incontroláveis! Valeu demais estudar com vocês!

Aos professores do PPGBT, por compartilharem seu conhecimento e por contribuírem na minha formação.

Ao CNPq pela concessão de bolsa para a pesquisa.

Ao PPGBT e a UFES em São Mateus por me proporcionarem essa experiência única.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	X
RESUMO GERAL.....	XI
ABSTRACT.....	XII
INTRODUÇÃO GERAL.....	13
Referências Bibliográficas.....	16
CAPÍTULO I – Revisão Bibliográfica.....	20
1. Família Orchidaceae.....	20
1.1. <i>Cattleya warneri</i> T. Moore e <i>Miltonia spectabilis</i> Lindl.....	22
2. Ecofisiologia de Orchidaceae.....	24
2.1 Respostas das plantas ao Déficit Hídrico.....	26
2.2 Mecanismos de tolerância ao déficit hídrico.....	27
2.3 Metabolismos C ₃ e CAM.....	29
2.4 Pigmentos Fotossintéticos.....	32
2.5 Fluorescência da Clorofila <i>a</i>	34
3. Referências Bibliográficas.....	39
CAPITULO II – Analyse of OJIP transients in leaves of two CAM and C₃ epiphytic orchids, <i>Cattleya warneri</i> and <i>Miltonia spectabilis</i> under drought stress.....	52
Abstract.....	52
Introduction.....	53
Materials and methods.....	54
Plant material and culture condition.....	54
Leaf relative water content.....	55
Chlorophyll <i>a</i> fluorescence.....	55
Experimental design and data analyses.....	55
Results.....	56
Discussion.....	57
References.....	61

CAPÍTULO III – Efeitos do déficit hídrico sobre o status hídrico, pigmentos fotossintéticos e fluorescência da clorofila <i>a</i> em folhas e pseudobulbos de orquídeas CAM e C₃.....	70
Resumo.....	70
Abstract.....	71
1. Introdução.....	72
2. Material e Métodos.....	73
2.1. Material vegetal e condições de amostragem.....	73
2.2. Conteúdo relativo de água dos tecidos.....	74
2.3. Pigmentos fotossintéticos.....	74
2.4. Fluorescência da clorofila <i>a</i>	75
2.5. Delineamento experimental e análise de dados.....	76
3. Resultados.....	77
4. Discussão.....	85
5. Referências Bibliográficas.....	93
CONCLUSÕES GERAIS.....	102
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	103
ANEXO.....	105

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Espécies utilizadas no estudo. *Cattleya warneri* T. Moore e *Miltonia spectabilis* Lindl.....22

Figura 2. Distribuição natural das espécies de orquídeas por Estados da Federação. *Cattleya warneri* T. Moore e *Miltonia spectabilis* Lindl.....24

Figura 3. Típico aumento polifásico exibido nas curvas de fluorescência da clorofila *a* em plantas. O transiente é plotado em uma escala de tempo logarítmica entre 50 μ s e 1s. As marcas referem-se aos principais pontos da curva: F_0 (50 μ s, ponto O), F_J (2ms, ponto J), F_I (30ms, ponto I) e $F_P = F_M$ (300ms, ponto P).....37

CAPÍTULO II

Fig. 1. Kinetic of chlorophyll *a* fluorescence normalized between the steps O-P in *Cattleya warneri* and *Miltonia spectabilis* submitted to water deficit (WD) until 90 days.....67

Fig. 2. Kinetic differences of V_{OK} and V_{OJ} obtained after double normalization between the steps O–K [$\Delta V_{OK} = V_{OK(treatment)} - V_{OK(control)}$] showing the L band; and between the steps O–J [$\Delta V_{OJ} = V_{OJ(treatment)} - V_{OJ(control)}$] showing the K band, respectively, in *Cattleya warneri* and *Miltonia spectabilis* submitted to water deficit (WD) until 90 days.68

Fig. 3. Kinetic of chlorophyll *a* fluorescence normalized between steps O-I and I-P *Cattleya warneri* and *Miltonia spectabilis* submitted to water deficit (WD) until 90 days. Relative variable fluorescence between the steps O-I [$V_{OI} = (F_I - F_0) / (F_I - F_0)$] in the interval time between 30 and 300ms; Relative variable fluorescence between the steps I-P [$V_{IP} = (F_P - F_I) / (F_P - F_I)$]; and kinetic differences of V_{IP} : [$\Delta V_{IP} = V_{IP(treatment)} - V_{IP(control)}$].....69

CAPÍTULO III

Figura 1. Conteúdo relativo de água (CRA) em folhas e pseudobulbos de *Cattleya warneri* e *Miltonia spectabilis* submetidas ao déficit hídrico (DH).....77

Figura 2. Cinética da emissão da fluorescência da clorofila *a* normalizada entre os passos O e P em folhas (Fo) e Pseudobulbos (Pb) de *Cattleya warneri* e *Miltonia spectabilis* submetidas ao déficit hídrico (DH) por 90 dias. Curva de fluorescência transiente OJIP da clorofila *a*; Fluorescência variável relativa da clorofila *a*: $V_T = (F_T - F_0) / (F_P - F_0)$; e a diferença cinética de V_T : $\Delta V_T = [V_{T(tratamento)} - V_{T(controle)}]$80

Figura 3. Diferença cinética de V_{OK} e V_{OJ} obtida após a dupla normalização entre os passos O-K [$\Delta V_{OK} = V_{OK(tratamento)} - V_{OK(controle)}$] evidenciando a banda L e entre os passos O-J [$\Delta V_{OJ} =$

$V_{OJ(tratamento)} - V_{OJ(controle)}$] evidenciando a banda K, em folhas (Fo) e pseudobulbos (Pb) de *Cattleya warneri* e *Miltonia spectabilis* submetidas ao déficit hídrico (DH) por 90 dias.....81

Figura 4. Efeitos do déficit hídrico (DH) sobre a fluorescência Inicial (F_0) e a eficiência fotoquímica máxima do FSII (F_v/F_M) em folhas e pseudobulbos de *Cattleya warneri* e *Miltonia spectabilis*.....82

Figura 5. Efeitos do déficit hídrico (DH) sobre parâmetros de fluxos específicos de energia: fluxo de energia absorvida por CR (ABS/RC); Fluxo de energia capturada por CR (TR_0/RC); Fluxo de transporte de energia por CR (ET_0/RC); Fluxo de energia dissipada por CR (DI_0/RC), em folhas e pseudobulbos de *Cattleya warneri* e *Miltonia spectabilis*.....83

Figura 6. Efeitos do déficit hídrico (DH) sobre o rendimento quântico para o transporte de elétrons no FSII (ET_0/ABS); probabilidade de éxciton capturado mover um elétron além da Q_A (ET_0/TR_0); índice de desempenho total medindo a performance até os aceptores de elétrons do FSI (PI_{TOTAL}), em folhas e pseudobulbos de *Cattleya warneri* e *Miltonia spectabilis*.....84

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III

Tabela 1. Concentração de pigmentos fotossintéticos de plantas adultas de <i>Cattleya warneri</i> e <i>Miltonia spectabilis</i> submetidas ao déficit hídrico (DH) por 0, 30, 60 e 90 dias. (Chl <i>a</i> = clorofila <i>a</i> ; Chl <i>b</i> = clorofila <i>b</i> ; Chl total = clorofila total; Chl <i>a</i> /Chl <i>b</i> = razão clorofila <i>a</i> /clorofila <i>b</i> ; Carot = carotenóides).....	78
--	----

RESUMO GERAL

Neste estudo foram avaliadas características ecofisiológicas em folhas e pseudobulbos de espécies de orquídeas epífitas com metabolismo CAM (*Cattleya warneri* T. Moore) e C_3 (*Miltonia spectabilis* Lindl.) submetidas ao déficit hídrico (DH) prolongado (0, 15, 30, 45, 60, 75, e 90 dias.). Para isto, plantas de *C. warneri* e *M. spectabilis* obtidas em um orquidário em João Neiva/ES foram transferidas para orquidário na UFES – Campus de São Mateus/ES, onde avaliações da fluorescência transiente da clorofila *a*, conteúdo relativo de água (CRA) e pigmentos fotossintéticos foram realizadas em folhas e pseudobulbos. Sob DH, o CRA foi significativamente reduzido nas folhas e pseudobulbos de ambas as espécies, porém, de maneira similar entre os órgãos da espécie CAM (a partir dos 30 dias de DH) e mais lentamente nas folhas em relação aos pseudobulbos na espécie C_3 (a partir do DH-60 e DH-30, respectivamente). A concentração de pigmentos fotossintéticos também foi alterada em resposta ao déficit hídrico, com declínios observados na concentração de clorofila *a*, *b* e total e incrementos dos carotenoides nas folhas de ambas as espécies, com acréscimos de todos esses pigmentos nos pseudobulbos de *C. warneri* e nenhuma alteração em *M. spectabilis*. Parâmetros da fluorescência da clorofila *a* revelaram incrementos nas fases O-J, J-I, Bandas-L e K, F_0 , ABS/RC, DI_0 /RC e decréscimos na fase I-P, F_v/F_m , ET_0/TR_0 , ET_0 /ABS e PI_{TOTAL} em folhas e pseudobulbos de ambas as espécies, porém, mais expressivamente nos pseudobulbos de *M. spectabilis* e com certa similaridade entre folhas e pseudobulbos de *C. warneri*. Dessa forma, observou-se que ambas as espécies demonstraram-se vulneráveis ao DH prolongado, com declínios no CRA, fotodestruição dos pigmentos fotossintéticos e declínios nas atividades fotoquímicas, especialmente após o DH-30. Entretanto, a melhor manutenção dos valores de CRA e menor perda do desempenho das reações fotoquímicas observados nas folhas da espécie C_3 , *M. spectabilis*, associadas a um maior comprometimento dos pseudobulbos, indicam que esta espécie apresenta-se mais tolerante ao DH de longo prazo. A explicação para isso pode ser o fato de as folhas senescentes, e, principalmente os pseudobulbos, estarem atuando como órgãos facilitadores na mobilização de água mais eficientemente em *M. spectabilis*, permitindo a manutenção do CRA mais elevado nas folhas jovens com consequente manutenção das atividades fotoquímicas.

Palavras chave: Atividade fotoquímica, *Cattleya warneri*, conteúdo relativo de água, fluorescência da clorofila *a*, *Miltonia spectabilis*, Orchidaceae, pigmentos fotossintéticos, tolerância ao DH.

ABSTRACT

In this study ecophysiological characteristics were evaluated in leaves and pseudobulbs of epiphytic orchids species with CAM (*Cattleya warneri* T. Moore) and C₃ (*Miltonia spectabilis* Lindl.) metabolism under prolonged water deficit (WD) (0, 15, 30, 45, 60, 75, and 90 days). For this, *C. warneri* and *M. spectabilis* plants obtained from a nursery in João Neiva/ES were transferred to nursery in UFES - Campus de São Mateus/ES, where chlorophyll *a* fluorescence transient, relative water content (RWC) and photosynthetic pigments were measured in leaves and pseudobulbs. Under WD, the RWC was significantly reduced in leaves and pseudobulbs of both species, however, in a similar way between the organs of CAM species (as from 30 days of WD - WD-30) and more slowly in the leaves in relation to pseudobulbs in C₃ species (as from WD-60 and WD-30, respectively). The photosynthetic pigments concentration also were changed in response to water deficit, with declines observed in the chlorophyll *a*, *b* and total and increases of carotenoids in the leaves of both species, with increases in all of these pigments in the pseudobulbs of *C. warneri*, and no change in *M. spectabilis*. Chlorophyll *a* fluorescence parameters revealed increases in O-J and J-I phases, L and K-Bands, F₀, ABS/RC, DI₀/RC and decreases in the I-P phase, F_v/F_m, ET₀/TR₀, ET₀/ABS e PI_{TOTAL} in leaves and pseudobulbs of both species, but more markedly in the pseudobulbs of *M. spectabilis* and with certain similarity between leaves and pseudobulbs of *C. warneri*. Thus, it is noted that both species demonstrated vulnerable to prolonged WD, with declines in the RWC, photodestruction of photosynthetic pigments and declines in photochemical activities, especially after the WD-30. However, the better maintenance of RWC values and smaller loss of performance of photochemical reactions observed in leaves of C₃ species, *M. spectabilis*, associated with greater engagement of pseudobulbs indicate that this species is more tolerant to prolonged WD. The explanation for this may be the fact that senescent leaves, and mainly pseudobulbs are acting as facilitators organs in the mobilization of water more effectively in this species, allowing the maintenance of the highest RWC on young leaves with consequent maintenance of photochemical activities.

Keywords: *Cattleya warneri*, Chlorophyll *a* fluorescence, *Miltonia spectabilis*, Orchidaceae, photochemical activity, photosynthetic pigments, relative water content, WD tolerance.

INTRODUÇÃO GERAL

Orchidaceae A. Juss é uma família vegetal com distribuição cosmopolita e destaca-se como um dos maiores grupos de Angiospermas (Dressler, 1993; The Plant List, 2013). São conhecidas mundialmente cerca de 27.800 espécies distribuídas em 899 gêneros (The Plant List, 2013). No Brasil, foram documentadas aproximadamente 2.550 espécies pertencentes a 238 gêneros (Barros et al., 2016), as quais, em sua maioria, ocorrem na Mata Atlântica (Farias e Ribeiro, 2000). Por ter todo o seu território dentro do domínio da Mata Atlântica, o Estado do Espírito Santo apresenta as condições geográficas e climáticas favoráveis, permitindo a presença de grande diversidade deste grupo, que conta atualmente com cerca de 700 espécies, muitas delas também consideradas endêmicas (Waechter, 1996; Barros et al., 2016).

Dentre as principais características das orquídeas, destacam-se a beleza e exuberância de suas flores. Este aspecto faz com que elas apresentem elevado valor como planta ornamental atraindo forte interesse econômico e botânico. Nesse sentido, o cultivo de espécies com características de flores de corte é bastante promissor tanto no mercado nacional como internacional (Mattiuz et al., 2006; Moraes et al., 2009; Macedo et al., 2011). Além da importância ornamental, as orquídeas também fornecem muitos recursos que são explorados pela indústria medicinal, alimentícia e de cosméticos (Kumaria e Tandon, 2001).

Do ponto de vista ecológico, Orchidaceae apresenta importante função nas comunidades vegetais com papel na regulação da biodiversidade e do equilíbrio interativo de espécies. Por constituir um grupo majoritariamente epifítico (cerca de 70% das espécies), possuem a capacidade de elaborar quantidades relevantes de biomassa suspensa em ambientes considerados restritivos em termos de recursos (Gravendeel et al., 2004; Rodrigues et al., 2013; Minardi et al., 2014). Além disso, proporcionam recursos alimentares (frutos, néctar, pólen, água) e microambientes especializados para a fauna do dossel, proporcionando uma alta diversidade de organismos e de interações tróficas (Waechter, 1996).

Por oferecer às plantas condições xerofíticas, como altas radiações, exposição aos ventos e baixas disponibilidades de água e nutrientes, o epifitismo, ocorrente em muitas espécies de orquídeas, é considerado um dos mais severos habitats nas florestas tropicais (He et al., 2013; Rodrigues et al., 2013; Minardi et al., 2014). Dentre os desafios encontrados pelas epífitas, o déficit hídrico (DH) é provavelmente o mais limitante a sua sobrevivência, por influenciar as funções fisiológicas e bioquímicas, incluindo a turgidez celular, abertura estomática e as taxas de transpiração e assimilação de CO₂ (Jones e Corlett, 1992; Chaitanya

et al., 2003; Zobayed et al., 2007; Waseem et al., 2011; He et al., 2013). Assim, para lidar com os desafios impostos pelo DH, muitas espécies de orquídeas dispõem de uma série de adaptações morfológicas e fisiológicas, que incluem presença de folhas carnosas e pseudobulbos – especializados na reserva de água e nutrientes –, raízes aderentes e cobertas por velames – tecido especializado na absorção de água e nutrientes –, além do Metabolismo ácido crassuláceo (CAM) – eficiente custo/benefício em relação ao consumo de água e absorção de CO₂ – (Cushman, 2001; Gravendeel, 2004; Silvera et al., 2010a).

Mesmo com essas estratégias, muitas espécies de orquídeas epífitas são sensíveis a prolongados períodos de DH (Sinclair, 1983; He et al., 2013). Assim, a avaliação do conteúdo relativo de água (CRA) das folhas e pseudobulbos em plantas sob condições de DH tem sido considerada bastante efetiva na avaliação da intensidade dos efeitos do estresse sobre o status hídrico tanto de plantas cultivadas, como nativas, incluindo epífitas (Ko e Piccinni, 2009; Wang et al., 2012; Xu et al., 2012; Rodrigues et al., 2013; Minardi et al., 2014). Caso sejam sensíveis ao DH prolongado, orquídeas epífitas enfrentarão a perda de água, com influências diretas sobre a capacidade fotossintética no que se refere à utilização de energia solar e consequentemente sobre a fixação de carbono (He et al., 2013).

A redução das taxas fotossintéticas está diretamente relacionada à redução do CRA, do potencial hídrico e do fechamento estomático, além da degradação dos pigmentos fotossintéticos. O fechamento estomático, que é regulado pelo ácido abscísico – hormônio que atua como o primeiro sinalizador da resposta ao DH (Cornic, 2000; Chaves et al., 2003; Lawson et al., 2003) – impede a entrada de CO₂ e, durante o DH pode ser causado por danos nos centros de reação (CR) e consequente declínio das reações de transferência de elétrons no fotossistema II (FSII), afetando a produção quântica do aparato fotossintético (Stancato et al., 2001; Santos et al., 2006). O fator de estresse ambiental sobre a atividade do sistema fotossintético das plantas pode causar alterações na fluorescência da clorofila *a* e, sua avaliação, realizada por meio de um método eficiente, não invasivo e amplamente difundido permite rápida obtenção de informações sobre os processos fotoquímicos e não-fotoquímicos que ocorrem nas membranas dos tilacóides dos cloroplastos, contribuindo de uma maneira geral para o entendimento da fisiologia e da ecologia da planta (Krause e Weis, 1991; Oukarroum et al., 2007; Mehta et al., 2010; Yusuf et al., 2010; Adamski et al., 2011; Chen et al., 2015).

As alterações na fase fotoquímica da fotossíntese resultam na dissipação de energia da luz excedente pelo CR do FSII formando espécies reativas de oxigênio (EROs) (O₂⁻, ¹O₂,

H₂O₂, OH⁻) em excesso. Esse material tóxico pode causar danos oxidativos parciais ou severos, como mudanças no estado redox de componentes celulares, peroxidação de membranas lipídicas, inativação de enzimas, oxidação e desnaturação de aminoácidos e proteínas, além de danos ao DNA (Lukatkin et al., 2012; Suzuki et al., 2012; Li et al., 2013; Noctor et al., 2014). Por conseguinte, o decréscimo na assimilação de CO₂ pode também afetar a distribuição, o acúmulo e a mobilização de açúcares na planta uma vez que o estresse eleva as taxas respiratórias nos órgãos fotossintéticos tornando necessário o seu suprimento energético na forma de carboidratos (Stancato et al., 2001).

Como característica comum a outras plantas, orquídeas dispõem de mecanismos de proteção contra os danos causados ao aparato fotossintético pelo estresse fisiológico, como a elevação na biossíntese de pigmentos carotenoides e a conversão de CR's redutores em CR's dissipadores (DI₀/RC), que atuam diretamente na dissipação de energia excedente sobre o aparato fotossintético (Frank et al., 1999; Strasser et al., 2004; Demmig-Adams et al., 2006; Lambers et al., 2008). Além disso, a elevação das concentrações de carotenoides pode também ser importante como mecanismo antioxidante, na eliminação das EROs em plantas que estão em situação de DH (Pompelli et al., 2010; Gholami et al., 2012).

Para lidar com as demandas energéticas em órgão sob estresse fisiológico, carboidratos de estoque (como os polissacarídeos) podem ser mobilizados, na forma de sacarose, de órgãos de reserva (como pseudobulbos – que atuam como eficientes órgãos de reserva de água e carboidratos) em direção as folhas, quando estas estão com uma demanda energética maior do que sua produção (Stancato et al., 2001).

Considerando as informações acima, este estudo teve como objetivo investigar características ecofisiológicas de espécies de orquídeas com metabolismo CAM (*Cattleya warneri* T. Moore) e C₃ (*Miltonia spectabilis* Lindl.), visando avaliar sua tolerância ao DH prolongado, por meio de avaliações do status hídrico (CRA), da concentração de pigmentos fotossintéticos e da fluorescência da clorofila *a* em folhas e pseudobulbos.

Referências Bibliográficas

- Adamski J.M., Peters J.A., Danieloski R., Bacarin M.A.** 2011. Excess iron-induced changes in the photosynthetic characteristics of sweet potato. *Journal of Plant Physiology*. 168:2056-62.
- Barros F. de, Vinhos F., Rodrigues V.T., Barberena F.F.V.A., Fraga C.N., Pessoa E.M., Forster W., Menini Neto L., Furtado S.G., Nardy C., Azevedo C.O., Guimarães L.R.S.** 2016. Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB11347>>. Acesso em: 15 Fev. 2016.
- Chaitanya K.V., Jutur P.P., Sundar D., Ramachandra R.A.** 2003. Water stress effects on photosynthesis in different mulberry cultivars. *Plant Growth Regulation*. 40:75-80.
- Chaves M.M., Maroco J.P., Pereira J.S.** 2003. Understanding plant responses to drought from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*. 30:239-264.
- Chen S., Kang Y., Zhang M., Wang X., Strasser R.J., Zhou B., Qiang S.** 2015. Differential sensitivity to the potential bioherbicide tenuazonic acid probed by the JIP-test based on fast chlorophyll fluorescence kinetics. *Environmental and Experimental Botany*. 112:1-15.
- Cornic G.** 2000. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture not by affecting ATP synthesis. *Trends in Plant Science*. 5:187-188.
- Cushman J.C.** 2001. Crassulacean Acid Metabolism. A Plastic Photosynthetic Adaptation to Arid Environments. *Society*. 127:1439-48.
- Demmig-Adams B., Adams W.W.III., Mattoo A.** 2006. Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment. *Advances in Photosynthesis and Respiration* (Series ed. Govindjee), vol. 21. Dordrecht: Springer.
- Dressler R.L.** 1993. *Phylogeny and Classification of the Orchid Family*. – Dioscorides Press, Portland.
- Farias L.A., Ribeiro, R.** 2000. Pôster Apresenta orquídeas na Mata Atlântica. *Revista O Mundo das Orquídeas*. 13:43-45.
- Frank H.A., Young A.J., Britton G., Cogdell R.J.** 1999. The photochemistry of carotenoids. *Advances in Photosynthesis and Respiration* (Series ed., Govindjee), vol. 8. Dordrecht: Kluwer Academic (now Springer).

- Gholami M., Rahemib M., Kholdebarinc B., Rastegarb S.** 2012. Biochemical responses in leaves of four fig cultivars subjected to water stress and recovery. *Scientia Horticulturae*. 148:109-117.
- Gravendeel B., Smithson A., Slik F.J.W., Schuiteman A.** 2004. Epiphytism and pollinator specialization: drivers for orchid diversity? *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 359:1523-1535.
- He J., Norhafis H., Qin L.** 2013. Responses of Green Leaves and Green Pseudobulbs of CAM Orchid *Cattleya laeliocattleya* Aloha Case to Drought Stress. *Journal of Botany*. 2013:1-9.
- Jones, H. G.; Corlett, J. E.** 1992. Current topics in drought physiology. *Journal of Agricultural Science*. 119: 291-296.
- Ko J., Piccinni G.** 2009. Corn yield responses under crop evapotranspiration-based irrigation management. *Agricultural Water Management*. 96:799-808.
- Krause G.H., Weis E.** 1991. Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 42:313-349.
- Kumaria S., Tandon P.** 2001. Orchids: the world's most wondrous plants. In: PATHAK, P.; SEHGAL, R.N.; SHEKHAR, N.; SHARMA, M.; SOOD, A. *Orchids: science and commerce*. 1a ed. India, Bishen Singh Mahendra Pal Singh. p.17-28.
- Lambers H., Chapin III., F.S., Pons T.L.** 2008. *Plant Physiological Ecology*. 2 ed. Springer, 604 p.
- Lawson T., Oxborough K., Morison J.I.L., Baker N.R.** 2003. The responses of guard and mesophyll cell photosynthesis to CO₂, O₂, light, and water stress in a range of species are similar. *Journal of Experimental Botany*. 54:1743-1752.
- Li Z.G., Yuan L.X., Wang Q.L., Ding Z.L. Dong C.Y.** 2013. Combined action of antioxidant defense system and osmolytes in chilling shock-induced chilling tolerance in *Jatropha curcas* seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*. 35:2127-2136.
- Lukatkin A.S., Brazaityte A., Bobinas C., Duchovskis P.** 2012. Chilling injury in chilling-sensitive plants: a review. *Agriculture*. 99:111-124.
- Macedo M.C., Rosa, Y.B.C.J., Scalón S.P.Q., Junior E.J.R., Vieira M.C., Tatara M.B.** 2011. Substratos e intensidades de luz no cultivo de orquídea denfal. *Horticultura Brasileira*. 29:168-173.
- Mattiuz C.F.M., Rodrigues T.J.D., Mattiuz B.** 2006. Aspectos fisiológicos de orquídeas cortadas. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*. 12:21-30.

- Mehta P., Jajoo A., Mathur S., Bharti S.** 2010. Chlorophyll a fluorescence study revealing effects of high salt stress on Photosystem II in wheat leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*. Elsevier Masson SAS. 48:16-20.
- Minardi B.D., Paula A., Voytena L., Santos M., Randi Á.M., Randi M.** 2014. The Epiphytic Fern *Elaphoglossum luridum* (Fée) Christ. (Dryopteridaceae) from Central and South America: Morphological and Physiological Responses to Water Stress. *The Scientific World Journal*. 2014:1-9.
- Moraes C.P., Santos N.S., Massaro R., Cordeiro G.M., Leal T.S.** 2009. Desenvolvimento in vitro de *Cattleya tigrina* A.Richard (orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. *Ensaio e Ciência*. 8:57-65.
- Noctor G., Mhamdi A., Foyer C.H.** 2014. The Roles of Reactive Oxygen Metabolism in Drought: Not So Cut and Dried. *Plant Physiology*. 164:1636-1648.
- Oukarroum A., Madidi S.E., Schansker G., Strasser R.J.** 2007. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll a fluorescence OJIP under drought stress and re-watering. *Environmental and Experimental Botany*. 60:438-46.
- Pompelli M.F., Barata-Luís R., Vitorino H.S., Gonçalves E.R., Rolim E.V., Santos M.G., Almeida-Cortez J.S., Ferreira V.M. Lemos E.E., Endres L.** 2010. Photosynthesis, photoprotection and antioxidant activity of purging nut under drought deficit and recovery. *Biomass and Bioenergy*. 34:1207-1215.
- Rodrigues M.C., Matiz A., Cruz A.B., Matsumura A.T., Takahashi C.A., Hamachi L., Félix L.M., Pereira P.N., Aida S.R.L., Aida M.P.M., Demarco D., Freschi L., Mercier H. Kerbaux G.B.** 2013. Spatial patterns of photosynthesis in thin- and thick-leaved epiphytic orchids: unravelling C₃-CAM plasticity in an organ-compartmented way. *Annals of Botany*. 112:17-29.
- Santos M.G., Ribeiro R.V., Oliveira R.F., Machado E.C., Pimentel C.** 2006. The role of inorganic phosphate on photosynthesis recovery of common bean after a mild water deficit. *Plant Science*. 170:659-664.
- Silvera K., Neubig K.M., Whitten W.M., Williams N.H., Winter K., Cushman J.C.** 2010a. Evolution along the crassulacean acid metabolism continuum. *Functional Plant Biology*. 37:995-1010.
- Sinclair R.** 1983. Water Relations of Tropical Epiphytes. 34:1652-1663.

- Stancato G.C., Mazzafera P., Buckeridge M.S.** 2001. Effect of a drought period on the mobilisation of non-structural carbohydrates, photosynthetic efficiency and water status in an epiphytic orchid. *Plant Physiology and Biochemistry*. 39:1009-1016.
- Strasser R.J., Michael M.T., Srivastava A.** 2004. Analysis of the Chlorophyll *a* Fluorescence Transient. In: G. Govindje, Papageorgiou (Ed.); *Advances in Photosynthesis and Respiration Chlorophyll Fluorescence a Signature of Photosynthesis*. Kluwer Academic Publishers. p.321-362.
- Suzuki N., Koussevitzky S., Mittler R., Miller G.** 2012. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell and Environment*. 35:259–270.
- The Plant List.** 2013. Version 1.1. Published on the Internet. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/>>. Acesso em: 11 set. 2015.
- Waechter J.L.** 1996. Epiphytic orchids in eastern subtropical South America. In: 15th World Orchid Conference, 1998, Rio de Janeiro. Proceedings. Turriers: Naturalia. p. 332-341.
- Wang Z.X., Chen L., Ai J., Qin H.Y., Liu Y.X., Xu P.L., Jiao, Z.Q., Zhao, Y., Zhang, Q.T.** 2012. Photosynthesis and activity of photosystem II in response to drought stress in Amur Grape (*Vitis amurensis* Rupr.). *Photosynthetica*. 50:189-196.
- Waseem M., Ali A., Tahir M., Nadeem M.A., Ayub M., Tanveer A., Ahmad R., Hussain M.** 2011. Mechanisms of drought tolerance in plant and its management through different methods. *Continental Journal of Agricultural Science*. 5:10-25.
- Xu D.H., Fang X.W., Su P.X., Wang G.** 2012. Ecophysiological responses of *Caragana korshinskii* Kom. under extreme drought stress: Leaf abscission and stem survives. *Photosynthetica*. 50:541-548.
- Yusuf M.A., Kumar D., Rajwanshi R., Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Govindjee, Sarin N.B.** 2010. Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll *a* fluorescence measurements. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*. Elsevier B.V. 1797:1428-1438.
- Zobayed S.M.A., Afreen F., Kozai T.** 2007. Phytochemical and physiological changes in the leaves of St John's wort plants under a water stress condition. *Environmental and Experimental Botany*. 59:109-116.

CAPÍTULO I

Revisão Bibliográfica

1. Família Orchidaceae

A família Orchidaceae A. Juss constitui atualmente a segunda maior dentre todas as famílias de Angiospermas (The Plant List, 2013) com distribuição que abrange desde os trópicos até o Ártico (Dressler, 1993). Estão descritas em todo o mundo cerca de 27.800 espécies distribuídas em 899 gêneros (The Plant List, 2013). No Brasil, foram documentadas aproximadamente 2.550 espécies pertencentes a 238 gêneros (Barros et al., 2016).

A diversidade e a riqueza de espécies da família Orchidaceae está fortemente influenciada pela geografia (relevo), pelas condições climáticas e pelos diferentes hábitos encontrados por estas plantas, as quais podem ser epífitas, heme epífitas, terrestres ou rupícolas (Dressler, 1993).

Devido a diversas adaptações morfológicas e fisiológicas, que incluem presença de folhas carnosas e pseudobulbos - especializados na reserva de água e nutrientes -, raízes aderentes e cobertas por velames - tecido especializado na absorção de água e nutrientes - além da produção sequencial de brotos - que funcionam como unidades fisiológicas independentes - e do Metabolismo ácido crassuláceo (CAM), a grande maioria, cerca de 70% das espécies de orquídeas são epífitas (Gravendeel et al., 2004). No entanto, as orquídeas epífitas predominam nas regiões tropicais, enquanto no distanciamento em relação à Linha do Equador há um progressivo aumento de espécies terrícolas (Gentry, 1988).

No Brasil, a Mata Atlântica é considerada o principal habitat das orquídeas, onde se concentram espécies endêmicas de relevante valor ornamental e comercial (Farias e Ribeiro, 2000). No Estado do Espírito Santo, as condições geográficas e climáticas favoráveis, além de filtros históricos, biogeográficos e ecológicos que atuam nos processos de seleção, fazem da Mata Atlântica um grande reduto, com cerca de 700 espécies de orquídeas daquelas existentes no mundo, muitas delas também consideradas endêmicas (Waechter, 1996; Barros et al., 2016).

Dentre as principais características das orquídeas, a que mais chama a atenção é a beleza e exuberância de suas flores. Esse aspecto faz com que elas apresentem elevado valor como planta ornamental atraindo forte interesse econômico e botânico. Nesse sentido, o cultivo de espécies com características de flores de corte é bastante promissor tanto no

mercado nacional como internacional (Mattiuz et al., 2006; Zanenga-Godoy e Costa, 2003; Moraes et al., 2009; Macedo et al., 2011). Além da importância ornamental, as orquídeas também fornecem muitos recursos que são explorados pela indústria medicinal, alimentícia e de cosméticos (Kumaria e Tandon, 2001).

Segundo Silva (2003), o cultivo de orquídeas ocorrera já antes de Cristo. Nessa época tais plantas eram denominadas de *Orchis* pelos gregos e *Han* ou *Lan*, pelos chineses. De acordo com este mesmo autor, um filósofo chinês denominado Confúcio (551 – 479 a. C.) já mencionava em seus pergaminhos a utilização das orquídeas como objetos de decoração em seu lar simbolizando a pureza, o perfume e a graça. Os gregos e romanos também utilizavam-se das orquídeas para fins medicinais, como estimulante da fertilidade em mulheres e da virilidade nos homens (Silva, 2003).

Vale destacar, porém, que a feição e encanto que o estereótipo (flores grandes e muito ornamentais, presença de “pseudobulbos”, etc.) destas plantas causam à maioria das pessoas dizem respeito apenas a caracteres morfológicos próprios de uma das cinco subfamílias, Epidendroideae (Singer, 2004). Apesar do tamanho e beleza variados (Dressler, 1993), as flores das orquídeas tendem a ser relativamente uniformes quanto ao número e arranjo de suas partes em todos os grupos. Partindo das características comuns a toda a família, como a presença do ginostêmio e do labelo, as flores apresentam-se nas mais variadas formas. A especialização das flores é evidenciada por diferentes mecanismos morfofisiológicos que selecionam polinizadores e facilitam a polinização cruzada (Singer e Sazima, 2001; Singer e Koehler, 2003; Singer, 2006).

Dentre as partes que constituem uma planta de orquídea estão as raízes, as folhas, caules e em muitos grupos os pseudobulbos. Esses órgãos merecem destaque por apresentarem características bastante variadas em relação a outros grupos de plantas. O sistema radicular das orquídeas é relativamente uniforme (sendo as raízes grossas), diferente das grandes variações encontradas nos demais grupos vegetais (Arditti, 1992). As folhas possuem mesofilo homogêneo, podendo apresentar feixes vasculares intercalados de tamanhos variados. Quanto à espessura e forma, as folhas variam bastante de espécie para espécie, dependendo do metabolismo de fixação de carbono que esta apresenta, e/ou a diferença em disponibilidade de luz e água, que provoca alterações na espessura das cutículas e dos tecidos do mesofilo (Silvera et al., 2010a; Rodrigues et al., 2013). Os estômatos ocorrem, geralmente, no mesmo nível da epiderme ou ligeiramente elevados. A hipoderme confere osmorregulação e, células esclerificadas no mesofilo resistência mecânica às folhas

destas plantas em ambientes aéreos, onde intempéries como os ventos e estresse hídrico são frequentes (Oliveira e Sajo, 1999). Os pseudobulbos, órgãos alongados com a função de caule, caracterizam-se pela presença de cutícula espessa, ausência de estômatos e abundância de células que atuam como reserva de água, importante na manutenção do *status* hídrico das epífitas (Hew e Yong, 1997; Stancato et al., 2001; He et al., 2013).

1.1. *Cattleya warneri* T. Moore e *Miltonia spectabilis* Lindl

Neste trabalho, foram estudadas duas espécies de orquídeas nativas que ocorrem na Mata Atlântica do estado do Espírito Santo: *Cattleya warneri* T. Moore, subtribo Laliinae (Van den Berg, 2008) e *Miltonia spectabilis* Lindl. Subtribo Oncidiinae (Carlini-Garcia, 2002) (Figura 1).



Figura 1. Espécies utilizadas no estudo. *Cattleya warneri* T. Moore (à esquerda) e *Miltonia spectabilis* Lindl. (à direita). Fotos: Jadson Bonini Zampirolo.

C. warneri foi descrita como uma erva epífita endêmica do Brasil, por T. Moore em 1862 (Barros, et al., 2016). Na natureza, essa espécie é encontrada nos remanescentes da Mata Atlântica dos estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e sul da Bahia (Figura 2A), em locais onde as temperaturas variam entre 13 e 30°C, altitude entre 200 e 800m, com presença de alta umidade e disponibilidade razoável de luz (Cruz et al., 2003). São plantas unifoliadas, com pseudobulbos subclavados, com a maioria das folhas oblongas, e algumas

quase arredondadas. Sua floração ocorre entre os meses de junho e julho e suas flores são grandes (considerada a maior dentre as flores de orquídeas) com até 20 cm de diâmetro, aromáticas, vistosas e com coloração que varia do rosa escuro a púrpura ametista (Figura 1) (Withner, 1988; Braem, 1984).

Apesar de habitar locais com temperaturas mais amenas e com umidade relativamente elevada, *C. warneri*, assim como outras plantas do gênero, é considerada uma planta com metabolismo CAM (Metabolismo ácido crassuláceo). Além de suas características anatômicas como folhas e cutículas espessas e crescimento lento, estudos demonstraram que esta espécie abre seus estômatos entre o final da tarde e o início da manhã, com maior atividade de absorção de CO₂ noturna, entre 18:00 e 24:00 h (Andrade-Souza et al., 2009; Silvera et al., 2010a).

Pela beleza, imponência de suas flores e por ser encontrada principalmente em território capixaba, esta é considerada a orquídea símbolo do Espírito Santo. Por esta razão, plantas de *C. warneri* (além de outras do gênero *Cattleya*) são muito cultivadas para fins ornamentais e comerciais. Esse apelo econômico e ornamental, além da destruição dos habitats naturais para áreas de cultivo, têm levado esta planta a figurar na lista das espécies ameaçadas de extinção (MMA, 2008).

O gênero *Miltonia* foi descrito por Lindley em 1837, tendo a espécie *M. spectabilis* como tipo (Carlini-Garcia, 2002). Essa espécie, herbácea e epífita, também é endêmica do Brasil e sua distribuição original encontra-se no domínio da Mata Atlântica, abrangendo os estados de Pernambuco, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo (Carlini-Garcia, 2002; Barros et al., 2016) (Figura 2B).

M. spectabilis apresenta uma diversificação de cores entre suas variedades. A variedade “Tipo” destaca-se pela presença de flores róseo-esbranquiçadas, tamanho em torno de 9,5 cm de diâmetro e labelo estriado em tom de lilás. Embora suas flores desponham solitárias na ponta da haste, a orquídea forma grandes touceiras, resultando em uma grade florada, geralmente ocorrendo entre dezembro e fevereiro. Apresenta pseudobulbos relativamente amarelados sustentando duas folhas alongadas e apicalmente arredondadas.

Plantas de *M. spectabilis* apresentam características morfoanatômicas tipicamente relacionadas ao metabolismo C₃. Apresentam, por exemplo, folhas finas, sem cutículas espessas e taxas de crescimento relativamente rápidas em relação às orquídeas CAM. Além disso, como descrito por Pires et al. (2012), *M. spectabilis* evidencia aumento considerável na

taxa fotossintética líquida (A) à medida em há incremento da densidade de fluxo de fótons sobre a planta.

Apesar de não figurar tecnicamente na lista de espécies ameaçadas de extinção (MMA, 2008), *M. spectabilis* encontra-se dentro do domínio da Mata Atlântica, um dos *Hotspots* da biodiversidade, ameaçados pela ação antrópica. Além disso, essa espécie também apresenta potencial ornamental e comercial, o que a torna suscetível ao extrativismo nos remanescentes florestais e, também, suscetível ao risco de extinção num futuro talvez não tão distante.

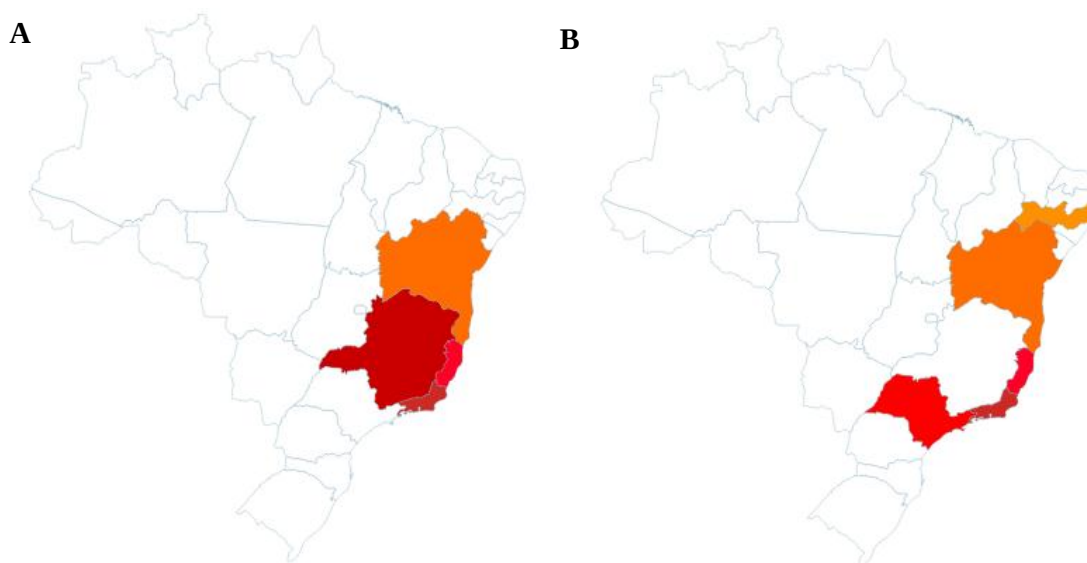


Figura 2. Distribuição natural das espécies de orquídeas por Estados da Federação. *Cattleya warneri* T. Moore (A) e *Miltonia spectabilis* Lindl. (B). Fonte: Barros et al. (2016).

2. Ecofisiologia de Orchidaceae

Orchidaceae apresenta importante função ecológica nas comunidades vegetais. O hábito epifítico ocorrente na família é fundamental na regulação da biodiversidade e no equilíbrio interativo de espécies nos distintos ecossistemas. Isso ocorre porque espécies epifíticas proporcionam recursos alimentares (frutos, néctar, pólen, água) e microambientes especializados para a fauna do dossel, fazendo com que haja uma alta diversidade de organismos e de interações tróficas (Waechter, 1996). Além disso, plantas epífitas, como as orquídeas, possuem a capacidade de elaborar quantidades relevantes de biomassa suspensa em ambientes considerados restritivos em termos de recursos, conferindo certo grau de estresse fisiológico a estas plantas (Gravendeel et al., 2004; Minardi et al., 2014). Estes aspectos fazem com que as epífitas vasculares tenham importante papel no fluxo de energia e de matéria nas florestas tropicais (Nadkarni, 1986). Os elementos minerais são adicionados às epífitas à medida que elas crescem e são removidos quando elas morrem e se decompõem.

Este é um processo que contribui enormemente para a ciclagem de nutrientes do ecossistema (Coxson e Nadkarni, 1995).

Muitas das espécies vegetais que vivem em ambientes com recursos limitados apresentam características importantes que contribuem para a sua sobrevivência. A família Orchidaceae, que compreende um grupo onde a maioria de suas espécies é epífita, evidencia estas características próprias de ambientes com limitação de recursos (Gravendeel et al., 2004; He et al., 2013; Minardi et al., 2014). A presença dos pseudobulbos e das folhas espessas – importantes no armazenamento de água – e, a presença de raízes com a superfície coberta por velames – importante na rápida absorção de água e nutrientes – por exemplo, constituem um conjunto de ferramentas que evoluíram para melhor atender as necessidades de muitas orquídeas epífitas (Goh e Kluge, 1989; Dressler, 1993; He et al., 2011; Zotz e Winkler, 2013).

É importante destacar ainda que, muitos táxons de orquídeas, incluindo o gênero *Cattleya* Lindl., apresentam metabolismo CAM (Metabolismo ácido crassuláceo) (Lüttge 2004; Silvera et al., 2010b), onde a absorção do CO₂ é feita com a abertura dos estômatos durante noite, reduzindo a quantidade de água perdida por unidade de carbono assimilado, isto é, maior eficiência no uso da água (Winter e Smith, 1996; Cushman, 2001; Winter et al., 2005). Essa via metabólica fornece vantagem especial para espécies que são epífitas, as quais enfrentam déficit hídrico constante. Os resultados sugeridos por Winter e Smith (1996) em seu trabalho corroboram com tal afirmativa, uma vez que eles preveem que pelo menos 50% das espécies tropicais de orquídeas epífitas apresentam metabolismo CAM.

Tendo em vista que comunidades em fases secundárias apresentam menor diversidade epifítica comparativamente àquelas em equilíbrio dinâmico, as epífitas apresentam, ainda, importância como bioindicadores do estágio sucessional da floresta (Ramalho e Pimenta, 2010). Quando associados às características fisiológicas das epífitas, estudos ecológicos contribuem para determinar o *status* de conservação que um determinado fragmento apresenta como, por exemplo, padrões de interferência antrópica ou distúrbios de ordem natural no ambiente (Van Den Berg, 1996).

A despeito do relevante papel ecológico das orquídeas nas distintas comunidades vegetais, o número de indivíduos nos remanescentes da Mata Atlântica tem declinado consideravelmente, em especial pela devastação dos remanescentes florestais e sua conversão em áreas de cultivo, além da própria coleta das plantas para fins ornamentais e comerciais (Farias e Ribeiro, 2000; Tombolato e Costa, 1998).

Cattleya L. com cerca de 50 espécies descritas, aparece atualmente entre os gêneros de orquídeas mais comercializados e utilizados para a ornamentação (Van den Berg et al., 2000; Van den Berg, 2008; Barros et al., 2016), sem contar outros milhares de híbridos que apresentam flores grandes e vivamente coloridas (Paula e Silva, 2004). Mostrando o interesse das pessoas pela beleza das orquídeas, estudos com orquídeas tropicais focaram principalmente nos grupos com características ornamentais, como dos gêneros *Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Laelia* e *Phalaenopsis*. Estes grupos também têm sido bastante cultivados e multiplicados fora do habitat natural desde que os primeiros estudos iniciaram-se ainda no século XIX, envolvendo tanto o ponto de vista hortícola quanto científico (Silva et al., 1995).

Considerando a demanda extrativista por muitos exemplares de orquídeas, ações que visam à reprodução de espécies utilizando sementes e cultivo *in vitro* já vêm sendo bastante exploradas e têm se tornado muito eficientes no que diz respeito à manutenção da variabilidade genética e sua potencial utilização em projetos de reintrodução (Martini et al., 2001; Buyun et al., 2004; Moraes et al., 2009; Galdiano Júnior et al., 2013). O grande desafio, entretanto, está em propiciar as condições ambientais adequadas para a reintrodução destas espécies. Nesse sentido, a sobrevivência de uma população de orquídeas depende basicamente do manejo apropriado das condições abióticas do local de reintrodução (Janečková et al., 2006). Isto leva ao entendimento de que conhecimentos específicos acerca de fatores como luz, disponibilidade hídrica e presença de nutrientes nos sítios de recuperação são essenciais para o sucesso das ações de inserção das espécies no ambiente natural.

2.1. Respostas das plantas ao Déficit Hídrico

A baixa disponibilidade hídrica, seja no solo e/ou na atmosfera, constitui o fator abiótico mais limitante ao crescimento e desenvolvimento das plantas (Stancato et al., 2001; Zotz e Hietz, 2001; Chaves et al., 2003; He et al., 2013). A deficiência hídrica ocorre quando a taxa de transpiração excede a taxa de absorção de água pela planta, o que pode ser decorrente da baixa disponibilidade de água no solo, bem como da presença de sais ou temperaturas muito baixas (Bray, 1997). Para plantas epífitas, a condição de déficit hídrico (DH) é ainda mais evidente se considerado que o seu forófito possui limitada capacidade de reter água, além de expor estas plantas a altos níveis de radiação no dossel das florestas (Stancato et al., 2001; Kerbauy et al., 2012; He et al., 2013). Sob as expectativas das mudanças climáticas globais, o DH deve tornar-se um fator ainda mais limitante para as

plantas, seja do ponto de vista comercial – no caso das culturas agrícolas – ou do ponto de vista ecológico – no caso das plantas nativas (Hamdy et al., 2003; McDowell et al., 2008; IPCC, 2013; Han e Wagner, 2014).

As plantas podem estar sujeitas a dois tipos de estresse hídrico na natureza: estresse hídrico de curto prazo (quando sua duração varia de horas a poucos dias) ou estresse hídrico de longo prazo (quando sua duração varia de semanas a meses) (Chaves et al., 2003). Quanto às respostas das espécies vegetais ao DH, estas podem se apresentar de maneira bastante complexa, uma vez que algumas apresentam alterações morfofisiológicas adaptativas que as permitem tolerar estas condições, enquanto outras simplesmente sucumbem ao fator de estresse.

A sobrevivência das plantas sob DH depende de sua habilidade em responder ao estímulo, gerar e transmitir o sinal, e iniciar várias alterações fisiológicas e bioquímicas (Bohnert e Jensen, 1996; Shinozaki e Yamaguchi, 1997). Assim, de acordo com o grau de resistência das plantas ao DH, estas têm sido divididas em três grupos: plantas que apresentam estratégias de escape, estratégias de evitação e estratégias de tolerância (Levitt 1972; Turner 1986; Price et al., 2002; Lambers et al., 2008; Harb et al., 2010). Essas estratégias, porém, não são totalmente excludentes e algumas plantas apresentam mais de uma delas (Ludlow 1989). Plantas que escapam do DH são, por exemplo, as plantas anuais nativas de regiões áridas, as quais apresentam alto grau de plasticidade, sendo capazes de completar seu ciclo de vida antes da ocorrência do DH fisiológico, apresentando elevadas taxas de absorção de CO₂ e crescimento. Espécies capazes de evitar o DH incluem plantas anuais ou perenes e apresentam uma variedade de características adaptativas que permitem a manutenção do seu potencial hídrico tão alto quanto possível através de estratégias que minimizam a perda de água e maximizam sua absorção. Por fim, as plantas tolerantes ao DH, as quais compreendem aos arbustos e as árvores sempre verdes de desertos, conseguem manter suas funções mesmo com potencial hídrico muito baixo, o que envolve ajustamento osmótico, presença de células com tamanhos menores e paredes celulares mais rígidas (Chaves et al., 2003).

2.2. Mecanismos de tolerância ao Déficit Hídrico

O déficit hídrico altera o crescimento e o desenvolvimento das plantas por afetar suas funções fisiológicas e bioquímicas (Jones e Corlett, 1992; Zobayed et al., 2007). Neste cenário, a deficiência de água atinge diretamente a turgescência celular, a abertura estomática

e a estrutura dos cloroplastos, levando a decréscimos nas taxas de transpiração e assimilação de CO₂, o que, por sua vez, afeta a distribuição, mobilização e acúmulo de açúcares (Stancato et al., 2001; Chaitanya et al., 2003; Waseem et al., 2011; He et al., 2013). Essa redução na assimilação de CO₂ pode ser causada por danos nos centros de reação (CR) e consequente declínio das reações de transferência de elétrons no fotossistema II (FSII), afetando a produção quântica do aparato fotossintético (Stancato et al., 2001; Santos et al., 2006).

De fato, uma das principais consequências do DH sobre as plantas diz respeito à diminuição das taxas fotossintéticas. Isso está diretamente relacionado à redução do conteúdo relativo de água (CRA), do potencial hídrico e do fechamento estomático. O fechamento estomático, que é regulado pelo ácido abscísico – hormônio que atua como o primeiro sinalizador da resposta ao DH (Cornic, 2000; Chaves et al., 2003; Lawson et al., 2003) – impede a entrada de CO₂ e, durante o DH pode ser causado por fatores como limitação do transporte de elétrons com consequente decréscimo na síntese de ATP, redução da capacidade de regeneração e decréscimo da atividade da ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP) via inibição da Rubisco ativase (Lawlor, 2002; Medrano et al., 1997; Tezara et al., 1999).

Quanto aos cloroplastos, as respostas ao DH envolvem a perda de pigmentos e a desorganização das membranas dos tilacóides (Ladjal et al., 2000). Em relação à fase fotoquímica da fotossíntese, o estresse hídrico atua no desequilíbrio entre a captura e utilização da energia luminosa (Foyer e Noctor, 2000). A regulação da atividade do FSII causa um desequilíbrio entre a geração e utilização de elétrons, alterações no rendimento quântico, superexcitação do sistema fotossintético e danos fotoinibitórios nos CR (Souza et al., 2004; Santos et al., 2006). Estas alterações na fase fotoquímica da fotossíntese resultam da dissipação de energia da luz excedente pelo CR do FSII formando espécies reativas de oxigênio (EROs) (O₂⁻, ¹O₂, H₂O₂, OH⁻) em excesso. Esse material tóxico pode causar danos oxidativos parciais ou severos, como mudanças no estado redox de componentes celulares, peroxidação de membranas lipídicas, inativação de enzimas, oxidação e desnaturação de aminoácidos e proteínas, além de danos ao DNA (Lukatkin et al., 2012; Suzuki et al., 2012; Li et al., 2013; Noctor et al., 2014). Por serem tóxicas às células quando em excesso, as EROs devem ser eliminadas por mecanismos antioxidantes que atuam diretamente sobre esses materiais tóxicos. Entre os mecanismos antioxidantes estão os enzimáticos [superóxido dismutase (SOD) que converte O₂⁻ a H₂O₂ e O₂ no cloroplasto, mitocôndrias e outros compartimentos celulares, a catalase (CAT) que converte H₂O₂ a O₂ nas mitocôndrias e peroxissomos, a peroxidase de ascorbato (APX) que também catalisa H₂O₂ a O₂ no cloroplasto

e peroxidase do guaiacol (POD) que age no processo de desintoxicação do citosol] além de não-enzimáticos como o α -tocoferol, β -caroteno, compostos fenólicos, ascorbato e glutathione (Noctor e Foyer, 1998; Chen et al., 2011; Song et al., 2014).

O decréscimo na assimilação de CO_2 resultante das condições de DH pode também afetar a distribuição, o acúmulo e a mobilização de açúcares na planta, uma vez que, o estresse eleva as taxas respiratórias nos órgãos fotossintéticos tornando necessário o seu suprimento energético na forma de carboidratos (Stancato et al., 2001). Quando carboidratos de estoque (como os polissacarídeos) são mobilizados, forma-se a sacarose, açúcar de fácil transporte em plantas, o qual, em tecidos em fase de crescimento (órgãos “dreno”), é hidrolisado pela enzima invertase (β -D-fructofuranosidase) que catalisa uma reação irreversível de quebra da sacarose em glicose e frutose, e pela enzima sacarose-sintase, que catalisa a conversão reversível da sacarose em UDP-glicose e frutose (Buchanan et al., 2000). Altas concentrações de glicose podem inibir a fotossíntese e o metabolismo dos açúcares (Stancato et al., 2001). A mobilização de açúcares também varia de acordo com a espécie, sempre mantendo o sentido em direção aos órgãos com maior demanda energética. Em orquídeas, esta mobilização pode ocorrer a partir dos pseudobulbos (os quais atuam como eficientes órgãos de reserva) em direção as folhas, quando estas estão com uma demanda energética maior do que sua produção (Stancato et al., 2001).

Muitas adaptações evolutivas para aumentar a tolerância ao DH podem ser observadas nas diferentes espécies e diferentes órgãos vegetais. Em uma variedade de espécies de plantas, as espessuras dos tecidos foliares, assim como o tamanho e número de estômatos são influenciados pela escassez hídrica (Karaba et al., 2007; Luković et al., 2009). Com o DH, ocorre ainda, diminuição da emissão de novas folhas, redução da área foliar, do tamanho e número de estômatos por área e desenvolvimento do parênquima paliçádico (Waseem et al., 2011). Além disso, alguns grupos de plantas evoluíram independentemente no sentido de modificar as vias metabólicas de assimilação de CO_2 do tipo C_3 para os tipos C_4 e CAM, em virtude de obter uma maior eficiência no uso da água (Cushman, 2001; Silvera et al., 2010a; Silvera et al., 2010b).

2.3. Metabolismos fotossintéticos C_3 e CAM

Estima-se que cerca de 200 bilhões de toneladas de CO_2 sejam convertidas em biomassa a cada ano. Desse montante, aproximadamente 40% são originados das atividades do fitoplâncton marinho (Taiz e Zeiger, 2013). Nas plantas terrestres, cerca de 40% de toda a

massa seca corresponde ao carbono fixado via fotossíntese (Lambers et al., 2008). O processo de fixação de carbono pelos organismos fotossintetizantes é vital e consiste na principal porta de entrada de energia para as cadeias alimentares na Terra (Lambers et al., 2008). A fixação do carbono corresponde a uma das fases do processo fotossintético – a fase bioquímica ou de carboxilação – e depende estritamente da presença do CO_2 atmosférico. A outra fase é a fotoquímica, a qual depende da luz para oxidação da água a oxigênio e formação de ATP e NADPH, por meio de reações que ocorrem nas membranas dos tilacóides dos cloroplastos (Lambers et al., 2008; Taiz e Zeiger, 2013).

O funcionamento das reações que ocorrem na fase fotoquímica da fotossíntese é basicamente o mesmo para todas as plantas. O que difere entre as espécies vegetais ou mesmo entre alguns grupos é a forma pela qual o CO_2 é assimilado e posteriormente destinado às reações de carboxilação da fotossíntese. Atualmente é aceito que existem três modelos básicos de fixação do CO_2 em plantas: C_3 , C_4 e CAM (Metabolismo ácido crassuláceo), sendo este último não exclusivo da família Crassulaceae, a despeito do nome. Assim, quando dentro da folha, o CO_2 pode difundir-se diretamente dos espaços intercelulares para o sítio ativo da ribulose-1,5 bifosfato (enzima Rubisco) dentro dos cloroplastos (plantas C_3), ou pode ser fixado em ácidos de 4 carbonos (malato ou aspartato nas plantas C_4 e malato nas plantas CAM) no próprio citosol da célula. Para a família Orchidaceae, é descrito que as folhas das espécies apresentam o metabolismo de fixação de carbono C_3 ou CAM, baseando-se em características como a presença de folhas finas e grossas, respectivamente (Silvera et al., 2010a; Rodrigues et al., 2013). Esses diferentes meios de fixação do CO_2 nas orquídeas e em outras plantas estão intimamente associados a condições ambientais, principalmente às condições hídricas do local de ocorrência (Silvera et al., 2009).

O CO_2 absorvido via estômatos, acoplado ao consumo dos produtos oriundos da fase fotoquímica da fotossíntese (ATP e NADPH) é o responsável pela formação das trioses fosfatos, as quais, originadas diretamente na fase de redução podem seguir dois destinos: migração a partir do cloroplasto para o citosol formando sacarose; ou conversão em amido no próprio cloroplasto. Estas duas rotas são competitivas e dependentes da concentração de ortofosfato no citosol. Baixas concentrações de ortofosfato no citosol limitam a exportação de trioses fosfato a partir do cloroplasto, inibem a síntese de sacarose e estimulam síntese de amido no cloroplasto. Por outro lado, abundância de ortofosfato no citosol estimula exportação de trioses fosfato a partir do cloroplasto para o citosol induzindo a formação de sacarose – a qual é utilizada para o transporte e consumo imediato nos órgãos em crescimento

– e inibindo a síntese de amido dentro do cloroplasto (Buchanan et al., 2000; Taiz e Zeiger, 2013).

O ciclo de Calvin é a via metabólica responsável por esse processo e possui três fases: carboxilação, redução e regeneração. A carboxilação é a fase em que o aceptor ribulose-1,5 bifosfato (enzima Rubisco) é combinado com o CO_2 e água formando duas moléculas de 3-fosfoglicerato (3-PGA), o primeiro intermediário estável do ciclo de calvin composto por três carbonos (daí a origem do termo metabolismo C_3). Na fase de redução, as moléculas de 3-fosfoglicerato são reduzidas e convertidas em carboidratos (gliceraldeído-3-fosfato) utilizando o ATP no processo de fosforilação dos esqueletos carbônicos e o NADPH como agente redutor, ambos gerados fotoquimicamente. O ciclo é completado na fase de regeneração, onde a ribulose-1,5 bifosfato é regenerada a partir do gliceraldeído-3-fosfato (Taiz e Zeiger, 2013).

Nas plantas que apresentam o metabolismo CAM, observa-se uma separação temporal entre os eventos de assimilação do CO_2 e sua fixação em compostos orgânicos (Kerbaudy et al., 2012; Taiz e Zeiger, 2013). Esses eventos são separados em quatro fases distintas: a fase I é caracterizada pela abertura dos estômatos durante a noite, absorção e subsequente fixação do CO_2 atmosférico em ácidos orgânicos, como o malato (ácido málico) por meio da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) no citosol das células do mesofilo. O malato é acumulado nos vacúolos das células tornando as folhas caracteristicamente ácidas durante a noite. A fase II consiste no início da fixação do CO_2 pela enzima Rubisco e concomitante decréscimo na atividade da PEPC durante o início do período diurno. Na fase III ocorre a diminuição da abertura estomática, inicia-se o efluxo do malato partir dos vacúolos com subsequente descarboxilação desses ácidos. Essa descarboxilação pode elevar internamente em até 100 vezes os níveis de CO_2 . A fase IV é marcada pela redução dos estoques de ácidos orgânicos no interior celular, redução nas taxas de descarboxilação e redução da pressão parcial interna de CO_2 – pelo processo de carboxilação via ciclo de calvin (C_3) – associados com incremento da condutância estomática dependendo das condições ambientais (Luttge, 2004; Silvera et al., 2010b; Kerbaudy et al., 2012; Taiz e Zeiger, 2013).

Com relação à eficiência de cada um dos metabolismos fotossintéticos, existem os aspectos positivos e negativos intrínsecos a cada um deles. A característica marcante do metabolismo CAM é sua maior eficiência no uso da água, quando comparado ao C_3 e C_4 (Herrera, 2009; Taiz e Zeiger, 2013). Plantas CAM podem ser até 10 vezes mais eficientes no uso da água em relação a C_3 , utilizando 50 a 100g de água por grama de CO_2 fixado, ao passo que plantas C_3 utilizam até 500 g de água por grama de CO_2 fixado (Drennam e Nobel, 2000).

Além disso, plantas CAM apresentam taxas de respiração muito menores (Klug e Cummings, 1978; Sunagawa et al., 2010). Por outro lado, as plantas CAM sofrem grandes desvantagens em relação às C_3 quanto à produtividade de biomassa e os custos energéticos para alocação do CO_2 . Nestes quesitos, plantas CAM demandam muito mais tempo e demandam muito mais energia para a alocação da mesma quantidade de biomassa que uma planta C_3 (Winter et al., 1978). Neste caso, porém, plantas C_3 necessitam de condições ambientais mais estáveis com abundância de água e temperaturas mais amenas, e quando estão sob algum estresse fisiológico (alta luminosidade ou escassez hídrica), estas podem apresentar elevação da atividade fotorrespiratória, o que não ocorre nas plantas C_4 e CAM (Taiz e Zeiger, 2013).

Além do mecanismo de abertura dos estômatos durante a noite, outras características como presença de cutículas mais espessas, folhas mais espessas e suculentas, células com maiores vacúolos para armazenamento de água e ácidos, conferem às plantas CAM vantagem especial para ambientes com restrições hídricas, como encontrado em habitats epifíticos e regiões áridas e semi-áridas, ao passo que plantas C_3 apresentam grande vantagem em ambientes mais estáveis, sem limitação de recursos hídricos (Cushman e Borland 2002; Rodrigues et al., 2013).

2.4. Pigmentos Fotossintéticos

Os pigmentos fotossintéticos são compostos fundamentais ao processo fotossintético e estão presentes nas plantas, algas e cianobactérias. Quanto às plantas, esses pigmentos podem ocorrer em diversos órgãos, dentre os quais, folhas, caules e sépalas e pétalas das flores. Porém, é o mesofilo que concentra a maior parte desses pigmentos, fazendo deste tecido o grande responsável pela realização da fotossíntese nas plantas (Streit et al., 2005; Taiz e Zeiger, 2013).

O tipo de pigmento fotossintético e sua abundância variam de acordo com as espécies (Streit et al., 2005). No caso das plantas, os pigmentos especializados na absorção da luz são as clorofilas *a* e *b* e os carotenoides que estão presentes nos chamados sistemas antena ou complexo coletores de luz dos fotossistemas I e II nas membranas dos tilacóides nos cloroplastos (Lambers et al., 2008; Govindjee et al., 2010; Taiz e Zeiger, 2013). A clorofila *a* é o pigmento fotossintético mais abundante na natureza e está presente em todos os organismos que realizam a fotossíntese oxigênica (Streit et al., 2005). Sua principal função é atuar como doador de elétrons na fase fotoquímica da fotossíntese, ao passo que os demais pigmentos (clorofila *b* e carotenoides) atuam como pigmentos acessórios no sistema antena,

auxiliando na absorção de luz e transferência da energia de excitação para as clorofilas *a* que compõem os centros de reação dos fotossistemas I e II (Taiz e Zeiger, 2013).

As clorofilas são estruturas formadas por complexos derivados da porfirina, arranjo em forma de anel que contém como átomo central uma molécula de magnésio (Mg). Esse composto é uma estrutura macrocíclica assimétrica insaturada constituída por quatro anéis de pirrol. Os anéis numeram-se de 1 a 4 ou de “a” a “d”, de acordo com o sistema de numeração de Fisher (Schoefs, 2002). As clorofilas *a* e *b* encontram-se numa proporção de 3:1, respectivamente, e diferem nos radicais substitutos de carbono C-3 (Streit et al., 2005). Na clorofila *a*, o anel de porfirina contém um grupo metil (-CH₃) e a clorofila *b* contém um grupo aldeído (-CHO). A maior estabilidade da clorofila *b* deve-se ao efeito atrativo de elétrons de seu grupo aldeído no carbono 3 (Von Elbe, 2000).

Os sistemas antena de muitas plantas e também de algas contém entre 200-250 moléculas de clorofila além de 60-70 moléculas de carotenoides (Streit et al., 2005; Govindjee et al., 2010). Diferentemente das clorofilas que apresentam estruturas em forma de anel (descrito anteriormente), os carotenoides são polienos, compostos orgânicos poli-insaturados que contém um ou mais sequências de ligações carbono-carbono duplas e simples com formas lineares. Estes pigmentos absorvem luz verde e azul, e apresentam importante função quanto ao aumento da absorção do espectro visível luminoso, além de serem eficientes elementos fotoprotetores do aparato fotossintético (Streit et al., 2005).

O processo de fotoproteção inclui a auto regulação que auxilia na proteção dos componentes da membrana contra a indução de danos oxidativos, quando o sistema está sob condições de estresse fisiológico (Frank et al., 1999; Demmig-Adams et al., 2006). Nesse papel fotoprotetor, a degradação do β -caroteno dá início ao ciclo das xantofilas, resultando em um eficiente mecanismo de dissipação da energia quando o aparato fotossintético está saturado energeticamente. Este ciclo se inicia com a conversão da Violaxantina em Antheraxantina e posteriormente em Zeaxantina. Quando uma planta passa de uma condição estável para uma condição de estresse a Violaxantina pode ser convertida em Antheraxantina e, se o estresse permanecer esta pode ser convertida em Zeaxantina, num processo chamado de de-epoxidação. Estes compostos é que atuam na fotoproteção, dissipando energia em excesso quando a planta está sob estresse. A execução desse ciclo depende de um ambiente ácido e, portanto, ocorre no lúmen dos tilacóides. Quando a planta volta a uma condição mais estável a Zeaxantina e Antheraxantina são reconvertidas em Violaxantina, num processo inverso

chamado de epoxidação (Frank et al., 1999; Demmig-Adams et al., 2006; Lambers et al., 2008; Gonçalves et al., 2010).

A exposição prolongada de plantas ou organelas a condições de estresse, principalmente excesso de luz, pode resultar na foto-destruição dos pigmentos fotossintetizantes, fenômeno normalmente denominado de foto-oxidação. A foto-oxidação leva à diminuição dos teores desses pigmentos e num prazo maior pode levar à morte da célula ou do organismo (Araújo e Deminiciis, 2009). Alguns trabalhos, como de Tausz et al. (2001) e Minardi et al. (2014) revelam que apesar de as epífitas terem evoluído e se adaptado ao seu ambiente, o déficit hídrico também representa um importante agente foto-destrutivo, levando a significativas reduções nos teores de pigmentos fotossintéticos. Nesse contexto de estresse, as taxas de degradação dos pigmentos são maiores que as suas taxas de biossíntese, o que leva a uma perda gradual dessas substâncias se o fator de estresse perdurar (Yang et al., 2001).

Os pigmentos fotossintéticos têm como função controlar a quantidade de radiação solar que é absorvida pelas plantas e outros organismos. Isso os torna intimamente associados às taxas fotossintéticas e à produtividade primária na fase fotoquímica da fotossíntese (Blackburn, 2007). Em um cenário de estresse fisiológico e consequente degradação ou alteração na concentração de pigmentos, a relação entre as clorofilas e carotenoides pode ser usada como um potencial indicador de perdas foto-oxidativas causadas por fatores de estresse (Hendry e Price, 1993). Dessa maneira, a quantificação dos pigmentos fotossintéticos num tecido vegetal de plantas sob diferentes condições ambientais pode representar uma importante ferramenta de avaliação ecofisiológica (Lambers et al., 2008).

2.5. Fluorescência da Clorofila *a*

Após receberem a energia luminosa através dos fótons nas primeiras etapas da fotossíntese, os pigmentos fotossintéticos podem dissipar esta energia proveniente da luz por meio de três vias: dissipação fotoquímica, fluorescência e dissipação não-fotoquímica (Seaton e Walker, 1990; Krause e Weis, 1991; Kolber e Falkowski, 1993; Nicklisch e Köhler, 2001; Kerbauy, 2004). A dissipação fotoquímica, também chamada de quenching fotoquímico (qP) ou processo de oxirredução consiste na utilização da energia luminosa para os processos fotoquímicos em reações onde o elétron excitado na molécula de clorofila *a* é doado a uma molécula receptora, nos centros de reação do fotossistema II (FSII). A partir daí este elétron

excitado é transportado através dos carreadores ao longo da cadeia transportadora de elétrons até a redução do NADP^+ a NADPH (Campostrini, 2001; Kerbaudy, 2004).

A dissipação da energia como fluorescência é o processo onde parte da energia excedente da atividade fotoquímica é emitida como radiação na região visível do espectro vermelho. Existe um consenso geral que em temperatura ambiente (temperatura fisiológica, 20 a 25°C) a fluorescência da clorofila *a* (Chl *a*) em plantas é emitida na região do espectro entre 680-740 nm e quase que exclusivamente pelo FSII (Briantais et al., 1986; Krause e Weiss 1991; Govindjee, 1995; Lazár, 1999; Strasser et al., 2005). Entretanto, alguma contribuição na região dos comprimentos de onda maiores pode ser emitida pelo FSI, podendo esta contribuir para a fluorescência inicial, denominada F_0 (Krause e Weis, 1984; Krause e Weis, 1988). A outra via de dissipação energética nos processos da fotossíntese é a dissipação não-fotoquímica, a qual refere-se a produção de calor na forma de radiação infravermelha. Esta dissipação de energia é representada pelo quenching não-fotoquímico (qN) (dissipador não-fotoquímico).

Esses três processos de dissipação de energia luminosa pelas moléculas de clorofila *a* são competitivos. Dessa forma, qualquer alteração ocorrida na eficiência de um processo vai influenciar diretamente nos outros dois. Assim, alterações nas taxas fotossintéticas (fotoquímicas) influenciam diretamente a dissipação como fluorescência ou dissipação não-fotoquímica. Isso permite constatar que através das análises da fluorescência da clorofila *a*, pode ser observada a presença ou ausência de distúrbios ou alterações no funcionamento das unidades do aparato fotossintético (Strasser et al., 2000; Campostrini, 2001; Yusuf, 2010).

A relação existente entre a fase fotoquímica da fotossíntese e a emissão de fluorescência da clorofila *a* pode ser detectada no laboratório ou no campo através da utilização de um equipamento sensível denominado fluorômetro, que permite a investigação de como pode estar ocorrendo o funcionamento de todo o aparato fotossintético pela indução de cinética de elétrons nas unidades fotossintéticas em nível de ultra-estrutura de cloroplasto (Kerbuy, 2004; Stirbet e Govindjee, 2011).

A análise de fluorescência da clorofila *a* fundamentada em parâmetros biofísicos intrínsecos às unidades fotossintéticas tem sido uma importante ferramenta utilizada para avaliar a eficiência fotoquímica da planta *in vitro* e *in vivo*, especialmente sobre o comportamento do FSII (Strasser et al., 2004; Tsimilli-Michael e Strasser, 2008; Strasser et al., 2010; Chen et al., 2015; Martins et al., 2015). Esta é uma técnica não destrutiva e permite o rápido acúmulo de informações sobre os processos fotoquímicos e não-fotoquímicos que

ocorrem nos tilacóides dos cloroplastos (Yusuf et al., 2010) possibilitando a caracterização de algum estresse ambiental (déficit hídrico, alta ou baixa temperatura e luminosidade) sobre as características relativas à absorção e capacidade de transferência de energia da luz para a cadeia de transporte de elétrons e alterações na conformação dos tilacóides (Thoren et al., 2010).

No que se refere aos estudos de fluorescência, os fluorômetros utilizados são de dois tipos básicos: fluorômetros de pulsos modulados ou de excitação contínua (transiente) (Strasser et al., 2005). O primeiro caracteriza-se por utilizar uma fonte luminosa de excitação modulada (1 a 100 kHz), em conjunto com um sistema de detecção de fluorescência. Nesta condição permite-se monitorar a fluorescência na frequência e fase da luz modulada de excitação, permitindo monitorar a fluorescência na presença de uma luz contínua de qualquer comprimento de onda, incluindo a luz solar. Normalmente, a luz modulada inicial aplicada após o tecido vegetal ter sido mantido no escuro é de baixa intensidade ($<1\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e não induz a curva da fluorescência. Uma segunda luz com cerca de $30\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ induz a cinética da curva. Esta segunda luz é frequentemente denominada de luz actínica. Para efetuar as análises dos quenchings (dissipações), uma luz com elevada intensidade luminosa ($>2000\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) é utilizada para “fechar” os centros de reação. Nestes equipamentos as medições são efetuadas ligando-se inicialmente uma luz modulada inicial ($<1\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Esta luz modulada inicial é insuficiente para fechar todos os centros de reação, ou seja, é incapaz de gerar qualquer fluorescência variável. Entretanto, é capaz de induzir apenas o nível F_0 . Desta maneira, um tempo t de luz modulada inicial pode ser permitido para uma clara definição de F_0 . Os fluorômetros modulados têm se destacado nas análises das dissipações (quenchings), o que não é feito pelos fluorômetros transientes (Campostrini, 2001).

Os estudos utilizando o método da fluorescência transiente têm se relacionado às respostas de um tecido fotossintetizante rapidamente iluminado após ter sido mantido no escuro por horas, como nos trabalhos de Oukarroum et al. (2007) e Chen et al. (2015) ou minutos, como nos trabalhos de Zribi et al. (2009), Adamsky et al. (2011), Gomes et al. (2012) e Martins et al. (2015). Na condição de escuro, quando todos os centros de reação encontram-se abertos ou oxidados, várias enzimas do Ciclo de Calvin tornam-se desativadas e devem ser reativadas pela luz. Os metabólitos produzidos no Ciclo de Calvin devem alcançar níveis apropriados para que a fixação do CO_2 ocorra em taxas ótimas. Sendo assim, existe um “período de indução fotossintética” quando o tecido fotossintetizante é rapidamente transferido da condição de escuro para a luz. Neste período, a fixação do CO_2 é baixa.

Durante o período de indução fotossintética, os aceptores localizados nas membranas dos tilacóides estão aptos a receber elétrons das moléculas excitadas pelos fótons. Como resultado, após a iluminação, o número de aceptores aptos a aceitarem os elétrons rapidamente é reduzido a zero, pois todos os sítios de redução estão ocupados em consequência da ativação da fase fotoquímica pela luz. Isto faz com que a energia absorvida em excesso pelas moléculas de clorofilas seja dissipada na forma de fluorescência e/ou calor. Dessa maneira, é esperado que a fluorescência seja elevada durante o período de indução fotossintética e, após este período, é esperado que a emissão da fluorescência seja reduzida. Esta redução na emissão da fluorescência é explicada, pois somente a partir de um determinado tempo de iluminação do tecido as reações de fixação do carbono tornam-se ativas. A cinética desta resposta é denominada de “efeito Kautsky” (Kautsky e Hirsch, 1934) e refere-se aos distintos eventos de oxidação e redução das unidades fotossintéticas enquanto medida da eficiência fotossintética. Esta curva, também chamada de curva OJIP ou mesmo curva de fluorescência, caracteriza-se por apresentar os pontos de uma medida de fluorescência iniciando-se em um estágio inicial basal (F_0) e terminando em um estágio máximo (F_M) separados por um espaço de tempo onde vários pontos podem ser definidos (entre eles: O, J, I, P) (Figura 3).

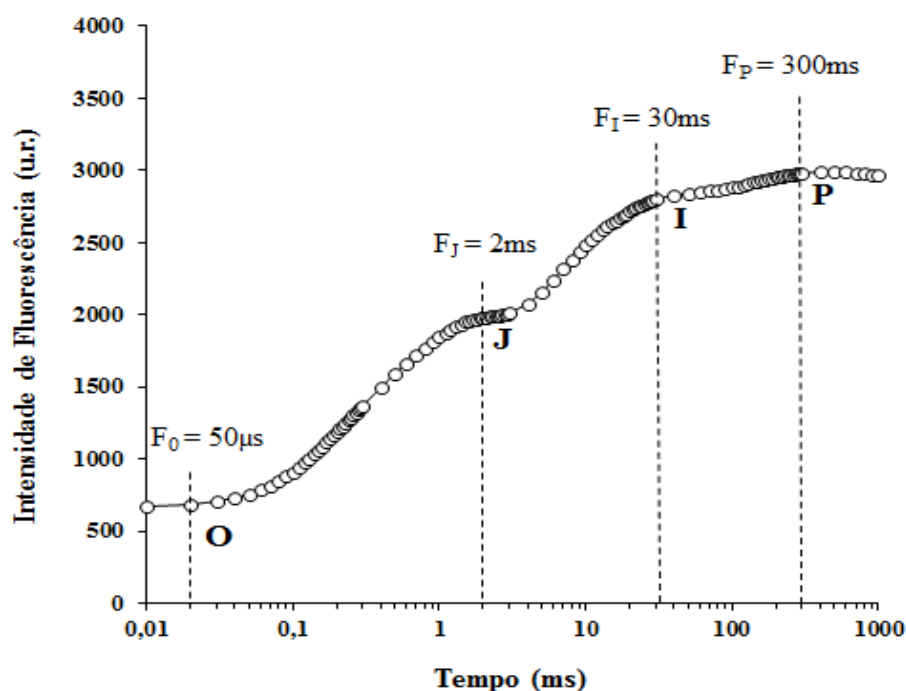


Figura 3. Típico aumento polifásico das curvas de fluorescência da clorofila *a* em plantas. O transiente é plotado em uma escala de tempo logarítmica entre 50μs e 1s. As marcas referem-se aos principais pontos da curva: F_0 (50μs, ponto O), F_J (2ms, ponto J), F_I (30ms, ponto I) e $F_P = F_M$ (300ms, ponto P). Fonte: Arquivo do Laboratório de Ecofisiologia Vegetal.

Na prática, a emissão da fluorescência transiente da clorofila *a* para posterior análise ocorre por meio da indução de um forte pulso de luz ($3000\mu\text{mol}$ (fótons) $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e é registrada entre $10\mu\text{s}$ e 1 s em uma área foliar de 4mm de diâmetro. Em 1 s de medição são registrados 120 pontos de fluorescência. A fluorescência aos $50\mu\text{s}$ é considerada como F_0 (fluorescência inicial) e aos 300ms considerada como F_M (fluorescência máxima). Normalizações podem ser feitas sobre os sinais de fluorescência da curva OJIP, e cálculos sobre intervalos específicos da curva podem dar interpretações a respeito de processos específicos na cadeia transportadora de elétrons da fotossíntese (Strasser et al., 2004; Oukarroum et al., 2007; Stirbet e Govindjee, 2011). Assim, pode-se estudar separadamente, por exemplo, a fase O-J obtida entre $50\mu\text{s}$ e 2ms – que refere-se à redução fotoquímica da quinona A (Q_A) no lado aceptor do FSII –, a fase J-I (de 2 a 30ms) – que evidencia os processos de oxidação/redução do *pool* de plastoquinonas (PQ), citocromo *b6f* (Cyb6f) e plastocianina (PC) – e a fase I-P (entre 30 e 300ms) – que refere-se aos processos de redução dos aceptores finais do FSI, como a ferredoxina (Fd) e NADP – (Schansker et al., 2005; Tóth et al., 2007; Yusuf et al., 2010).

Além disso, para a análise do comportamento dos fotossistemas I e II, vários parâmetros bioenergéticos podem ser derivados a partir do transiente OJIP, de acordo com as equações do teste-JIP, o qual é analisado com base na Teoria de Fluxo de Energia em Biomembranas (Strasser e Strasser, 1995; Strasser et al., 2004). Esta teoria tem sido aplicada principalmente para estudos e análises da distribuição de energia (fluxo, rendimento, probabilidade e taxas constantes de transferência de energia) entre um conjunto de pigmentos em qualquer tipo de biomembranas, como entre os FSII e FSI no aparato fotossintético de plantas e algas (Strasser et al., 2005). Entre os parâmetros que podem ser avaliados com base no teste-JIP estão o rendimento quântico fotoquímico máximo para fotoquímica primária, ou eficiência fotoquímica máxima do FSII, $[\phi P_0 = TR_0/ABS = F_v/F_M]$; os máximos fluxos específicos por centro de reação (RC) em termos de absorção $[ABS/RC = M_0/VJ/\phi P_0]$, captura $[TR_0 = M_0/VJ]$, transporte de elétrons $[ET_0 = (M_0/VJ)\psi E_0 = (M_0/VJ)(1 - VJ)]$ e dissipação $[DI_0/RC = (ABS/RC) - (TR_0/RC)]$; quantidade de centros de reação ativos do FSII por seção transversal $[RC/CS = \phi P_0 \cdot (ABS/CS_0) \cdot (VJ/M_0)]$; Além dos índices de desempenho, que incluem o índice de desempenho para conservação de energia para redução dos aceptores de elétrons do intersistema $[PI_{ABS} = (RC/ABS) \cdot (\phi P_0 / (1 - \phi P_0)) \cdot (\psi_0 / (1 - \psi_0))]$ e o índice de desempenho para conservação de energia para redução dos aceptores finais do FSI $[PI_{TOTAL} = (RC/ABS) \cdot (\phi P_0 / (1 - \phi P_0)) \cdot (\psi E_0 / (1 - \psi E_0)) \cdot (\delta R_0 / (1 - \delta R_0))]$.

Com base nos estudos da fluorescência da clorofila *a* já é bem conhecido que algumas plantas são capazes de se aclimatar e/ou modular o seu aparato fotossintético quando estão frente a condições de déficit hídrico (Van Heerden et al., 2007; Campos et al., 2014). Porém, a capacidade que essas plantas apresentam de tolerar diferentes regimes de escassez hídrica varia de espécie para espécie, com o estágio de desenvolvimento e das suas características morfofisiológicas, as quais são determinadas geneticamente (Lin e Hsu, 2004; Waseem et al., 2011). Desta forma, considerando os grandes desafios na implementação de sistemas de preservação e conservação dos recursos naturais incluindo espécies biológicas, estudos como este, que avaliem a susceptibilidade de espécies de orquídeas à estresses ambientais são de grande relevância para o entendimento das respostas ecofisiológicas destas plantas em condições de déficit hídrico, fornecendo subsídios para futuros projetos de conservação e manejo de espécies de orquídeas neotropicais remanescentes da Mata Atlântica do Estado do Espírito Santo.

3. Referências Bibliográficas

- Adamski J.M., Peters J.A., Danieloski R., Bacarin M.A.** 2011. Excess iron-induced changes in the photosynthetic characteristics of sweet potato. *Journal of Plant Physiology*. 168:205-662.
- Andrade-Souza V., Almeida A-A.F., Corrêa R.X., Costa M.A., Mielke M.S., Gomes F.P.** 2009. Leaf carbon assimilation and molecular phylogeny in *Cattleya* species (Orchidaceae). *Genetics and Molecular Research*. 8:976-989.
- Araujo S.A.C., Deminicis B.B.** 2009. Fotoinibição da Fotossíntese. *Revista Brasileira de Biociências*. 7:463-472.
- Arditti J.** 1992. *Fundamentals of orchid biology*. 1.ed. New York. John Wiley e Sons, New York. 691pp.
- Barros F. de, Vinhos F., Rodrigues V.T., Barberena F.F.V.A., Fraga C.N., Pessoa E.M., Forster W., Menini Neto L., Furtado S.G., Nardy C., Azevedo C.O., Guimarães L.R.S.** 2016. Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB11347>>. Acesso em: 15 Fev. 2016.
- Blackburn G.A.** 2007. Hyperspectral remote sensing of plant pigments. *Journal of Experimental Botany*. 58:855-867.

- Bohnert H.J., Jensen R.G.** 1996. Strategies for engineering water stress tolerance in plants. *Trends in Biotechnology*. 14:89-97.
- Braem G.J.** 1984. *Cattleya* – Band II: Die unifoliaten (einblättrigen) Cattleyen. Brücke-Verlag Kurt Schmiersow, Hildesheim.
- Bray E.** 1997. A Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*, 2:48-54.
- Briantais J.M., Vernotte C., Krause G.H., Weiss E.** 1986. Chlorophyll *a* fluorescence of higher plants: chloroplasts and leaves. In: Govindjee, Ames J and Fork DC (eds) *Light Emission by Plants and Bacteria*, pp. 539-583. Academic Press, New York.
- Buchanan B.B., Wilhelm G., Jones R.L.** 2000. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, 1367p.
- Buyun L., Lavrentyeva A., Kovalska L., Ivannikov R.** 2004. *In vitro* germination of seeds of some rare tropical orchids. *Acta UniversitatisLatviensis*. 676:159-162.
- Campos H., Trejo C., Peña-Valdivia C.B., García-Nava R., Conde-Martínez F.V., Cruz-Ortega M.D.R.** 2014. Photosynthetic acclimation to drought stress in *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck seedlings is largely dependent on thermal dissipation and enhanced electron flux to photosystem I. *Photosynthesis research*.122:23-39.
- Campostrini E.** 2001. Fluorescência da clorofila *a*: considerações teóricas e aplicações práticas. Disponível em: <http://www.uenf.br/Uenf/Downloads/CENTRO_CCTA_1629_1112121492.pdf>. Acesso em: 15 out 2015.
- Carlini-Garcia L.** 2002. A morphometric analysis of floral characters in *Miltonia spectabilis* and *Miltonia spectabilis* var. *moreliana* (Maxillarieae: Oncidiinae). *Lindleyana*. 17:122-129.
- Chaves M.M., Maroco J.P., Pereira J.S.** 2003. Understanding plant responses to drought from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*. 30:239-264.
- Chaitanya K.V., Jutur P.P., Sundar D., Ramachandra R.A.** 2003. Water stress effects on photosynthesis in different mulberry cultivars. *Plant Growth Regulation*. 40:75-80.
- Chen X., Li W., Lu Q., Wen X., Li H., Kuang T., Li Z., Lu C.** 2011. The xanthophyll cycle and antioxidative defense system are enhanced in the wheat hybrid subjected to high light stress. *Journal of Plant Physiology* 168:1828-1836.
- Chen S., Kang Y., Zhang M., Wang X., Strasser R.J., Zhou B., Qiang S.** 2015. Differential sensitivity to the potential bioherbicidetenuazonic acid probed by the JIP-test based on fast chlorophyll fluorescence kinetics. *Environmental and Experimental Botany*. 112:1-15.

- Cornic G.** 2000. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture not by affecting ATP synthesis. *Trends in Plant Science*. 5:187-188.
- Coxson D.S., Nadkarni N.M.** 1995. Ecological roles of epiphytes in nutrient cycles of forest ecosystems. In: M. D. Lowman; N. M. Nadkarni. *Forest canopies*. 1st ed. Academic Press, San Diego.
- Cruz D.T., Borba E.L., Van Den Berg C.** 2003. O gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) no Estado da Bahia, Brasil. *Sitientibus série Ciências Biológicas* 3:26-34.
- Cushman J.C.** 2001. Crassulacean Acid Metabolism. A Plastic Photosynthetic Adaptation to Arid Environments. *Society*. 127:1439-1448.
- Cushman J.C., Borland A.M.** 2002. Induction of Crassulacean acid metabolism by water limitation. *Plant Cell and Environment*. 25:295-310.
- Demmig-Adams B., Adams W.W.III., Mattoo A.** 2006. Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment. *Advances in Photosynthesis and Respiration* (Series ed. Govindjee), vol. 21. Dordrecht: Springer.
- Drennan P.M., Nobel P.S.** 2000. Responses of CAM species to increasing atmospheric CO₂ concentrations. *Plant, Cell and Environment*. 23:767-781.
- Dressler R.L.** 1993. *Phylogeny and Classification of the Orchid Family*. – Dioscorides Press, Portland.
- Farias L.A., Ribeiro, R.** 2000. Pôster Apresenta orquídeas na Mata Atlântica. *Revista O Mundo das Orquídeas*, 13:43-45.
- Foyer C.H., Noctor G.** 2000. Oxygen processing in photosynthesis regulation and signaling. *New Phytologist*. 146:359-388.
- Frank H.A., Young A.J., Britton G., Cogdell R.J.** 1999. The photochemistry of carotenoids. *Advances in Photosynthesis and Respiration* (Series ed., Govindjee), vol. 8. Dordrecht: Kluwer Academic (now Springer).
- Galdiano Júnior R.F., Mantovani C., Cassano A.O., Lemos E.G.M.** 2013. Desenvolvimento inicial e crescimento in vitro de *Cattleya violacea* (Kunth) Rolfe em diferentes concentrações de sacarose. *Acta Amazonica*. 43:127-134.
- Gentry A. H.** 1988. Changes in plant community diversity and floristic composition on environment and geographical gradients. *Annals of the Missouri Garden*. 75:1-34.
- Goh C.J., Kluge M.** 1989. Gas exchange and water relations in epiphytic orchids, in: Lüttge U. (Ed.), *Vascular Plants as Epiphytes, Evolution and Ecophysiology*, Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 139-166.

- Gomes M.T.G., Luz A.C., Rossi M.S., Batittuci M.C.P., Silva D.M., Falqueto A.R.** 2012. Drought tolerance of passion fruit plants assessed by the OJIP chlorophyll *a* fluorescence transient. *Scientia Horticulturae*. 142:49-56.
- Gonçalves J.F.C., Silva C.E., Guimarães D.G., Bernardes R.S.** 2010. Análise dos transientes da fluorescência da clorofila *a* de plantas jovens de *Carapa guianensis* e de *Dipteryx odorata* submetidas a dois ambientes de luz. *ActaAmazonica*. 40:89-98.
- Govindjee.** 1995. Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll *a* fluorescence. *Australian Journal of Plant Physiology*. 22:131-160.
- Govindjee, Kern J.F., Messinger J., Whitmarsh J.** 2010. Photosystem II. *Encyclopedia of Life Sciences*. p.1-15.
- Gravendeel B., Smithson A., Slik F.J.W., Schuitman A.** 2004. Epiphytism and pollinator specialization: drivers for orchid diversity? - *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 359:1523-1535.
- Hamdy A., Ragab R., Scarascia-Mugnozza E.** 2003. Coping with water scarcity: water saving and increasing water productivity. *Irrigation and Drainage*. 52:3-20.
- Han S.K., Wagner D.** 2014. Role of chromatin in water stress responses in plants. *Journal of Experimental Botany*. 65:2785-2799.
- Harb A., Krishnan A., Ambavaram M.M.R., Pereira A.** 2010. Molecular and Physiological Analysis of Drought Stress in *Arabidopsis* Reveals Early Responses Leading to Acclimation in Plant Growth. *Plant Physiology*. 154:1254-1271.
- He J., Tan B.H.G., Qin L.** 2011. Source-to-sink relationship between green leaves and green pseudobulbs of *C₃* orchid in regulation of photosynthesis. *Photosynthetica*. 49:209-218.
- He J., Norhafis H., Qin L.** 2013. Responses of Green Leaves and Green Pseudobulbs of CAM Orchid *Cattleya laeliocattleya* Aloha Case to Drought Stress. *Journal of Botany*. 2013:1-9.
- Herrera A.** 2009. Crassulacean acid metabolism and fitness under water deficit stress: if not for carbon gain, what is facultative CAM good for? *Annals of Botany*. 103:645-653.
- Hendry G.A.F., Price A.H.** 1993. Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. *Methods in Comparative Plant Ecology*. p.148-152.
- Hew C.S., Yong J.W.H.** 1997. *The Physiology of Tropical Orchids in Relation to the Industry*. – World Scientific Publishing. Singapore.
- IPCC: Summary for Policymakers.** 2013. – In: Stocker, T.F., Qin, D., Plattner, G.K., Tignor M.M.B., Allen S.K., Boschung J., Nauels A., Xia Y., Bex V., Midgley P.M. ed.):

- Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge and New York.
- Janečková P., Wotavová K., Schödelbauerová I., Jersáková J., Kindlmann P.** 2006. Relative effects of management and environmental conditions on performance and survival of populations of a terrestrial orchid, *Dactylorhiza majalis*. *Biological Conservation*. 129:40-49.
- Jones, H. G.; Corlett, J. E.** 1992. Current topics in drought physiology. *Journal of Agricultural Science*. 119:291-296.
- Karaba A., Dixit S., Greco R., Aharoni A., Trijatmiko K.R., Marsch-Martinez N., Krishnan A., Nataraja K.N., Udayakumar M., Pereira A.** 2007. Improvement of water use efficiency in rice by expression of HARDY, an *Arabidopsis* drought and salt tolerance gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104:15270-15275.
- Kautsky H., Hirsh A.** 1934. Chlorophyllfluoreszenz und Kohlensäureassimilation. Das fluoreszenzgrünepflanzen. *Biochemische Zeitschrift*, v. 274, p. 423-434. In Campostrini, E. Fluorescência da clorofila a: considerações teóricas e aplicações práticas. 2001. Disponível em: <http://www.uenf.br/Uenf/Downloads/CENTRO_CCTA_1629_1112121492.pdf>. Acesso em: 15out 2015.
- Kerbaux G.B.** 2004. *Fisiologia Vegetal*. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, RJ.
- Kerbaux G.B., Takahashi C.A., Lopez A.M., Matsumura A.T., Hamachi L., Félix L.M., Pereira P.N., Freschy L., Mercier H.** 2012. Crassulacean Acid Metabolism in Epiphytic Orchids : Current Knowledge, Future Perspectives. *Applied Photosynthesis*. 4:81-105.
- Kluge M., Ting I.P.** 1978. Crassulacean acid metabolism. Analysis of an ecological adaptation, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Kolber Z., Falkowski P.** 1993. Use of active fluorescence to estimate phytoplankton photosynthesis in situ. *Limnology Oceanography*. 38:1646-1665.
- Krause H., Weis E.** 1984. Chlorophyll fluorescence as tool in plant physiology. *Botanisches Institut der Universität Düsseldorf. Photosynthesis Research*. 5:139-157.
- Krause H., Weis E.** 1988. In: Applications of chlorophyll fluorescence. (ed.) Lichtenthaler, H.K. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Krause G.H., Weis E.** 1991. Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 42:313-349.

- Kumaria S., Tandon P.** 2001. Orchids: the world's most wondrous plants. In: PATHAK, P.; SEHGAL, R.N.; SHEKHAR, N.; SHARMA, M.; SOOD, A. Orchids: science and commerce. 1a ed. India, Bishen Singh Mahendra Pal Singh. p.17-28.
- Ladjal M., Epron D., Ducrey M.** 2000. Effects of drought preconditioning on thermo tolerance of photosystem II and susceptibility of photosynthesis to heat stress in cedar seedlings. *Tree Physiology*. 20:1235-1241.
- Lambers H., Chapin III., F.S., Pons T.L.** 2008. *Plant Physiological Ecology*. 2 ed. Springer, 604 p.
- Lawlor D.W., Cornic G.** 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment*. 25:275-294.
- Lawson T., Oxborough K., Morison J.I.L., Baker N.R.** 2003. The responses of guard and mesophyll cell photosynthesis to CO₂, O₂, light, and water stress in a range of species are similar. *Journal of Experimental Botany*. 54:1743-1752.
- Lazár D.** 1999. Chlorophyll *a* fluorescence induction. *Biochimica et Biophysica Acta* 1412: 1-28.
- Levitt J.** 1972. Responses of plants to environmental stresses. Academic Press: New York.
- Li Z.G., Yuan L.X., Wang Q.L., Ding Z.L. Dong C.Y.** 2013. Combined action of antioxidant defense system and osmolytes in chilling shock-induced chilling tolerance in *Jatropha curcas* seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*. 35:2127-2136.
- Lin M.J, Hsu B.D.** 2004. Photosynthetic plasticity of *Phalaenopsis* in response to different light environments. *Journal Plant Physiology*. 161:1259-1268.
- Ludlow M.M.** 1989. Strategies of response to water stress. In 'Structural and functional responses to environmental stresses'. (Eds KH Kreeb, H Richter and TM Hinckley) pp. 269-281.
- Lukatkin A.S., Brazaityte A., Bobinas C., Duchovskis P.** 2012. Chilling injury in chilling-sensitive plants: a review. *Agriculture*. 99:111-124.
- Luković, J., Maksimović, I., Zoric, L., Nagl, N., Perčić, M., Polić, D., Putnik-Delić, M.** 2009. Histological characteristics of sugar beet leaves potentially linked to drought tolerance. *Industrial Crops and Products*. 30 p.281.
- Lüttge U.** 2004. Ecophysiology of Crassulacean Acid Metabolism (CAM). *Annals of Botany*. 93:629-52.

- Macedo M.C., Rosa, Y.B.C.J., Scalón S.P.Q., Junior E.J.R., Vieira M.C., Tatara M.B.** 2011. Substratos e intensidades de luz no cultivo de orquídea denfal. *Horticultura Brasileira*. 29:168-173.
- Martini P.C., Willadino L., Alves G.A., Donato V.M.T.S.** 2001. Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por sementeira in vitro. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 36:1319-1324.
- Martins J.P.R., Schimildt E.R., Alexandre R.S., Falqueto A.R., Otoni W.C.** 2015. Chlorophyll a fluorescence and growth of *Neoregelia concentrica* (Bromeliaceae) during acclimatization in response to light levels. In *Vitro Cellular e Developmental Biology – Plant*. 5pp.
- Mattiuz C.F.M., Rodrigues T.J.D., Mattiuz B.** 2006. Aspectos fisiológicos de orquídeas cortadas. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*. 12:21-30.
- McDowell N., Pockman W.T., Allen C.D., Breshears D.D., Cobb N., Kolb T., Plaut J., Sperry J., West A., Williams D.G., Yepez E.A.** 2008. Mechanisms of plant survival and mortality during drought: Why do some plants survive while others succumb to drought? *New Phytologist*. 178:719-739.
- Medrano H., Parry M.A., Socias X., Lawlor D.W.** 1997. Long term water stress inactivates Rubisco in subterranean clover. *Annals of Applied Biology*. 131:491-501.
- Minardi B.D., Paula A., Voytena L., Santos M., Randi Á.M., Randi M.** 2014. The Epiphytic Fern *Elaphoglossum luridum* (Fée) Christ. (Dryopteridaceae) from Central and South America: Morphological and Physiological Responses to Water Stress. *The Scientific World Journal*. 2014:1-9.
- Moraes C.P., Santos N.S., Massaro R., Cordeiro G.M., Leal T.S.** 2009. Desenvolvimento in vitro de *Cattleya tigrina* A. Richard (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. *Ensaio e Ciência*. 8:57-65.
- Nadkarni, N. M.** 1986. An ecological overview and checklist of vascular epiphytes in the Monteverde cloud forest reserve. Costa Rica. *Brenesia*. 24:55-632.
- Nicklisch A., Köhler J.** 2001. Estimation of primary production with Phyto-PAM-Fluorometry. Annual Report Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries Berlin. v. 13, p. 47-60.
- Noctor G., Foyer C.H.** 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 49:249-279.

- Noctor G., Mhamdi A., Foyer C.H.** 2014. The Roles of Reactive Oxygen Metabolism in Drought: Not So Cut and Dried. *Plant Physiology*. 164:1636-1648.
- Oliveira V. Del C., Sajo, M.G.** 1999. Anatomia foliar de espécies epífitas de Orchidaceae. *Revista Brasileira de Botânica*. 22:365-374.
- Oukarroum A., Madidi S.E., Schansker G., Strasser R.J.** 2007. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll a fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering. *Environmental and Experimental Botany*. 60:438-446.
- Paula C.C., Silva H.M.P.** 2004. Cultivo prático de orquídeas. Editora UFV. 3ª ed.106p.
- Pires MV, de Almeida AAF, Abreu PP, da Costa Silva D.** 2012. Does shading explain variation in morphophysiological traits of tropical epiphytic orchids grown in artificial conditions? *Acta Physiologiae Plantarum*. 34:2155-2164.
- Portal do Ministério do Meio Ambiente– MMA. Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção.** 2008. Disponível em: <www.mma.gov.br/estruturas/ascom_boletins/_arquivos/83_19092008034949.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2016.
- Price A.H., Cairns J.E., Horton P., Jones H.G., Griffiths H.** 2002. Linking drought-resistance mechanisms to drought avoidance in upland rice using a QTL approach: progress and new opportunities to integrate stomatal and mesophyll responses. *Journal Experimental Botany*. 53:989-1004.
- Ramalho A.M.Z., Pimenta H.C.D.** 2010. Valoração econômica do dano ambiental ocasionado pela extração ilegal da orquídea *Cattleya granulosa* no parque natural Dom Nivaldo Monte, Natal/RN. *Holos*. 1:62-82.
- Rodrigues M.C., Matiz A., Cruz A.B., Matsumura A.T., Takahashi C.A., Hamachi L., Félix L.M., Pereira P.N., Aidar S.R.L., Aidar M.P.M., Demarco D., Freschi L., Mercier H. Kerbaudy G.B.** 2013. Spatial patterns of photosynthesis in thin- and thick-leaved epiphytic orchids: unravelling C₃–CAM plasticity in an organ-compartmented way. *Annals of Botany*. 112:17-29.
- Santos M.G., Ribeiro R.V., Oliveira R.F., Machado E.C., Pimentel C.** 2006. The role of inorganic phosphate on photosynthesis recovery of common bean after a mild water deficit. *Plant Science*. 170:659-64.
- Schansker G., Tóth S.Z., Strasser R.J.** 2005. Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl *a* fluorescence rise OJIP. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1706:250-261.

- Schoefs B.** 2002. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. *Trends in Food Science and Technology*. 13:361-371.
- Seaton G.G.R., Walker D.A.** 1990. Chlorophyll fluorescence as a measure of photosynthetic carbon assimilation. *Proceedings of the Royal Society of London B*. 242:29-35.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.** 1997. Gene expression and signal transduction in water estresse response. *Plant Physiology*. 115:327-334.
- Silva M.F.F., Silva J.B.F., Rocha A.E.S., Oliveira F.P.M., Gonçalves L.S.B., Silva M.F., Queiroz O.H.A.** 1995. Inventário da Família Orchidaceae na Amazônia Brasileira Parte I. *Acta Botânica Brasilica*. 9:163-175.
- Silva E.F.** 2003. Multiplicação e crescimento in vitro de orquídea *Brassocattleya* Pastoral x *Laeliocattleya* Amber Glow. 62p. Dissertação de Mestrado do Programa de pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal de Lavras.
- Silvera K., Santiago L.S., Cushman J.C., Winter K.** 2009. Crassulacean acid metabolism and epiphytism linked to adaptive radiations in the Orchidaceae. *Plant Physiology*. 149:1838-1847.
- Silvera K., Neubig K.M., Whitten W.M., Williams N.H., Winter K., Cushman J.C.** 2010a. Evolution along the crassulacean acid metabolism continuum. *Functional Plant Biology*. 37:995-1010.
- Silvera K., Santiago L.S., Cushman J.C., Winter K.** 2010b. The incidence of crassulacean acid metabolism in Orchidaceae derived from carbon isotope ratios: A checklist of the flora of Panama and Costa Rica. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 163:194-222.
- Singer R.B.** 2004. Orquídeas brasileiras. Disponível em: <<http://www.webbee.org.br/singer/01.htm>>. Acessoem: 11 set. 2015.
- Singer R.B.** 2006. Abelhas nativas e orquídeas no Brasil. In: IX Encontro Estadual de Apicultores, 2006, Ijuí, RS. Anais do IX Encontro Estadual de Apicultores.
- Singer R.B., Sazima M.** 2001. The Pollination Mechanism of Three *Sympatric Prescottia* (Orchidaceae: Prescottinae) Species in Southeastern Brazil. *Annals of Botany*. 88:999-1005.
- Singer R.B., Koehler S.** 2004. Pollinarium Morphology and Flora Rewards in Brazil Maxillariinae (Orchidaceae). *Annals of Botany*. 93:39-51.
- Song Y., Miao Y., Song C-P.** 2014. Behind the scenes: the roles of reactive oxygen species in guard cells. *New Phytologist*. 201:1121-1140.

- Souza R.P., Machado E.C., Silva J.A.B., Lagoa A.M.M.A., Silveira J.A.G.** 2004. Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. *Environmental and Experimental Botany*. 51:45-56.
- Stancato G.C., Mazzafera P., Buckeridge M.S.** 2001. Effect of a drought period on the mobilisation of non-structural carbohydrates, photosynthetic efficiency and water status in an epiphytic orchid. *Plant Physiology and Biochemistry*. 39:1009-16.
- Stirbet A., Govindjee.** 2011. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll *a* fluorescence induction) and Photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. Elsevier B.V. 104:236-57.
- Strasser B.J., Strasser R.J.** 1995. Measuring fast fluorescence transient to address environmental questions: The JIP-test. In: P. Mathis (Ed.); *Photosynthesis: from Light to Biosphere*. Springer Netherlands. p.977-980.
- Strasser R.J., Srivastava A., Tsimilli-Michael M.** 2000. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: Yunus M (ed) *Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation*. Taylor and Francis, London, pp 445-483.
- Strasser R.J., Michael M.T., Srivastava A.** 2004. Analysis of the Chlorophyll *a* Fluorescence Transient. In: G. ;Govindje. Papageorgiou (Ed.); *Advances in Photosynthesis and Respiration Chlorophyll Fluorescence a Signature of Photosynthesis*. Kluwer Academic Publishers. p.321-362.
- Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Srivastava A.** 2005; Analysis of the Fluorescence Transient Summary II . The Theoretical Background. p. 1-47.
- Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Qiang S., Goltsev V.** 2010. Simultaneous in vivo recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1797:1313-1326.
- Streit N.M., Canterle L.P., Canto M.W., Hecktheuer L.H.H.** 2005. The Chlorophylls. *Ciencia Rural*. 35:748-755.
- Sunagawa H., Cushman J.C., Agarie, S.** 2010. Crassulacean acid metabolism may alleviate production of reactive oxygen species in a facultative CAM plant, the common ice plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Production Science*. 13:256-260.

- Suzuki N., Koussevitzky S., Mittler R., Miller G.** 2012. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell and Environment*. 35:259-270.
- Taiz L., Zeiger E.** 2013. *Fisiologia Vegetal*. 5ª ed. São Paulo.
- Tausz M., Hietz P., Briones O.** 2001. The significance of carotenoids and tocopherols in photoprotection of seven epiphytic fern species of a Mexican cloud forest. *Australian Journal of Plant Physiology*. 28:775-783.
- Tezara W., Mitchell V.J., Driscoll S.D., Lawlor D.W.** 1999. Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature*. 401:914-917.
- The Plant List.** 2013. Version 1.1. Published on the Internet. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/>>. Acesso em: 11 set. 2015.
- Thoren D., Thoren P., Schmidhalter U.R.S.** 2010. Influence of ambient light and temperature on laser-induced chlorophyll fluorescence measurements. *European Journal of Agronomy*. 32:169-176.
- Tombolato A.F.C., Costa A.M.M.** 1998. Micropropagação de plantas ornamentais. Campinas, Instituto Agronômico. Boletim técnico (174). 72pp.
- Tóth S.Z., Schanker G., Strasser R.J.** 2007. A non-invasive assay of the plastoquinone pool redox state based on the OJIP – transient. *Photosynthesis Research*. 93:193-203.
- Tsimilli-Michael M., Strasser R.J.** 2008. In vivo Assessment of Stress Impact on Plant's Vitality: Applications in Detecting and Evaluating the Beneficial Role of Mycorrhization on Host Plants. In: A. Varma (Ed.); *Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics*. Dordrecht: Springer. p. 679-703.
- Turner N.C.** 1981. Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. *Plant and Soil*. 58:339-366.
- Van Den Berg, C.** 1996. Estudo dos padrões de variabilidade intra e interespecífica em espécies brasileiras de *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae - Laeliinae). Dissertação (Mestrado em Ecologia), Universidade Estadual de Campinas.
- Van den Berg C.** 2008. New combinations in the genus *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae). *Neodiversity*. 3:3-12.
- Van den Berg C., Higgins W.E., Dressler R.L., Whitten W.M., Culham A.** 2000. A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana*. 15:96-114.

- Van Heerden P.D.R., Swanepoel J.W., Krüger G.H.J.** 2007. Modulation of photosynthesis by drought in two desert scrub species exhibiting C₃-mode CO₂ assimilation. *Environmental and Experimental Botany*. 61:124-136.
- Von Elbe J.H.** 2000. Colorantes. In: FENNEMA, O.W. *Química de los alimentos*. 2.ed. Zaragoza : Wisconsin - Madison. 10:782-799.
- Waechter J.L.** 1996. Epiphytic orchids in eastern subtropical South America. In: 15th World Orchid Conference, 1998, Rio de Janeiro. Proceedings. Turriers: Naturalia. p. 332-341.
- Waseem M., Ali A., Tahir M., Nadeem M.A., Ayub M., Tanveer A., Ahmad R., Hussain M.** 2011. Mechanisms of drought tolerance in plant and its management through different methods. *Continental Journal of Agricultural Science*. 5:10-25.
- Winter K., Lüttge U., Winter E., Troughton J.H.** 1978. Seasonal shift from C₃ photosynthesis to Crassulacean acid metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum* growing in its natural environment. *Oecologia*. 34:225-237.
- Winter K., Smith J.A.C.** 1996. An introduction to crassulacean acid metabolism. Biochemical principles and ecological diversity. In: Winter K, Smith JAC, eds. *Crassulacean acid metabolism: biochemistry, ecophysiology and evolution*. Springer-Verlag, p. 1-13.
- Winter K., Aranda J., Holtum J.A.M.** 2005. Carbon isotope composition and water-use efficiency in plants with crassulacean acid metabolism. *Functional Plant Biology*. 32:381-388.
- Yang J., Zhang J., Wang Z., Zhu Q., Liu L.** 2001. Wheat: Water deficit-induced senescence and its relationship to the remobilization of pre-stored carbon in wheat during grain filling. *Agronomy Journal*. 93:196-206.
- Yusuf M.A., Kumar D., Rajwanshi R., Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Govindjee, Sarin N.B.** 2010. Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. Elsevier B.V. 1797:1428-38.
- Zanenga-Godoy R., Costa C.G.** 2003. Anatomia foliar de quatro espécies do gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) do Planalto Central Brasileiro. *Acta Botanica Brasílica*. 17: 101-118.

- Zobayed S.M.A., Afreen F., Kozai T.** 2007. Phytochemical and physiological changes in the leaves of St John's wort plants under a water stress condition. *Environmental and Experimental Botany*. 59:109-116.
- Zotz G., Hietz P.** 2001. The physiological ecology of vascular epiphytes: current knowledge, open questions. *Journal of Experimental Botany*. 52:2067-2078.
- 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.
- Zribi L., Fatma G., Fatma R., Salwa R., Hassan N., Néjib R.M.** 2009. Application of chlorophyll fluorescence for the diagnosis of salt stress in tomato "*Solanum lycopersicum* (variety Rio Grande)". *Scientia Horticulturae* 120:367-372.

CAPÍTULO II

Analyse of OJIP transients in leaves of two CAM and C₃ epiphytic orchids, *Cattleya warneri* and *Miltonia spectabilis* under drought stress

J.B. ZAMPIROLLO* and A.R. FALQUETO*,⁺

*Departamento de Ciências Agrárias e Biológicas, Centro Universitário Norte do Espírito Santo, Universidade Federal do Espírito Santo, 29932-540 São Mateus/ES, Brazil**

Abstract

We studied the impact of drought stress for 90 days on two orchid species, *Cattleya warneri* T. Moore (CAM) and *Miltonia spectabilis* Lindl. (C₃), using the chlorophyll (Chl) *a* fluorescence. Water relations in orchid tissues were determined on the basis relative water content of leaves (RWC). Increases in O-J and J-I phases, L and K-Bands and decreases of I-P phase were observed after 30 days, but more evidently in CAM species. These results showed that the two orchid species are sensitive to WD as from 30 days. The decreases of the capacity to reduce photochemically Q_A, of the kinetic properties required for redox reactions of the PQ *pool*, loss of energetic connectivity between units of PSII, inactivation of the oxygen evolution complex and decrease of global rate to reduction the electron acceptors *pool* of PSI were lower in *M. spectabilis*, species evidently more tolerant. A possible explanation for this result might be the occurrence of photorespiratory activity in C₃ species, but mainly by the higher ability of C₃ species to mobilize water from pseudobulbs and senescent leaves to the younger leaves maintaining a higher RWC. More water in photosynthetic tissues allow the greater photochemical activity.

Additional key words: ecophysiology, epiphytes, OJIP curves, water stress.

⁺Corresponding author. Tel.: +55-27-3312-1548. E-mail addresses: antelmofalqueto@gmail.com.

Abbreviations: Chl – chlorophyll; OEC - oxygen evolution complex; RC – reaction center; RWC – relative water content; WD – water deficit.

O manuscrito será submetido ao periódico Photosynthetica.

Introduction

Epiphytic orchids are among the most diverse group of plants and are typically found a wide variety of niches, varying from the constantly humid to seasonally dry places (Rodrigues *et al.* 2013). The epiphytic habitat is considered the most severe niche in tropical forests, subjecting the plants to various xerophytic conditions, such as high radiation and low availability of water and nutrients (Gravendeel *et al.* 2004, He *et al.* 2013, Minardi *et al.* 2014). Among the abiotic factors, low water availability or water deficit (WD), is probably the most limiting the survival of epiphytic plants, influencing on cell turgidity, stomatal opening and structure of chloroplasts, leading to decreases in transpiration rates and CO₂ assimilation (Chaitanya *et al.* 2003, Waseem *et al.* 2011, He *et al.* 2013). This reduction in CO₂ assimilation can be caused by damage to the reaction center (RC) and consequent decline of electron transfer reactions in photosystem II (PSII), affecting the quantum production of the photosynthetic apparatus as a whole (Stancato *et al.* 2001, Santos *et al.* 2006). With the global climate changes, the natural environments, especially the tropical rainforests and their species, can be subject to the direct effects of changes in rainfall regimes and longer periods of WD (McDowell *et al.* 2008, IPCC 2013, Han and Wagner 2014, Campos *et al.* 2014).

In terms of metabolic strategies to tolerate the WD, many groups of epiphytic orchids evolved an important ecophysiological adaptation, the photosynthesis with crassulacean acid metabolism (CAM), which allows an greater in water use efficiency, consuming less water per unit of assimilated carbon (Cushman 2001, Zotz and Hietz 2001, Lüttge 2004, Herrera 2009, Silvera *et al.* 2010a,b). CAM orchids have related to your metabolism, a high degree of succulence of tissues, which differs considerably from the orchids and other plants with C₃ metabolism (Goh and Kluge 1989, Benzing 1990). Also, another important feature present in many orchids is the pseudobulb, an specialized organ in the storage and supply of water and nutrients (Goh and Kluge 1989, He *et al.* 2011). The pseudobulbs are characterized by the presence of thick cuticle, absence of stomata and abundance of cells that act as water reserves, making this organ important in maintaining the water status of the leaves and consequent survival of plants in drought periods (Stancato *et al.* 2001, Hew and Yong 2004, He *et al.* 2013). Although the pseudobulbs act as efficient storage organs, many species of epiphytic orchids are sensitive to prolonged periods of drought (Sinclair 1983, He *et al.* 2013). Under these conditions, the photosynthetic capacity and the consequent carbon fixation can be drastically reduced (He *et al.* 2013).

The photosynthetic capacity of plants should be assessed by chlorophyll *a* fluorescence. This is an efficient, non-invasive and widespread method in studies aimed at the detection of environmental stresses on the units of photosynthetic apparatus (Oukarroum *et al.* 2007, Mehta *et al.* 2010, Yusuf *et al.* 2010, Chen *et al.* 2015). This technique allows the rapid obtaining information about the photochemical and non-photochemical processes occurring in the thylakoids membranes of chloroplasts (Yusuf *et al.* 2010), contributing to the understanding of plant physiology and plant ecology (Krause and Weis 1991).

The present study aims at evaluating the effects of WD on the behavior of OJIP transients in two orchid species that differ in carbon fixation metabolism. Thus, *Cattleya warneri* T. Moore (CAM metabolism) and *Miltonia spectabilis* Lindl. (C₃ metabolism) were used as a model to be important in floristic composition of the Atlantic Forest, present strong economic appeal, to be targets of extraction in native forests, and in the near future, to face the effects of climate change.

Materials and methods

Plant material and culture conditions: The experiment was conducted at Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) – Campus de São Mateus, Espírito Santo State, Brazil (18°40'S 39°51'O). Mature plants of orchids (*Cattleya warneri* T. Moore. and *Miltonia spectabilis* Lindl.) were obtained from an orchid nursery (João Neiva, ES) and transferred to a orchid nursery situated at the UFES – Campus de São Mateus, where was carried the experiment. The plants were kept under photosynthetic photon flux density (PPFD) of 200-300 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (linear quantum sensor - QSPAR, Hansatech, UK), which represents $\approx 15\%$ of photosynthetically active radiation (PAR), temperature of 30/25 °C (day/night) and relative humidity around 80%. These conditions are close to those found in their place of origin (orchid nursery in João Neiva) and also some of the natural habitats of these species under the canopy in the Atlantic Forest.

The plants were acclimated for two months before the start of the experiment being irrigated daily or every two days (depending on the humidity of the substrate). After this period, the plants were divided in two groups: plants maintained with irrigation (used as control) and plants subjected to intermittent water deficit (WD). The evaluations were initiated on day 0 (initiation of the experiment), and followed every 15 days up to 90 days (0, 15, 30, 45, 60 and 90 d of WD).

Leaf relative water content: The leaf relative water content (RWC) was determined as previously described by Barrs and Weatherley (1962). Five leaf discs (diameter 0.6 cm) from five plants were sampled and immediately weighed (FW). Then, they were immersed in distilled water in Petri dishes for 24 h at 25 °C under a photon flux density of $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and the turgid weight (TW) determined. The discs were dried in an oven at 70°C for 48h and the dry weight (DW) obtained. RWC was calculated using the following equation: $\text{RWC} = (\text{FW} - \text{DW}) / (\text{TW} - \text{DW}) \times 100$.

Chlorophyll *a* fluorescence: Chlorophyll (Chl) *a* fluorescence measurements were conducted on mature and fully expanded leaves at room temperature using a portable fluorimeter Handy PEA (Hansatech, King's Lynn, Norfolk, UK) as described by Strasser and Strasser (1995). The evaluations were performed in five plants in the morning (between 8:00–9:00 h) at 0, 15, 30, 45, 60 and 90 days of water deficit (WD) experiment. All samples were dark adapted for at least 1 h before the measurements, a sufficient period for complete oxidation of the photosynthetic system (Oukarroum *et al.* 2007, Chen *et al.* 2015). The Chl *a* fluorescence emission was induced by of a single strong light pulse ($3000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and recorded between 10 μs and 1 s by the instrument.

Standardizations were made on the fluorescence signals of OJIP curves. From the subtraction of double standards between the points O ($F_0 = 50 \mu\text{s}$) and P ($F_m = 300 \mu\text{s}$) was obtained the curves of the relative variable fluorescence [$V_t = (F_t - F_0) / (F_m - F_0)$]; between the points O and K (300 μs) was obtained $V_{OK} = (F_t - F_0) / (F_K - F_0)$; from the points O and J (2 ms) was obtained $V_{OJ} = (F_t - F_0) / (F_J - F_0)$; between the points O and I (30 ms) was obtained $V_{OI} = (F_t - F_0) / (F_I - F_0)$; and between the points I and P (300 ms) was obtained $V_{IP} = (F_t - F_I) / (F_P - F_I)$.

Obtained the variable fluorescence between specific intervals of the curve, we calculated the kinetic difference between controls and treatments plants: $\Delta V = V_{\text{treatment}} - V_{\text{control}}$, which reveal bands between O-J, J-I and I-P phases (Strasser *et al.* 2004, Oukarroum *et al.* 2007, Stirbet and Govindjee 2011).

Experimental design and data analyses: The experiment was conducted in a completely randomized design, using two species (*Cattleya warneri* and *Miltonia spectabilis*) under WD during 90 days. The OJIP transients data were obtained by The Biolyser 4HP software (Biolyser © R. M. Rodriguez, The Bionenergetics Laboratory, University of Geneva, Geneva,

Switzerland, version 3.06) and after, transferred to Excel version Windows 2013 software for construct graphs of the transients. Five plants were used per treatment.

Results

The leaf relative water content reduced in both species from 92.7% and 93.3% to 45.8% and 54.4% after 90 days of water suppression in *Cattleya warneri* and *Miltonia spectabilis*, respectively, representing an reduction of about 50.5 and 41.6% in relation to day zero (before water stress), respectively. Reductions ($p < 0.05$) of RWC occurred as from WD-30 in *C. warneri* and only as from WD-60 in *M. spectabilis*, which maintained higher values from WD-30 to WD-90. The variable relative fluorescence between steps O (50 μ s) and P (300ms) was normalized and show as $V_t = (F_t - F_0) / (F_P - F_0)$ and $\Delta V_t = [V_{t(\text{treatment})} - V_{t(\text{control})}]$ (Fig. 1). Increases of J-step were observed at 30 days of water deficit (WD-30) in both species and persisted until WD-90 (Fig. 1A,B). However, the J-step values were higher in the CAM species *C. warneri*, which was also characterized by a small increase in the I-step (Fig. 1A). The analyses of the kinetic difference ΔV_t evidenced positive bands between the O-J and J-I phases (Fig. 1C,D). This occurred as from 15 days of water deficit (WD-15) in both orchid species. However, curves more positive were observed in the CAM species (approximately 20% at WD-90) compared to C_3 species ($\approx 10\%$) (Fig. 1C,D). Note that ΔV_t was similar between WD-30 and WD-45 in the C_3 species, *M. spectabilis*. In this species, the effects of water deficit observed on chlorophyll fluorescence at WD-90 (maximum values obtained for this species) were similar to those observed at WD-30 in CAM species, *C. warneri*.

In both species, the energetic connectivity (L-band) and the stability of oxygen evolution complex-OEC (K-band) decreased after WD-15 and reached the minimum on day of maximum stress (approximately 12% and 18% in *C. warneri* and $\approx 8\%$ and $\approx 9\%$ in *M. spectabilis* for the L and K-band, respectively) (Fig. 2). However, in *C. warneri*, the increment observed in both L and K-band occurred gradually from WD-15 to WD-90 (Fig. 2A,C). To C_3 species, the effects of water deficit on the energetic connectivity were grouped in three levels: 1- WD-0 and WD-15 (to which no change in the L-band values was observed); 2- from WD-30 to WD-60 (characterized by similar values of L-band) and 3- WD-90 (to which maximum value of L-band was recorded). Furthermore, K-band with negative amplitude was observed at WD-15 followed by an increment until WD-90 (Fig. 2B,D).

To well distinguish the behavior of PSII and PSI between the two orchid species presenting photosynthetic metabolism C_3 and CAM, I-P phase was analyzed utilizing two

different normalization procedures: $V_{OI \geq 1}$ [normalization between O and I-step, only the part with $V_{OI \geq 1}$] (Fig. 3A,B) and V_{IP} [normalization between I and P-step] (Fig. 3C,D) (Yusuf *et al.* 2010). The kinetic difference ΔV_{IP} was calculated as $\Delta V_{IP} = V_{IP(treatment)} - V_{IP(control)}$ and showed on linear scale between 30 and 180 ms (Fig. 3E,F). To *C. warneri*, the normalized curves $V_{OI \geq 1}$ decreased with water deficit, reaching the minimum value at WD-90 (Fig. 3A). Conversely, no change in $V_{OI \geq 1}$ was recorded in *M. spectabilis* during the study (Fig. 3B). We observe that the data normalized as V_{IP} and ΔV_{IP} declined in both species in relation to WD-0. At WD-90, the V_{IP} and ΔV_{IP} values were similar between species (Fig. 3C,D). In *C. warneri* and *M. spectabilis*, V_{IP} e ΔV_{IP} values declined as from WD-15 and WD-30, respectively, with minimal values (approximately -0.20 and -0.17, respectively) obtained on the day of maximum stress.

Discussion

In this study, we compared the photochemical responses of leaves of two orchid species (CAM and C_3) to water deficit in order to identify the action site of water stress in electron transport chain on acceptor side of PSII. It is known that the water stress result in damages on the photosynthetic apparatus and reduction of the stomatal aperture, light absorption and the biochemical reaction of CO_2 fixation, as reported previously by De Ronde *et al.* (2004), Gill and Tuteja (2010), Strasser *et al.* (2010), Redillas *et al.* (2011) and Waseem *et al.* (2011). In this study, the chlorophyll *a* fluorescence technique was used as an efficient tool to identify the differences among species.

During the experiment, the plants submitted to water deficit (WD) showed common characteristics of this type of stress, such as wilting of leaves, which occurred around 60 days after water deprivation, reaching the maximum around the 90 days in both orchid species, *Cattleya warneri* and *Miltonia spectabilis*. Also, leaf abscission, considered an effective mechanism to prevent drought damage during periods of low water availability (Mahouachi *et al.* 2006, Xu *et al.* 2012) occurred in *M. spectabilis* as from 60 days of drought. Before of abscission, the senescence occur. The senescence is a deleterious, but an important evolutionary process in the plant life cycle which contributes to the fitness of plants ensuring the survival in an given niche (Buchanan-Wollaston *et al.* 2003, Lim *et al.* 2005). So, both senescence and abscission in *M. spectabilis* can be considered an important process to maintain this species under WD, contributing for mobilization of water and reserves compounds from wilted and old leaves to young leaves after catabolic conversion process of

cellular materials accumulated during the growth phase of leaf in exportable compounds as nutrients to maintenance of young leaves (Lim *et al.* 2007).

The increases observed at J-step in *C. warneri* and *M. spectabilis* and at I-step in *C. warneri* with consequent appearance of a positive band on the O-J and J-I phases, is an indicative of limited electron flux resulting of the accumulation of FSII acceptors (Q_A , Q_B) and of PQ pool in reduced forms (Hill *et al.* 2004, Tóth *et al.* 2007) (Fig. 1). Increases in J-step were also the major typical characteristic of Chl fluorescence transient OJIP in *Augea capensis* Thunb. and *Zygophyllum prismatocarpum* E. Meyer ex Sond, growing under the arid Namib desert (Heerden *et al.* 2007) and in six species of plants treated with a potential bioherbicide tenuazonic acid (Chen *et al.* 2015). This increase of J-step is attributed to the peak concentration of $Q_A^-Q_B$ and $Q_A^-Q_B^-$ originated from electron transport chain, where electrons are transferred from Q_A to Q_B (Hill *et al.* 2004) and to appear be a common response of several species to environmental stress. As proposed by Redillas *et al.* (2011), this occur because PSI is less tolerant to drought compared to PSII, and as consequence the efficiency of electrons transport toward the PSI is lowered and causes the accumulation of reduced forms ($Q_A^-Q_B^-$). In the present study, we can suggest that the WD as from 30 days causes an accumulation of reduced forms of the intermediates of electron transport chain, limiting the photochemical flow between PSII and PSI in both species (Schansker *et al.* 2005, Tóth *et al.* 2007, Xin *et al.* 2013).

However, this limitation was more clearly observed in the CAM species, *C. warneri*, in despite of the leaf succulence characteristic from this orchid species. This result is surprising, since, as noted by Heerden *et al.* (2007) and Campos *et al.* (2014) on desert plants, is expected a higher tolerance of CAM plants compared to C_3 when exposed to water stress conditions. The papers of those authors report that plants with both metabolisms C_3 and CAM are susceptible to the effects of water deficit, but the interference of water deficit on the photochemical activity was revealed previously and more evidently in C_3 plants compared to CAM. Moreover, the similar values of ΔV_t between WD-30 and WD-45 in *M. spectabilis* and similar values observed between WD-90 for this species and WD-30 to *C. warneri* reveal that the C_3 species show higher capacity to photochemically reduce Q_A and maintain the kinetic properties required for the reduction/oxidation of the plastoquinone under drought stress conditions. This fact may be related with the higher ability to preserve the relative water content (RWC) of the leaves elevated for a longer period in *M. spectabilis*.

Also, the analyses of the chlorophyll *a* fluorescence transient permitted us to identify the appearance of L and K-bands. According to Oukarroum *et al.* (2009), under drought stress, the appearance of both L and K-bands should be a very good indicator of the physiological disturbances before the manifestation of visual damage. The L-band (150 μ s) is an indicator of energetic connectivity or group between the subunits of PSII and relates to maintenance of structure/stacking of thylakoids in chloroplasts (Strasser and Stirbet 1998, Oukarroum *et al.* 2007, Tsimilli-Michael and Strasser 2008). The L-band can assume a positive or negative values, being more positive when lower is the energetic connectivity and grouping of subunits (Yusuf *et al.* 2010). The results presented in Figure 2A,B show decreases in the energetic connectivity (positives L-bands) due the effect of water deficit as from 30 days (WD-30) in both *C. warneri* and *M. spectabilis* plants. This disturbance occurred gradually and was most definite on CAM species, reaching values of approximately 12% higher after 90 days of water deficit. On the other hand, in *M. spectabilis*, it was observed higher stability of energetic connectivity with water deficit, once the L-band values at 30 and 60 days were similar and only 5% higher compared to control conditions (WD-0). Only at 90 days (WD-90), the L-band arise $\approx 8\%$ in relation to control. These results show us that the effect of water deficit on the stability and energetic connectivity in C_3 species is really more effective only after 60 days.

The presence of K-band, which occurs around 300 μ s, indicates the inactivation of the oxygen evolution complex (OEC) and/or increased antenna size of PSII (Strasser *et al.* 2004, Yusuf *et al.* 2010). The pronounced K-band can be explained by energetic disequilibrium between the donor and acceptor sides of electron on PSII, where the electron flow from OEC to P_{680} on donor side of PSII is slower than electrons flow from PSII to Q_A on the acceptor side (Strasser 1997, Lazar 2006, Jiang *et al.* 2008, Yusuf *et al.* 2010). The K-band is too a good indicator of stomatal closure, leading to significant reductions in CO_2 assimilation rates in plants growing in ecosystems with high temperature and water stress (Srivastava 1997) and hypoxia by flooding (Santos Junior *et al.* 2015). In this study, the increases observed in K-band in both species can be related directly to the inactivation of OEC, considering that the water stress caused the appearance of positive bands as from WD-30 (Fig 2C,D). Regarding the K-band values, we should affirm that the effects of water stress were more pronounced in *C. warneri*, to which the gradual increase of the K-band values was recorded along of WD period, reaching values $\approx 18\%$ higher than those observed at WD-0 (Fig 2C). Also, at WD-15, it was observed the appearance of a negative K-band in *M. spectabilis*, a C_3 species (Fig. 2D).

This negative K-band value, associated to its lower amplitude at WD-90 (values about $\approx 9\%$) indicates low decreases in activity of the OEC and/or increases in size of PSII antenna in response to water deficit.

Heerden *et al.* (2007), Gomes *et al.* (2012) and Holland *et al.* (2015) showed that water stress also reduces the energetic connectivity and cause the inactivation of OEC in plants of *Agave salmiana*, *Passiflora edulis*, and *Quercus pubescens*, respectively. The higher stability and energetic connectivity between subunits of PSII, better functioning state of OEC as well as lower photochemical flow of electrons between PSII and PSI in *M. spectabilis* should be explained through the higher RWC values found in this species, suggesting that the C_3 orchid is more tolerant to drought stress compared to CAM species, *C. warneri*. Another possible explanation for this may be the role of photorespiration, which occurs in the C_3 species and is characterized by the decrease of photosynthesis with increasing oxygenation rates of Rubisco simultaneously with decreasing carboxylation rates in plants submitted to environmental stress. This mechanism stimulates photon utilization under CO_2 limited conditions, contributes to the dissipation of ATP and reducing power, and hence the reduction and/or prevention of oxidative damage to the photosynthetic apparatus (Osmond *et al.* 1994, Sperling *et al.* 2014, Zhang *et al.* 2016).

The normalized variable fluorescence curve between the steps I and P permits the deduction of the behavior electrons transfer from intersystem (PQ) to achieve the final acceptors of PSI. As described by Michaelis-Menten equation, $V_{IP} = 0.5$ (highlighted with dashed lines in Fig. 3C,D) is the half-time, being the inverse of the time to reach $V_{IP} = 0.5$ defined as an estimate of the global rate for reduction of the end electrons acceptors of PSI (Yusuf *et al.* 2010). In this study, it was observed decreased capacity to reduce the PSI electron acceptors (Fig. 3C,D) which can be directly responsible by the accumulation of reduced Q_A^- in both species, as previously observed through the analyze of J-step.

These differences on global rate for reduction of the end electrons acceptors of PSI between days of water deficit can be observed more accurately through kinetic differences ΔV_{IP} (Fig. 3E,F), which indicate increase or decrease of global rate to reduction the electron acceptors *pool* with curves positive or negative, respectively (Yusuf *et al.* 2010, Redillas *et al.* 2011). The Fig. 3E,F shows a similar behavior between the two species, with progressive decrease of global rate to reduction the electron acceptors *pool* until the WD-90. Reductions in ΔV_{IP} too were described by Jiang *et al.* (2008) in *Citrus grandis* plants under Al stress and by Yusuf *et al.* (2010) in transgenic *Brassica juncea* plants submitted to salt, heavy metal and

osmotic stress. In other hand, increases of I-P phase and the *pool* of the final electron acceptor of PSI were observed by Heerden *et al.* (2007) in two desert shrubs, by Oukarroum *et al.* (2009) and Gomes *et al.* (2012) in barley varieties and *Passiflora edulis* submitted to water stress respectively.

As noted by Yusuf *et al.* (2010) and Redillas *et al.* (2011), the regulation of global rate to reduction the electron acceptors *pool* (Fig 3C,D,E,F) occurred independently of the size of the electron acceptors *pool* (Fig. 3A,B). While the *pool* size of electron acceptors was reduced in *C. warneri* (Fig. 3A), little change occurred in *M. spectabilis* (Fig. 3B). At the same time, however, the two species decreased the global rate to reduction the electrons acceptor of PSI (Fig. 3C,D,E,F).

It was observed that the C₃ species, *M. spectabilis*, was more tolerant to water deficit than CAM species, *C. warneri*, as evidenced mainly through of activities related to PSII and to intersystem ΔV_T curves, K and L-bands (Figs. 1,2). Although the *pool* size of electron acceptors differed between species, the similarity of decrease of the global rate to reduction the electrons acceptor of PSI (Fig. 3) shows that distinct behavior between the species can be restrict specifically to behavior of PSII. The result found in this study can be attributed to the photoprotective role of photorespiration under photosynthetic apparatus, but especially should be due to the higher ability of C₃ species in maintaining higher relative water content (RWC) during the experiment ($p < 0.05$). More water in photosynthetic tissues allow the greater photochemical activity. The lower water loss by C₃ species might be due to increased efficiency in mobilization of water from both pseudobulbs and senescent leaves to younger leaves, since RWC decrease is larger in pseudobulbs than in leaves of *M. spectabilis* compared to *C. warneri* and old leaves are lost by senescence, enabling water mobilization to young leaves.

References

- Barrs H.D., Weatherley P.E.: A Re-Examination of the Relative Turgidity Technique for Estimating Water Deficits in Leaves. – Aust. J. Biol. Sci. **15**: 413-28, 1962.
- Benzing D.H.: Vascular epiphytes: general biology and related biota. Cambridge: Cambridge University Press, 1990.
- Buchanan-Wollaston V., Earl S., Harrison E. *et al.*: The molecular analysis of leaf senescence: a genomics approach. – Plant Biotechnol. J. **1**: 3-22, 2003.

- Campos H., Trejo C., Peña-Valdivia C.B. *et al.*: Photosynthetic acclimation to drought stress in *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck seedlings is largely dependent on thermal dissipation and enhanced electron flux to photosystem I. – *Photosynth. Res.* **122**: 23-39, 2014.
- Chaitanya K.V., Jutur P.P., Sundar D. *et al.*: Water stress effects on photosynthesis in different mulberry cultivars. – *Plant Growth Regul.* **40**: 75-80, 2003.
- Chen S., Kang Y., Zhang M. *et al.*: Differential sensitivity to the potential bioherbicide tenuazonic acid probed by the JIP-test based on fast chlorophyll fluorescence kinetics. – *Environ. Exp. Bot.* **112**: 1-15, 2015.
- Cushman J.C.: Crassulacean Acid Metabolism. A Plastic Photosynthetic Adaptation to Arid Environments. – *Society.* **127**: 1439-48, 2001.
- De Ronde J.A., Cress W.A., Kruger G.H.J., *et al.*: Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an *Arabidopsis* P5CR gene, during heat and drought stress. – *J. Plant Physiol.* **161**: 1211-1224, 2004.
- Gill S.S., Tuteja N.: Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. – *Plant Physiol. Bioch.* **48**: 909-930, 2010.
- Goh C.J., Kluge M.: Gas exchange and water relations in epiphytic orchids, in: Lüttge U. (Ed.), *Vascular Plants as Epiphytes, Evolution and Ecophysiology*. Pp. 139-166. Springer-Verlag, Heidelberg, 1989.
- Gomes M.T.G., Luz A.C., Rossi M.S. *et al.*: Drought tolerance of passion fruit plants assessed by the OJIP chlorophyll *a* fluorescence transient. – *Sci. Hort.* **142**: 49-56, 2012.
- Gravendeel B., Smithson A., Slik F.J.W. *et al.*: Epiphytism and pollinator specialization: drivers for orchid diversity? – *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **359**: 1523-35, 2004.
- Han S.K., Wagner D.: Role of chromatin in water stress responses in plants. – *J. Exp. Bot.* **65**: 2785-99, 2014.
- He J., Norhafis H., Qin L.: Responses of Green Leaves and Green Pseudobulbs of CAM Orchid *Cattleya laeliocattleya* Aloha Case to Drought Stress. – *J. Bot.* **2013**: 1-9, 2013.
- He J., Tan B.H.G., Qin L.: Source-to-sink relationship between green leaves and green pseudobulbs of C₃ orchid in regulation of photosynthesis. – *Photosynthetica.* **49**: 209-218, 2011.

- Heerden P.D.R., Swanepoel J.W., Krüger G.H.J. Modulation of photosynthesis by drought in two desert scrub species exhibiting C₃-mode CO₂ assimilation. – *Environ. Exp. Bot.* **61**: 124-136, 2007.
- Herrera A.: Crassulacean acid metabolism and fitness under water deficit stress: if not for carbon gain, what is facultative CAM good for? – *Ann. Bot.* **103**: 645-653, 2009.
- Hew C.S., Yong J.W.H.: *The Physiology of Tropical Orchids in Relation to the Industry.* – World Scientific Publishing. Singapore, 2nd edition, 2004.
- Hill R., Larkum A.W.D., Frankart C. *et al.*: Loss of functional Photosystem II reaction centres in zooxanthellae of corals exposed to bleaching conditions: using fluorescence rise kinetics. – *Photosynth. Res.* **82**: 59-72, 2004.
- Holland V., Koller S., Lukas S. *et al.*: Drought- and frost-induced accumulation of soluble carbohydrates during accelerated senescence in *Quercus pubescens*. – *Trees.* **30**: 215-226, 2015.
- IPCC: Summary for Policymakers. 2013. – In: Stocker, T.F., Qin, D., Plattner, G.K., Tignor M.M.B., Allen S.K., Boschung J., Nauels A., Xia Y., Bex V., Midgley P.M. ed.): *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Cambridge University Press, Cambridge and New York.
- Jiang H.X., Chen L.S., Zheng J.G., *et al.*: Aluminum-induced effects on Photosystem II photochemistry in *Citrus* leaves assessed by the chlorophyll *a* fluorescence transient. – *Tree Physiol.* **28**: 1863-1871, 2008.
- Krause G.H., Weis E.: Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics. – *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**: 313-49, 1991.
- Lazar D.: The polyphasic chlorophyll *a* fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. – *Funct. Plant Biol.* **33**: 9-30, 2006.
- Lim P.O., Kim H.J., Nam H.G.: Leaf Senescence. – *Annu. Rev. Plant Biol.* **58**: 115-136, 2007.
- Lim P.O., Nam H.G.: The molecular and genetic control of leaf senescence and longevity in *Arabidopsis*. – *Curr. Top. Dev. Biol.* **67**: 49-83, 2005.
- Lüttge U.: Ecophysiology of Crassulacean Acid Metabolism (CAM). – *Ann. Bot.* **93**: 629-52, 2004.

- Mahouachi J., Socorro A.R., Talon M.: Responses of papaya seedling (*Carica papaya* L.) to water stress and re-hydration: growth, photosynthesis and mineral nutrient imbalance. – *Plant Soil*. **281**: 137-146, 2006.
- McDowell N., Pockman W.T., Allen C.D., *et al.*: Mechanisms of plant survival and mortality during drought: Why do some plants survive while others succumb to drought? – *New Phytol.* **178**: 719-39, 2008.
- Mehta P., Jajoo A., Mathur S. *et al.*: Chlorophyll a fluorescence study revealing effects of high salt stress on Photosystem II in wheat leaves. – *Plant Physiol. Bioch.* **48**: 16-20, 2010.
- Minardi B.D., Paula A., Voyten L. *et al.*: The Epiphytic Fern *Elaphoglossum luridum* (Fée) Christ. (Dryopteridaceae) from Central and South America: Morphological and Physiological Responses to Water Stress. – *Scientific World J.* **2014**: 1-9, 2014.
- Osmond C.B., Björkman Ö.: What is photoinhibition? Some insights from comparison of shade and sun plants. – In: Baker NR, Boyer JR. (ed.): *Photoinhibition: Molecular Mechanisms to the Field*. Pp 1-24. Bios Scientific Publications, Oxford 1994.
- Oukarroum A., Madidi S.E., Schansker G. *et al.*: Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll a fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering. – *Environ. Exp. Bot.* **60**: 438-46, 2007.
- Oukarroum A., Schansker G., Strasser R.J.: Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotolerance analyzed using Chl *a* fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance. – *Physiol. Plantarum* **137**: 188-199, 2009.
- Rodrigues M.C., Matiz A., Cruz A.B. *et al.*: Spatial patterns of photosynthesis in thin- and thick-leaved epiphytic orchids: unravelling C₃–CAM plasticity in an organ-compartmented way. – *Ann. Bot.* **112**: 17-29, 2013.
- Redillas M.C.F.R., Strasser R.J., Jeong J.S. *et al.*: The use of JIP test to evaluate drought-tolerance of transgenic rice overexpressing OsNAC10. – *Plant Biotechnol. Rep.* **5**: 169-175, 2011.
- Santos Junior U.M., Gonçalves J.F.C., Strasser R.J. *et al.*: Flooding of tropical forests in central Amazonia: what do the effects on the photosynthetic apparatus of trees tell us about species suitability for reforestation in extreme environments created by hydroelectric dams? – *Acta Physiol. Plant.* **37**: 1-17, 2015.
- Santos M.G., Ribeiro R.V., Oliveira R.F. *et al.*: The role of inorganic phosphate on photosynthesis recovery of common bean after a mild water deficit. – *Plant Sci.* **170**: 659-64, 2006.

- Schansker G., Tóth S.Z., Strasser R.J.: Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl *a* fluorescence rise OJIP. – Bioch. Bioph. Acta. **1706**: 250-261, 2005.
- Silvera K., Neubig K.M., Whitten W.M. *et al.*: Evolution along the crassulacean acid metabolism continuum. – Funct. Plant Biol. **37**: 995-1010, 2010a.
- Silvera K., Santiago L.S., Cushman J.C. *et al.*: The incidence of crassulacean acid metabolism in Orchidaceae derived from carbon isotope ratios: A checklist of the flora of Panama and Costa Rica. – Bot. J. Linn. Soc. **163**: 194-222, 2010b.
- Sinclair R.: Water Relations of Tropical Epiphytes. – J. Exp. Bot. **34**: 1652-1663, 1983.
- Sperling O., Lazarovitch N., Schwartz A., *et al.*: Effects of high salinity irrigation on growth, gas-exchange, and photoprotection in date palms (*Phoenix dactylifera* L., cv. Medjool). – Environ. Exp. Bot. **99**: 100-109, 2014.
- Srivastava A., Guissé B., Greppin H. *et al.*: Regulation of antenna structure and electron transport in photosystem II of *Pisum sativum* under elevated temperature probe by fast polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient: OKJIP. – Bioch. Bioph. Acta. **1320**: 95-106, 1997.
- Stancato G.C., Mazzafera P., Buckeridge M.S.: Effect of a drought period on the mobilisation of non-structural carbohydrates, photosynthetic efficiency and water status in an epiphytic orchid. – Plant Physiol. Bioch. **39**: 1009-1016, 2001.
- Stirbet A., Govindjee.: On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll *a* fluorescence induction) and Photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient. – J. Photoch. Photobio. B. **104**: 236-257, 2011.
- Strasser B.J.: Donor side capacity of Photosystem II probed by chlorophyll *a* fluorescence transients. – Photosynth. Res. **52**: 147-155, 1997.
- Strasser R.J., Michael M.T., Srivastava A.: Analysis of the Chlorophyll *a* Fluorescence Transient. In: G.; Govindje. Papageorgiou (Ed.); Advances in Photosynthesis and Respiration Chlorophyll Fluorescence a Signature of Photosynthesis. Pp.321-362. Kluwer Academic Publishers 2004.
- Strasser R.J., Stirbet A.D.: Heterogeneity of photosystem II probed by the numerically simulated chlorophyll *a* fluorescence rise (O–J–I–P). – Math. Comput. Simulat. **48**: 3-9, 1998.

- Strasser B.J., Strasser R.J.: Measuring fast fluorescence transient to address environmental questions: The JIP-test. – In: P. Mathis (Ed.); *Photosynthesis: from Light to Biosphere*. Pp.977-980. Springer Netherlands 1995.
- Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Qiang S. *et al.*: Simultaneous in vivo recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. – *Bioch. Bioph. Acta*. **1797**: 1313-1326, 2010.
- Tóth S.Z., Schanker G., Strasser R.J.: A non-invasive assay of the plastoquinone pool redox state based on the OJIP – transient. – *Photosynth. Res.* **93**: 193-203, 2007.
- Tsimilli-Michael M., Strasser R.J.: In vivo Assessment of Stress Impact on Plant's Vitality: Applications in Detecting and Evaluating the Beneficial Role of Mycorrhization on Host Plants. – In: A. Varma (Ed.); *Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics*. Pp. 679-703. Dordrecht: Springer 2008.
- Waseem M., Ali A., Tahir M. *et al.*: Mechanisms of drought tolerance in plant and its management through different methods. – *Cont. J. Agric. Sci.* **5**: 10-25, 2011.
- Xin C.P., Yang J., Zhu X.G.: A model of chlorophyll a fluorescence induction kinetics with explicit description of structural constraints of individual photosystem II units. – *Photosynth. Res.* **117**: 339-354, 2013.
- Xu D.H., Fang X.W., Su P.X. *et al.*: Ecophysiological responses of *Caragana korshinskii* Kom. under extreme drought stress: Leaf abscission and stem survives. – *Photosynthetica*. **50**: 541-548, 2012.
- Yusuf M.A., Kumar D., Rajwanshi R., *et al.*: Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. – *Bioch. Bioph. Acta*. **1797**: 1428-1438, 2010.
- Zhang C., Zhan D.X., Luo H.H., *et al.*: Photorespiration and photoinhibition in the bracts of cotton under water stress. – *Photosynthetica*. **54**: 12-18, 2016.
- Zotz G., Hietz P.: The physiological ecology of vascular epiphytes: current knowledge, open questions. – *J. Exp. Bot.* **52**: 2067-2078, 2001.

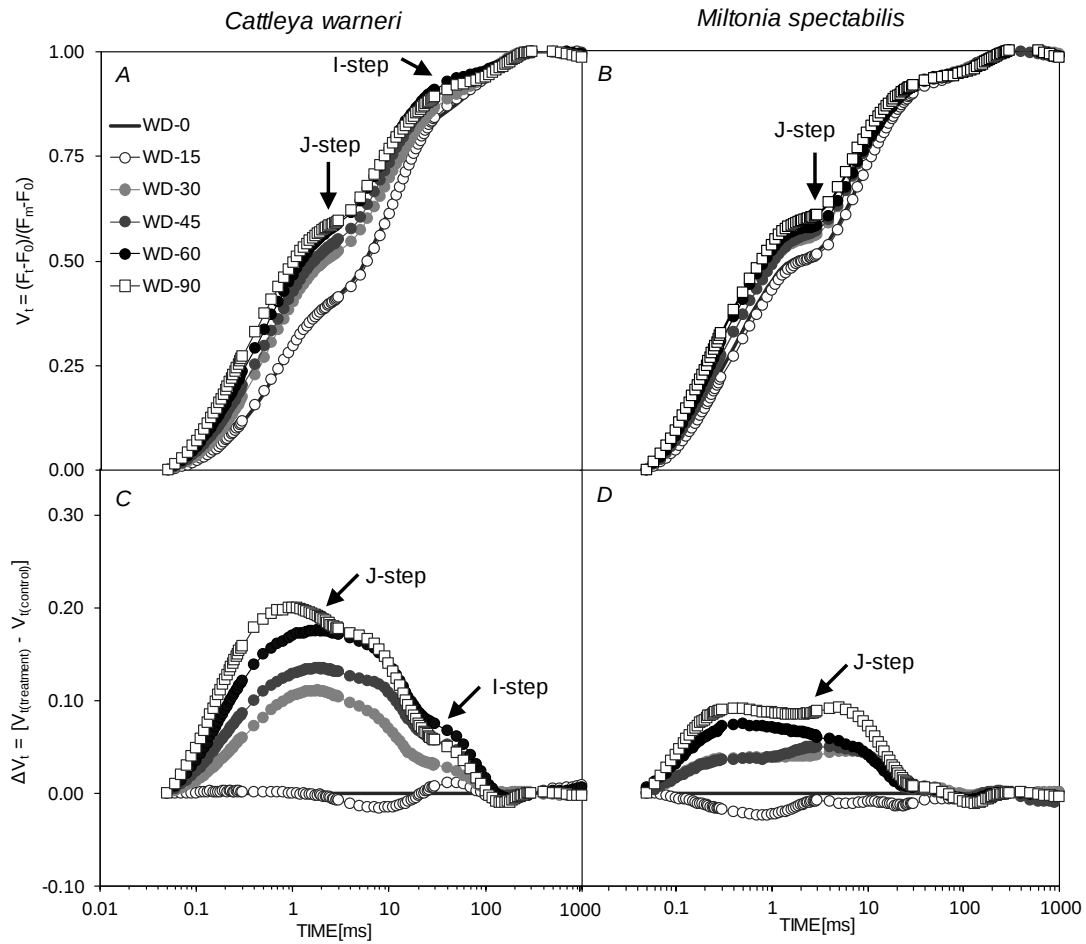


Fig. 1. Kinetic of chlorophyll *a* fluorescence normalized between the steps O-P in *Cattleya warneri* and *Miltonia spectabilis* submitted to water deficit (WD) until 90 days. Before the measurements, leaves were dark-adapted for 1 h. Relative variable fluorescence $V_T = (F_T - F_0) / (F_P - F_0)$ (A and B); and kinetic difference of V_t : $\Delta V_t = [V_{t(\text{treatment})} - V_{t(\text{control})}]$ (C and D). The values are means, $n=5$.

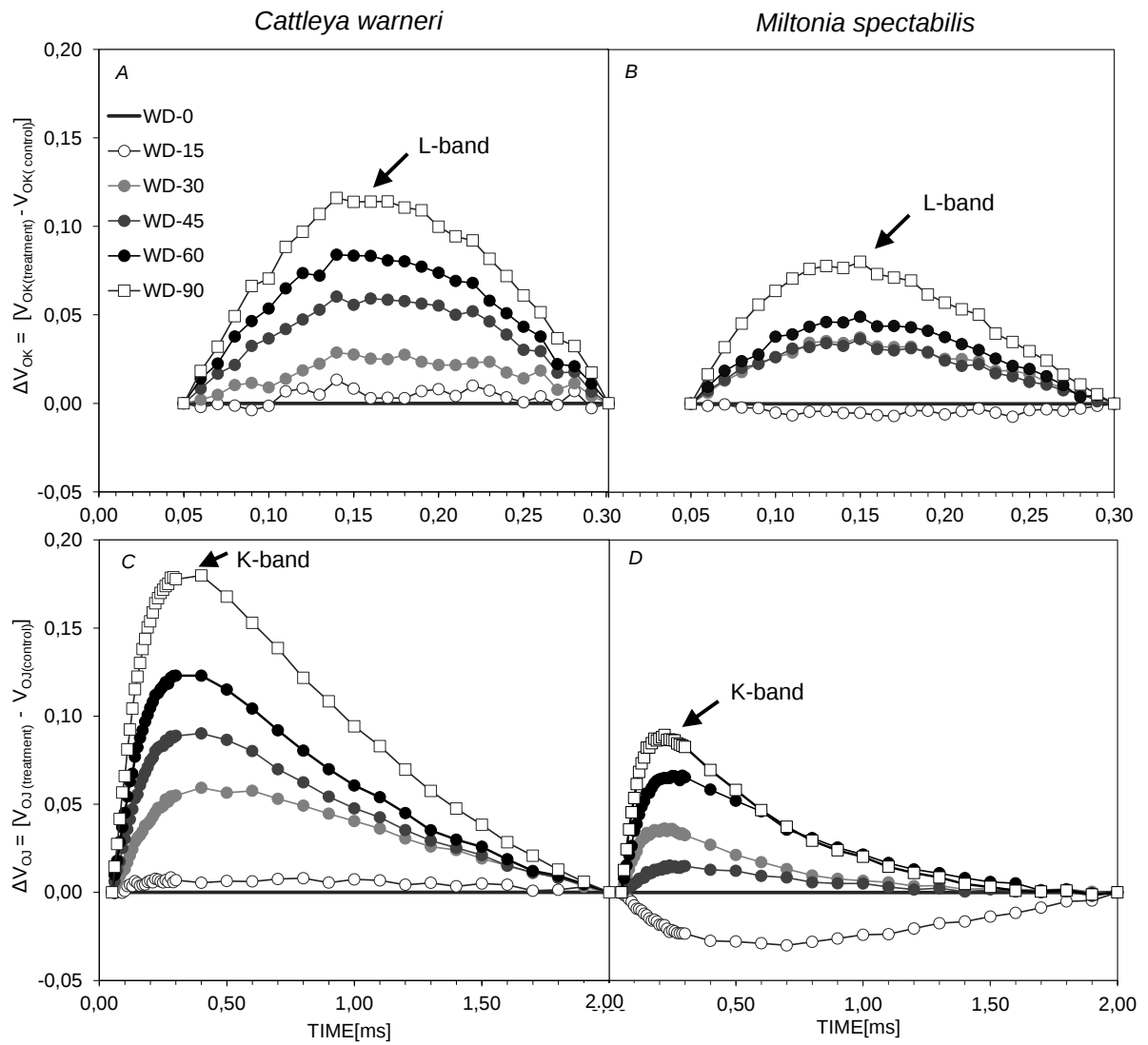


Fig. 2. Kinetic differences of V_{OK} and V_{OJ} obtained after double normalization between the steps O–K [$\Delta V_{OK} = V_{OK(treatment)} - V_{OK(control)}$] (A and B) showing the L band; and between the steps O–J [$\Delta V_{OJ} = V_{OJ(treatment)} - V_{OJ(control)}$] (C and D) showing the K band, respectively, in *Cattleya warneri* and *Miltonia spectabilis* submitted to water deficit (WD) until 90 days. Before the measurements, leaves were dark-adapted for 1 h. The values are means, $n=5$.

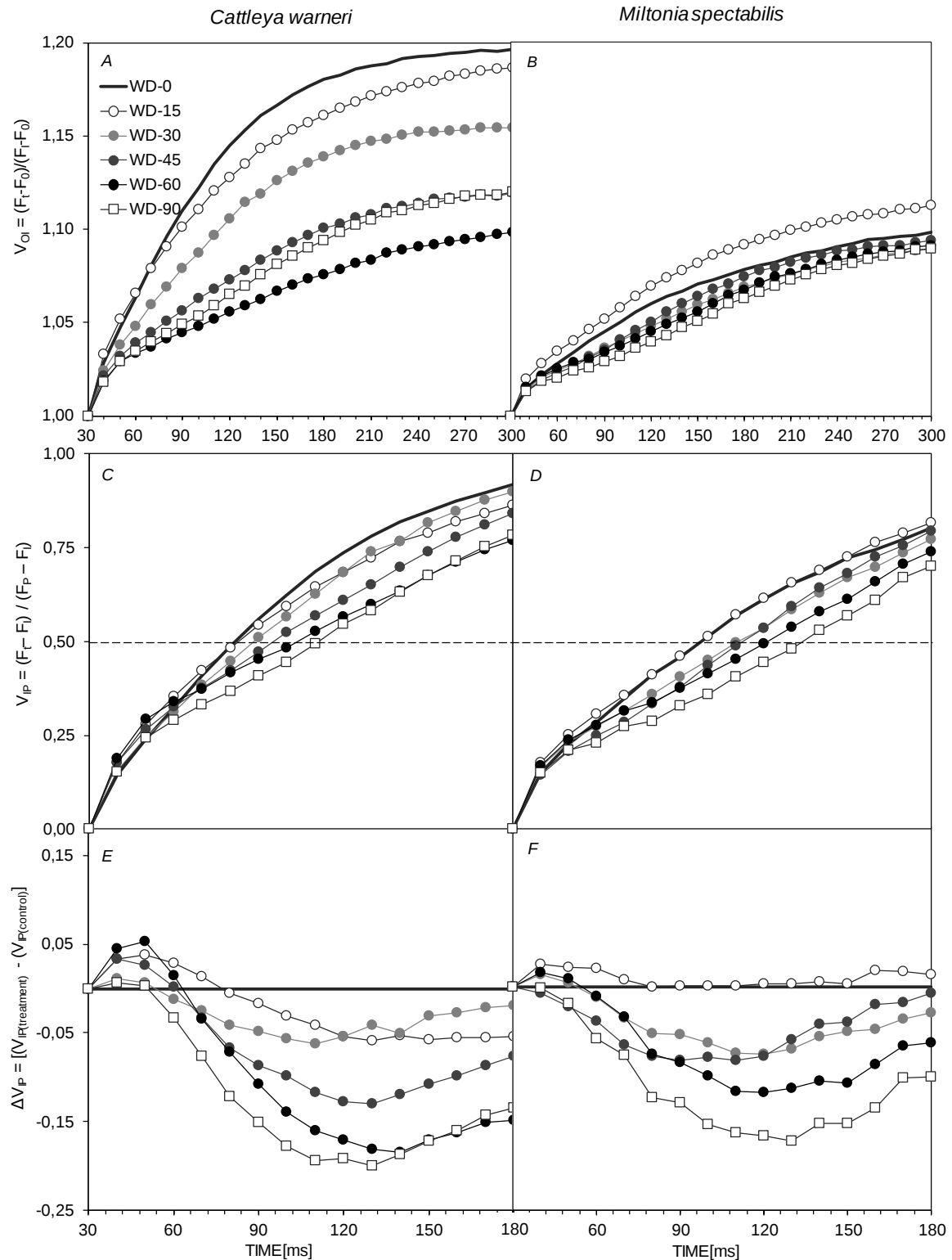


Fig. 3. Kinetic of chlorophyll a fluorescence normalized between steps O-I and I-P *Cattleya warneri* and *Miltonia spectabilis* submitted to water deficit (WD) until 90 days. Before the measurements, leaves were dark-adapted for 1 h. Relative variable fluorescence between the steps O-I [$V_{OI} = (F_T - F_0) / (F_T - F_0)$] in the interval time between 30 and 300ms (A and B); Relative variable fluorescence between the steps I-P [$V_{IP} = (F_T - F_I) / (F_P - F_I)$] (C and D); and kinetic differences of V_{IP} : [$\Delta V_{IP} = V_{IP(treatment)} - V_{IP(control)}$] (E and F). The values are means, $n=5$.

CAPÍTULO III

Efeitos do déficit hídrico sobre o status hídrico, pigmentos fotossintéticos e fluorescência da clorofila *a* em folhas e pseudobulbos de orquídeas CAM e C₃

Resumo

Alterações sobre o status hídrico, concentração de pigmentos fotossintéticos e fluorescência da clorofila *a* foram investigados em folhas e pseudobulbos de orquídeas CAM (*Cattleya warneri* T. Moore) e C₃ (*Miltonia spectabilis* Lindl.) submetidas ao déficit hídrico (DH). O experimento foi conduzido em um orquidário na UFES – Campus de São Mateus/ES, onde plantas foram submetidas ao DH por 90 dias. Plantas irrigadas diariamente foram consideradas controle. As avaliações ocorreram aos 0, 30, 60, e 90 dias de DH. Nessa condição, o conteúdo relativo de água (CRA) foi reduzido nas folhas e pseudobulbos de ambas as espécies, sendo de maneira similar nos órgãos da espécie CAM, e mais lentamente nas folhas em relação aos pseudobulbos na espécie C₃. A concentração de pigmentos fotossintéticos também foi alterada sob déficit hídrico, com declínios observados nas clorofilas *a*, *b* e total e incrementos dos carotenoides nas folhas de ambas as espécies, com acréscimos de todos esses pigmentos nos pseudobulbos de *C. warneri* e nenhuma alteração em *M. spectabilis*. Alterações sobre parâmetros da fluorescência transiente da clorofila *a* também foram observados nas duas espécies, porém, mais expressivamente nos pseudobulbos de *M. spectabilis*. Estes resultados demonstram que, ambas as espécies foram vulneráveis ao DH prolongado, com declínios no CRA, fotodestruição dos pigmentos fotossintéticos e declínios nas atividades fotoquímicas, especialmente após o DH-30. Porém, a manutenção do CRA, a menor perda da performance das reações fotoquímicas associada ao maior comprometimento dos pseudobulbos, além da ocorrência de atividade fotorrespiratória indicam mais elevada capacidade de tolerância da espécie C₃ (*M. spectabilis*) ao DH. As folhas senescentes e especialmente os pseudobulbos, característicos de *M. spectabilis*, podem facilitar a mobilização de água para as folhas jovens, permitindo a manutenção de valores mais elevados de ambos CRA e atividade fotoquímica.

Palavras chave: Atividade fotoquímica, *Cattleya warneri*, conteúdo relativo de água, *Miltonia spectabilis*, teste-JIP, tolerância ao DH.

Abstract

Changes on water status, photosynthetic pigments and chlorophyll *a* fluorescence were investigated in leaves and pseudobulbs of CAM (*Cattleya warneri* T. Moore) and C₃ (*Miltonia spectabilis* Lindl.) orchids under water deficit (WD). The experiment was carried out in a nursery in UFES - Campus de São Mateus/ES, where plants were submitted to WD during 90 days. Daily irrigated plants were considered as control. The evaluations were performed at 0, 30, 60, and 90 days of WD. Under WD, the relative water content (RWC) was reduced in leaves and pseudobulbs of both species, but occurred similarly among the organs of the CAM species and more slowly on the leaves of C₃ species, comparatively to pseudobulbs. The concentration of photosynthetic pigments also changed under water deficit. Declines in chlorophyll *a*, *b* and total were observed as carotenoids increase in leaves of both species. Increases in all these pigments in pseudobulbs of *C. warneri* and no change in *M. spectabilis* were detected. Alterations of chlorophyll *a* fluorescence transient parameters were observed in both species, but more significantly in the pseudobulbs of *M. spectabilis*. These results demonstrate that both species were vulnerable to prolonged WD with declines of RWC, photodestruction of photosynthetic pigments and declines of photochemical activity, especially after WD-30. However, the maintenance of RWC, lower loss of photochemical reactions performance associated with the greater impairment of the pseudobulbs, in addition to the occurrence of photorespiratory activity indicates higher tolerance of C₃ species (*M. spectabilis*) to WD. The senescent leaves and especially pseudobulbs, characteristics of *M. spectabilis* plants, could facilitate the water mobilization toward young leaves, allowing maintenance of both higher RWC and higher photochemical activity.

Keywords: *Cattleya warneri*, JIP-test, *Miltonia spectabilis*, photochemical activities, relative water content, WD tolerance.

1. Introdução

As orquídeas compreendem a um dos maiores e mais diversos grupos de plantas, sendo a maioria dos seus representantes de hábito epifítico (Rodrigues et al., 2013). Considerado um dos mais severos hábitos nas florestas tropicais, o epifitismo geralmente oferece condições xerofíticas às plantas, como altas radiações, exposição aos ventos e baixas disponibilidades de água e nutrientes (He et al., 2013; Rodrigues et al., 2013; Minardi et al., 2014). Dentre os problemas enfrentados pelas plantas epífitas na natureza, o déficit hídrico (DH) é provavelmente o mais limitante a sua sobrevivência, uma vez que, a turgidez celular, abertura estomática e as taxas de transpiração e assimilação de CO₂ são fortemente influenciadas por essa condição (Chaitanya et al., 2003; Waseem et al., 2011; He et al., 2013). Em virtude das mudanças climáticas globais, espera-se que muitos ambientes naturais, incluindo as florestas tropicais úmidas e suas respectivas espécies, enfrentem diretamente os efeitos das variações nos regimes das chuvas, o que inclui períodos mais prolongados de DH em determinadas áreas (McDowell et al., 2008; IPCC, 2013; Han e Wagner, 2014; Campos et al., 2014).

Uma importante característica que possibilita a algumas plantas tolerarem eficientemente o DH é o Metabolismo ácido crassuláceo (CAM) (Cushman, 2001; Silvera et al., 2010a). Muitas orquídeas epífitas apresentam como estratégia ao hábito epifítico, o metabolismo CAM e o alto grau de suculência dos tecidos, o que permite diferencia-las consideravelmente das plantas com metabolismo C₃ (Benzing, 1990; Zotz and Hietz, 2001; Lüttge, 2004; Silvera et al., 2010b). Além disso, a presença do pseudobulbo, órgão especializado na reserva de água e nutrientes, é outra característica marcante em muitas orquídeas. Pela ausência de estômatos, presença de cutícula espessa e abundância de células que atuam como reserva de água, esse órgão é de fundamental importância na manutenção do status hídrico das folhas e consequente sobrevivência das plantas, principalmente durante períodos de DH (Hew e Yong, 1997; Stancato et al., 2001; He et al., 2011; He et al., 2013).

A despeito da importância dos pseudobulbos como órgãos de reserva, muitas espécies de orquídeas epífitas são sensíveis a prolongados períodos de DH (Sinclair, 1983; He et al., 2013). Assim, para investigar o status hídrico das folhas e pseudobulbos em plantas submetidas ao DH, o conteúdo relativo de água (CRA) pode ser considerado um índice bastante efetivo, seja com plantas cultivadas ou nativas (Ko e Piccinni, 2009; Wang et al., 2012; Xu et al., 2012; Rodrigues et al., 2013; Minardi et al., 2014). A grande redução no CRA dos tecidos vegetais tem impacto negativo na expansão e crescimento celular, resultando em

limitação no crescimento (Anjum et al., 2011). Trabalhos evidenciam que plantas bem hidratadas apresentam valores de CRA entre 85 e 95%, mas, por outro lado, sob DH severo estes valores podem ser reduzidos abaixo de 40% (Cockerham, 2011).

Quando em condições de DH, a atividade fotossintética das plantas pode ser drasticamente reduzida (He et al., 2013). A atividade do sistema fotossintético pode ser avaliada através da fluorescência da clorofila *a*. Este é um método eficiente, não invasivo e amplamente difundido em estudos que visam à detecção de estresses ambientais, como o DH, sobre o aparato fotossintético (Oukarroum et al., 2007; Mehta et al., 2010; Yusuf et al., 2010; Chen et al., 2015). Permite rápida obtenção de informações sobre os processos fotoquímicos e não-fotoquímicos que ocorrem nas membranas dos tilacóides dos cloroplastos, contribuindo de uma maneira geral para o entendimento da fisiologia e da ecologia da planta (Krause e Weis, 1991; Yusuf et al., 2010).

Baseado nessas informações, este estudo teve como objetivos (1) avaliar o efeito do DH sobre o status hídrico de folhas e pseudobulbos de orquídeas com metabolismo CAM (*Cattleya warneri* T. Moore) e C_3 (*Miltonia spectabilis* Lindl.) e (2) investigar os efeitos do DH sobre o conteúdo de pigmentos fotossintéticos e aparato fotoquímico em folhas e pseudobulbos dessas espécies de orquídeas.

2. Material e Métodos

2.1. Material vegetal e condições de amostragem

O experimento foi conduzido na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) – Campus de São Mateus, estado do Espírito Santo, Brasil (18°40'S 39°51'O). Plantas adultas de orquídeas (*Cattleya warneri* T. Moore. e *Miltonia spectabilis* Lindl.) foram obtidas de orquidário no município de João Neiva-ES e transferidas para um orquidário na UFES – Campus de São Mateus, onde fora realizado o experimento. As plantas foram acondicionadas sob densidade de fluxo de fótons entre 200 e 300 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (sensor quântico portátil - QSPAR, Hansatech, UK), o que representa $\approx 15\%$ da Radiação Fotossinteticamente Ativa (RFA), temperatura média de 30/25 °C (dia/noite) e umidade relativa do ar em torno de 80%. Essas condições são próximas daquelas encontradas em seu local de origem (orquidário em João Neiva) e também de alguns dos habitats naturais destas espécies, abaixo do dossel na Floresta Atlântica.

As plantas foram aclimatadas durante dois meses antes do início do experimento, sendo irrigadas diariamente ou a cada dois dias (dependendo da umidade do substrato). Após este período, as plantas foram divididas em: plantas mantidas com irrigação (usadas como controle) e plantas sob déficit hídrico intermitente (DH). As avaliações iniciaram-se no dia 0 (início do experimento), e seguiram a cada 30 dias até os 90 dias (0, 30, 60 e 90 dias de DH).

2.2. Conteúdo relativo de água dos tecidos

O conteúdo relativo de água (CRA) obtido de folhas e pseudobulbos de *Cattleya warneri* e *Miltonia spectabilis* foi determinado de acordo com Barrs and Weatherley (1962). As plantas foram levadas do orquidário para o Laboratório de Ecofisiologia Vegetal (LEV), Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBT), UFES – Campus de São Mateus. Cinco discos de aproximadamente 6 mm de diâmetro foram coletados no período da manhã (08:00-9:00) em folhas e pseudobulbos de cinco diferentes plantas de cada tratamento. Os discos foram extraídos com um perfurador manual (Genmes) – de forma direta nas folhas e, após serem feitos cortes paradérmicos com gilete (Wilkinson) nos pseudobulbos – e imediatamente pesados para obtenção da massa fresca (MF). Após determinada a MF, os discos foram mantidos por 24 h em placas de Petri contendo água destilada para obtenção da massa túrgida (MT). A massa seca dos tecidos (MS) foi aferida após a secagem dos discos até peso constante (por 48h) em estufa a 70°C. As respectivas massas foram determinadas em balança digital de precisão (0,0001 g), e o CRA foi calculado por meio da fórmula: $CRA = [(MF-MS) / (MT-MS)] \times 100$ e expresso em porcentagem (%).

2.3. Pigmentos fotossintéticos

As mesmas folhas e pseudobulbos utilizados para a obtenção do conteúdo relativo de água (CRA) foram utilizadas para a extração e quantificação dos pigmentos fotossintéticos: clorofilas *a*, *b* e total, pigmentos carotenoides e a razão clorofila *a/b*.

Para a extração dos pigmentos, discos das folhas e pseudobulbos foram removidos com perfurador manual de forma direta nas folhas e, após serem feitos cortes paradérmicos com gilete nos pseudobulbos. De acordo com método proposto por Hiscox e Israelstam (1979), 100mg de discos de folhas e pseudobulbos foram pesados e colocados em tubos de ensaios envolvidos com papel alumínio contendo 7ml de dimetilsufoxido (DMSO). Os tubos foram levados para o banho-maria, onde permaneceram por 24 horas a temperatura de 65°C.

O extrato líquido obtido foi transferido para um tubo graduado e o volume completado para 10ml.

Após a extração, efetuou-se a leitura da absorbância das amostras em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) a 470nm, 645nm e 663nm (Arnon, 1949). Logo após as leituras, os discos de folhas e pseudobulbos foram secos em estufa por 72 horas a temperatura de 65° C, para obtenção da massa seca.

As determinações das concentrações dos pigmentos fotossintéticos foram realizadas de acordo com as equações de Lichtenthaler (1987):

$$\text{Clorofila } a = ((12,7 \times A_{663} - 2,69 \times A_{645}) / (1000 \times MS)) \times V$$

$$\text{Clorofila } b = ((22,9 \times A_{645} - 4,68 \times A_{663}) / (1000 \times MS)) \times V$$

$$\text{Clorofila total} = ((20,2 \times A_{663} - 2,69 \times A_{645}) / (1000 \times MS)) \times V$$

$$\text{Carotenoides} = ((1000 \times A_{470}) - (1,82 \times \text{Clor } a) - (85,02 \times \text{Clor } b)) / (198) \times V$$

Onde: A470 = absorbância em 470 nm; A645 = absorbância em 645 nm; A663 = absorbância em 663 nm; V = volume da amostra (ml); MS = massa seca da amostra (g).

A concentração de clorofila *a*, *b* e totais e dos pigmentos carotenoides foram expressos em mg.g⁻¹ de massa seca (MS).

2.4. Fluorescência da Clorofila *a*

A leitura da fluorescência transiente da clorofila *a* foi realizada em folhas jovens totalmente expandidas e pseudobulbos, utilizando-se um fluorômetro portátil (Handy-PEA, Hansatech, King's Lynn, Northfolk, England), como descrito por Strasser e Strasser (1995). As avaliações foram realizadas pela manhã (entre 08:00-9:00) aos 0, 30, 60 e 90 dias de experimento em folhas e pseudobulbos previamente adaptados ao escuro com uso de cliques foliares durante uma hora, período suficiente para a oxidação completa do sistema fotossintético (Oukarroum et al., 2007; Chen et al., 2015). Para avaliação nos pseudobulbos, houve adaptação no uso dos cliques foliares. Apenas a parte superior dos cliques foi utilizada e fixada na superfície do pseudobulbo. Além disso, os cliques também foram envolvidos em papel alumínio para impedir entrada de luz na área a ser avaliada.

A emissão da fluorescência da clorofila *a* foi induzida por um único e forte pulso de luz (3000μmol (fótons) m⁻²s⁻¹ e registrada entre 10μs e 1 s em uma área de 4mm de diâmetro.

Em 1s de medição foram registrados 120 passos de fluorescência. A fluorescência aos 50µs foi considerada como F_0 (fluorescência inicial) e aos 300ms considerada como F_M (fluorescência máxima).

Normalizações foram feitas sobre os sinais de fluorescência da curva OJIP. A partir da subtração da dupla normalização entre os passos O ($F_0 = 50\mu s$) e P ($F_M = 300\mu s$) obteve-se as curvas da fluorescência variável relativa [$V_T = (F_T - F_0) / (F_M - F_0)$]; Fluorescência variável relativa entre os passos O (50µs) e K (300µs) [$V_{OK} = (F_T - F_0) / (F_K - F_0)$]; entre os passos O (50µs) e J (2ms) [$V_{OJ} = (F_T - F_0) / (F_J - F_0)$]; entre os passos O (50µs) e I (30ms) [$V_{OI} = (F_T - F_0) / (F_I - F_0)$]; e entre os passos I (30ms) e P (300ms) [$V_{IP} = (F_T - F_I) / (F_P - F_I)$]. Obtida a fluorescência variável entre os intervalos específicos da curva, calculou-se a diferença cinética entre controles e tratamentos: $\Delta V = V_{(tratamento)} - V_{(controle)}$, as quais revelam bandas entre as fases O-J, J-I e I-P (Strasser et al., 2004; Oukarroum et al., 2007; Stirbet e Govindjee, 2011).

Para análise do comportamento dos fotossistemas I e II, vários parâmetros bioenergéticos foram derivados a partir do transiente OJIP, de acordo com as equações do teste-JIP, utilizando-se o software Biolyzer (Laboratório de Bioenergética, Universidade de Genebra, Suíça). O teste-JIP foi analisado com base na Teoria de Fluxo de Energia em Biomembranas (Strasser e Strasser, 1995; Strasser et al., 2004). Entre os parâmetros avaliados neste estudo estão: fluorescência inicial ou basal [F_0]; o rendimento quântico fotoquímico máximo para fotoquímica primária, ou eficiência fotoquímica máxima do FSII, [$\phi P_0 = TR_0 / ABS = F_V / F_M$]; os máximos fluxos específicos por centro de reação (RC) em termos de absorção [$ABS/RC = M_0 / VJ / \phi P_0$], captura [$TR_0/RC = M_0 / VJ$], transporte de elétrons [$ET_0/RC = (M_0 / VJ) \Psi E_0 = (M_0 / VJ)(1 - VJ)$] e dissipação [$DI_0/RC = (ABS/RC) - (TR_0/RC)$]; além disso, rendimento quântico para o transporte de elétrons no FSII ($\phi E_0 = ET_0 / ABS$); probabilidade de um éxciton capturado mover um elétron além da Q_A^- ($\Psi E_0 = ET_0 / TR_0$); e índice de desempenho para conservação de energia para redução dos aceptores finais do FSI [$PI_{TOTAL} = (RC/ABS) \cdot (\phi P_0 / (1 - \phi P_0)) \cdot (\Psi E_0 / (1 - \Psi E_0)) \cdot (\delta R_0 / (1 - \delta R_0))$].

2.5. Delineamento experimental e análise de dados

O delineamento experimental foi conduzido em design inteiramente casualizado, usando duas espécies (*Cattleya warneri* e *Miltonia spectabilis*) sob DH durante 90 dias (0, 30, 60 e 90). Os dados dos transientes OJIP e parâmetros do teste-JIP foram obtidos por meio do software Biolyser 4HP (Biolyser © R. M. Rodriguez, The Bionenergetics Laboratory,

University of Geneva, Geneva, Switzerland, version 3.06). Cinco plantas foram utilizadas por tratamento.

A tabulação e organização dos dados e a construção dos gráficos foram executados no software Excel versão Windows 2013. As médias dos dados obtidos foram comparadas aplicando-se o teste de Tukey ($P < 0,05$), seguidas pelos valores de erro padrão ($\pm E.P.$).

3. Resultados

O déficit hídrico (DH) induziu significativa redução no conteúdo relativo de água (CRA) em folhas e pseudobulbos das espécies estudadas (Figura 1). Em *C. warneri* as reduções iniciaram-se a partir de 30 dias de DH (DH-30) mantendo a mesma tendência nos dois órgãos, com CRA declinando de 93 para 80% e de 88 para 65% em folhas e pseudobulbos, respectivamente (Figura 1A). As reduções prosseguiram no decorrer do experimento, alcançando os mínimos valores no DH-90 (50% nas folhas e 27% nos pseudobulbos). Em *M. spectabilis*, a redução do CRA foi mais acentuada nos pseudobulbos, com os valores partindo de 90% no início do experimento (DH-0) para 55% no DH-30, 25% no DH-60 e $\approx 20\%$ no final do experimento (DH-90) (Figura 1B). Nas folhas desta espécie, foi observada redução significativa no CRA apenas aos 60 dias (DH-60) ($\approx 75\%$), com os menores valores ocorridos no DH-90 (55%).

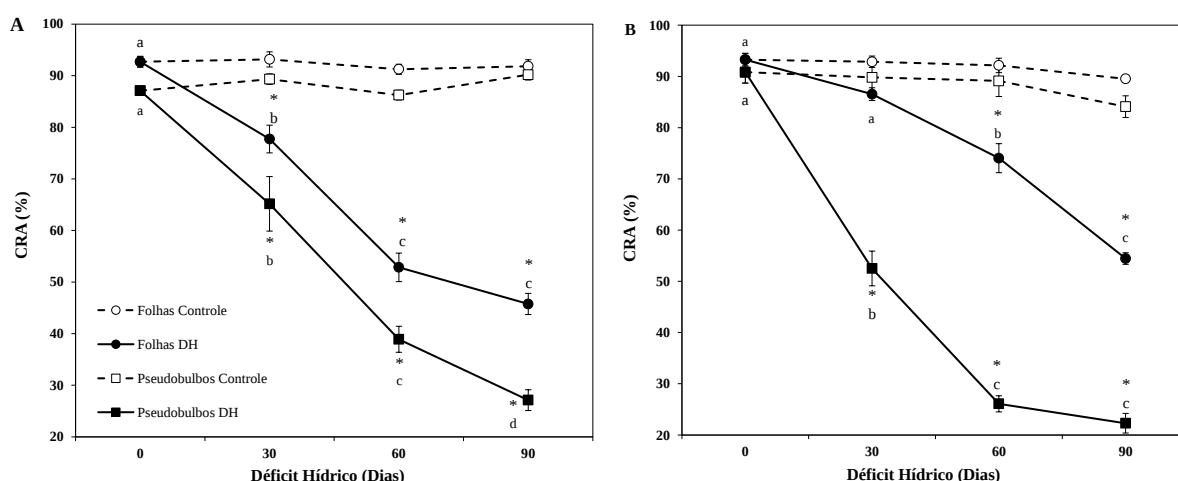


Figura 1- Conteúdo relativo de água (CRA) em folhas e pseudobulbos de (A) *Cattleya warneri* e (B) *Miltonia spectabilis* submetidas ao déficit hídrico (DH). Barras verticais indicam o erro padrão, as letras indicam diferença entre os dias de DH e os asteriscos indicam diferença entre tratamento e controle pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. ($n=5$).

As concentrações dos pigmentos fotossintéticos alteraram-se ao longo dos dias de DH nas folhas das duas espécies e nos pseudobulbos de *C. warneri*, mantendo-se inalterados nos pseudobulbos de *M. spectabilis* (Tabela 1). Observou-se reduções nas concentrações das clorofilas *a* (Chl *a*), *b* (Chl *b*) e total (Chl total) nas folhas das duas espécies, sendo a Chl *a* e Chl total reduzidas significativamente a partir dos 60 dias de DH (DH-60) atingindo os mínimos valores no DH-90 e, Chl *b* reduzida significativamente apenas no DH-90. A razão Chl *a*/Chl *b* alterou-se apenas nas folhas de *C. warneri*, com redução significativa no DH-60, e acréscimo parcial no DH-90. A concentração de pigmentos carotenoides (Carot) aumentou significativamente nas folhas das duas espécies submetidas ao déficit hídrico. Com relação aos pseudobulbos, alterações ocorreram apenas em *C. warneri*, com incrementos sendo observados nas concentrações de Chl *a*, Chl *b* e Chl total a partir do DH-60 e dos carotenoides apenas no DH-90, sem nenhuma alteração na razão Chl *a*/Chl *b*. Vale destacar ainda que, as duas espécies evidenciaram diferenças nas concentrações de pigmentos fotossintéticos entre folhas e pseudobulbos ao longo da maior parte do experimento, sendo os valores significativamente mais elevados nas folhas.

Tabela 1. Concentração de pigmentos fotossintéticos em plantas adultas de *Cattleya warneri* e *Miltonia spectabilis* submetidas ao déficit hídrico (DH) por 0, 30, 60 e 90 dias. (Chl *a* = clorofila *a*; Chl *b* = clorofila *b*; Chl total = clorofila total; Chl *a*/Chl *b* = razão clorofila *a*/clorofila *b*; Carot = carotenóides).

Espécie	Órgão Vegetal	Déficit Hídrico (Dias)	Chl <i>a</i> (mg gMF)	Chl <i>b</i> (mg gMF)	Chl total (mg gMF)	Chl <i>a</i> /Chl <i>b</i>	Carot (mg gMF)
<i>Cattleya warneri</i>	Folhas	0	3,390 Aa	1,355 Aa	5,581 Aa	2,555 Aa	0,147 Ba
		30	2,877 ABa	1,363 Aa	4,752 ABa	2,125 ABa	0,246 Ba
		60	2,749 Ba	1,402 Aa	4,548 Ba	2,012 Ba	0,411 Aa
		90	1,347 Ca	0,587 Ba	2,221 Ca	2,313 ABa	0,422 Aa
	Pseudobulbos	0	0,492 Bb	0,272 Bb	0,816 Bb	1,803 Ab	0,063 Bb
		30	0,509 Bb	0,257 Bb	0,841 Bb	1,987 Aa	0,127 Bb
		60	1,144 Ab	0,694 Aa	1,901 Aa	1,680 Ab	0,140 Bb
		90	1,184 Ab	0,586 ABb	1,957 Ab	2,012 Aa	0,463 Aa
<i>Miltonia spectabilis</i>	Folhas	0	5,929 Aa	2,310 Aa	9,757 Aa	2,567 Aa	0,579 Ba
		30	5,055 ABa	2,155 Aa	8,331 ABa	2,331 Aa	0,723 ABa
		60	4,074 BCa	2,121 Aa	6,743 BCa	1,983 Aa	0,649 ABa
		90	3,215 Ca	1,406 Ba	5,301 Ca	2,274 Aa	0,735 Aa
	Pseudobulbos	0	0,981 Ab	0,668 Ab	1,636 Ab	1,652 Ab	0,017 Ab
		30	0,897 Ab	0,580 Ab	1,493 Ab	1,696 Ab	0,072 Ab
		60	0,933 Ab	0,586 Ab	1,551 Ab	1,581 Aa	0,090 Ab
		90	0,392 Ab	0,231 Ab	0,651 Ab	1,750 Ab	0,112 Ab

Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os dias de DH dentro da espécie. Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre folhas e pseudobulbos dentro da espécie de acordo com teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade. ($n=5$).

Neste estudo, os dados obtidos por meio da fluorescência transiente da clorofila *a* reflete a sucessiva redução dos carreadores de elétrons entre os fotossistemas II e I (FSII e FSI), evidenciando três fases distintas: O-J, J-I e I-P (Schansker et al., 2005). A fase O-J, obtida entre 50µs e 2ms refere-se à redução fotoquímica das quinonas A e B (Q_A e Q_B) no lado aceptor do FSII. Além disso, a fase J-I (2 a 30ms) envolve os eventos de oxidação/redução do *pool* de plastoquinonas (PQ), complexo citocromo b6f (Cyb6f) e plastocianina (PC), enquanto que, a fase I-P, que ocorre entre 30 e 300ms, refere-se aos processos de redução dos aceptores finais de elétrons do FSI como a ferredoxina (Fd) e NADP (Joliot e Joliot, 2002; Schansker et al., 2005; Tóth et al., 2007; Yusuf et al., 2010).

Como mostrado na Figura 2A e B, as folhas de ambas as espécies de orquídeas apresentaram durante todo o experimento curvas OJIP com comportamento típico polifásico, com passos intermediários das curvas – J e I – bem definidos. Contudo, a intensidade de fluorescência foi elevada nas folhas de *C. warneri* e manteve-se próxima ou abaixo da condição controle em *M. spectabilis*. Nos pseudobulbos, por outro lado, as curvas de ambas as espécies apresentaram-se suprimidas, não evidenciando os passos intermediários J e I durante todo o experimento, sendo que, na espécie CAM, *C. warneri*, estas curvas mantiveram-se mais próximas ao controle enquanto que na espécie C₃, *M. spectabilis*, estas se elevaram até o DH-90 (Figura 2A e B).

A fluorescência variável relativa entre os passos O (50µs) e P (300ms) foi normalizada e mostrada como $V_T = (F_T - F_0) / (F_P - F_0)$ e $\Delta V_T = [V_{T(\text{tratamento})} - V_{T(\text{controle})}]$. Incrementos no nível J e na cinética ΔV_T foram observados nas folhas e pseudobulbos de ambas as espécies (Figura 2). Em *C. warneri* as curvas V_T e ΔV_T elevaram-se nas folhas desde o DH-30 até o DH-90, enquanto que nos pseudobulbos, acréscimos ocorreram somente a partir do DH-60, com posterior decréscimo no DH-90 (Figura 2C e E). Em *M. spectabilis* ocorreram acréscimos progressivos das curvas V_T e ΔV_T tanto nas folhas quanto nos pseudobulbos, iniciando no DH-30 e alcançando os máximos valores no DH-90 (Figura 2D e F). Vale destacar ainda que, ao final do experimento (DH-90), máximos valores das curvas foram observados nas folhas da espécie CAM (aproximadamente 20%) e nos pseudobulbos da espécie C₃ (aproximadamente 25%).

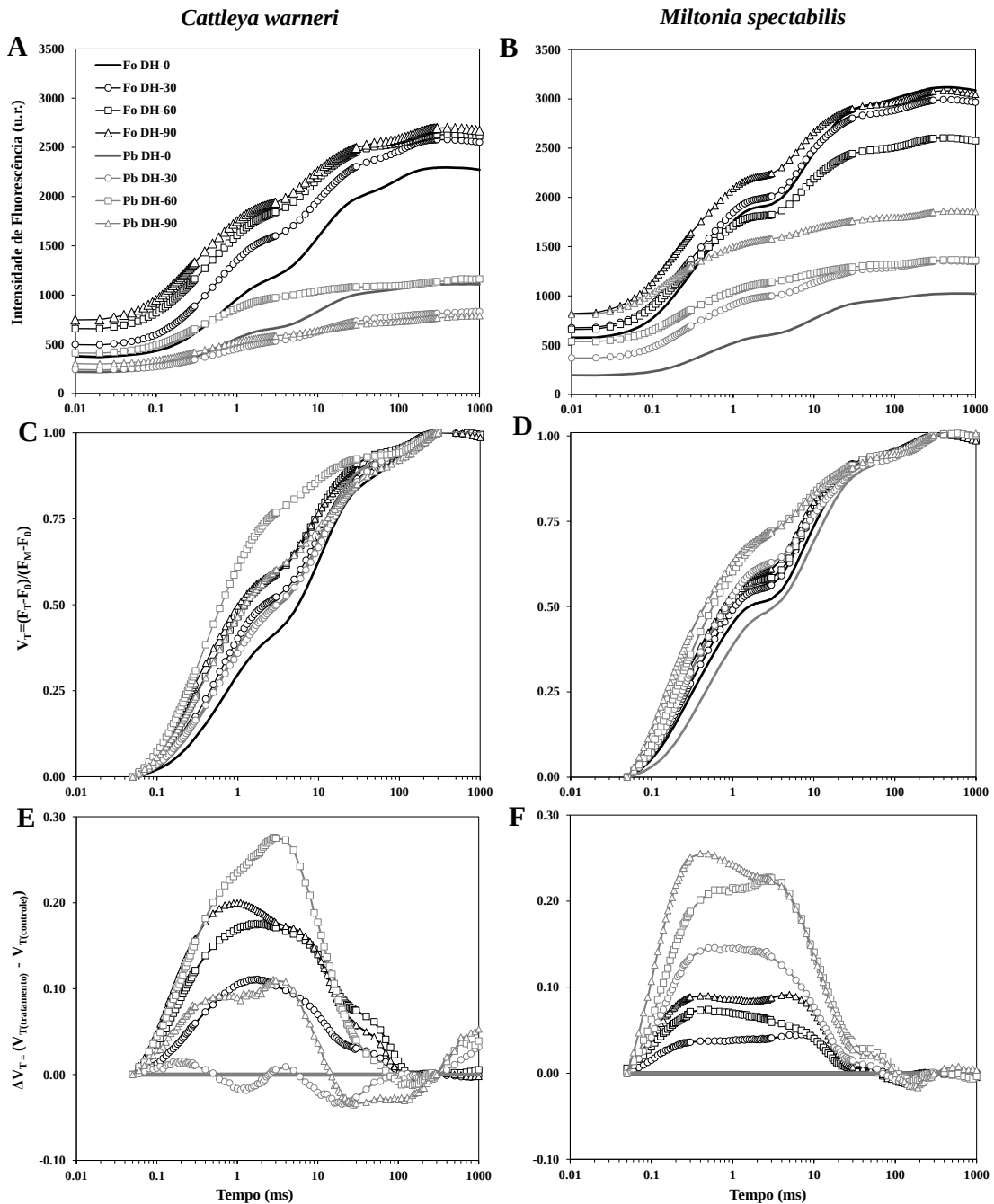


Figura 2. Cinética da emissão da fluorescência da clorofila *a* normalizada entre os passos O e P em folhas (Fo) e Pseudobulbos (Pb) de *Cattleya warneri* e *Miltonia spectabilis* submetidas ao déficit hídrico (DH) por 90 dias. Antes das avaliações, as amostras foram adaptadas ao escuro por 1h. Curva de fluorescência transiente OJIP da clorofila *a* (A e B); Fluorescência variável relativa da clorofila *a*: $V_T = (F_T - F_0) / (F_P - F_0)$ (C e D); e a diferença cinética de V_T : $\Delta V_T = [V_{T(\text{tratamento})} - V_{T(\text{controle})}]$ (E e F). ($n=5$).

Em ambas as espécies a conectividade energética (Banda-L) e a estabilidade do complexo de evolução do oxigênio (CEO) (Banda-K) decresceram em folhas e pseudobulbos

a partir do DH-30, alcançando as mínimas conectividade e estabilidade ao final do experimento (DH-90) (Figura 3). Na espécie CAM, *C. warneri*, os valores das bandas K e L elevaram-se progressivamente nas folhas desde o DH-30 até o DH-90, enquanto que os pseudobulbos evidenciaram elevação da Banda-L no DH-30 mantendo-se similar até DH-90, e elevação da banda-K do DH-30 até o DH-60, mantendo-se estável até o DH-90 (Figura 3A e C). Por outro lado, a espécie C_3 , *M. spectabilis*, apresentou incrementos progressivos das bandas K e L tanto em folhas quanto pseudobulbos, alcançando os máximos valores no DH-90 (Figura 3B e D). Observa-se que as curvas mais expressivas foram visualizadas nas folhas de *C. warneri* (12% na Banda-L e 18% na Banda-K) (Figura 3A e C) e nos pseudobulbos de *M. spectabilis* (20% na Banda-L e 25% na Banda-K) (Figura 3B e D).

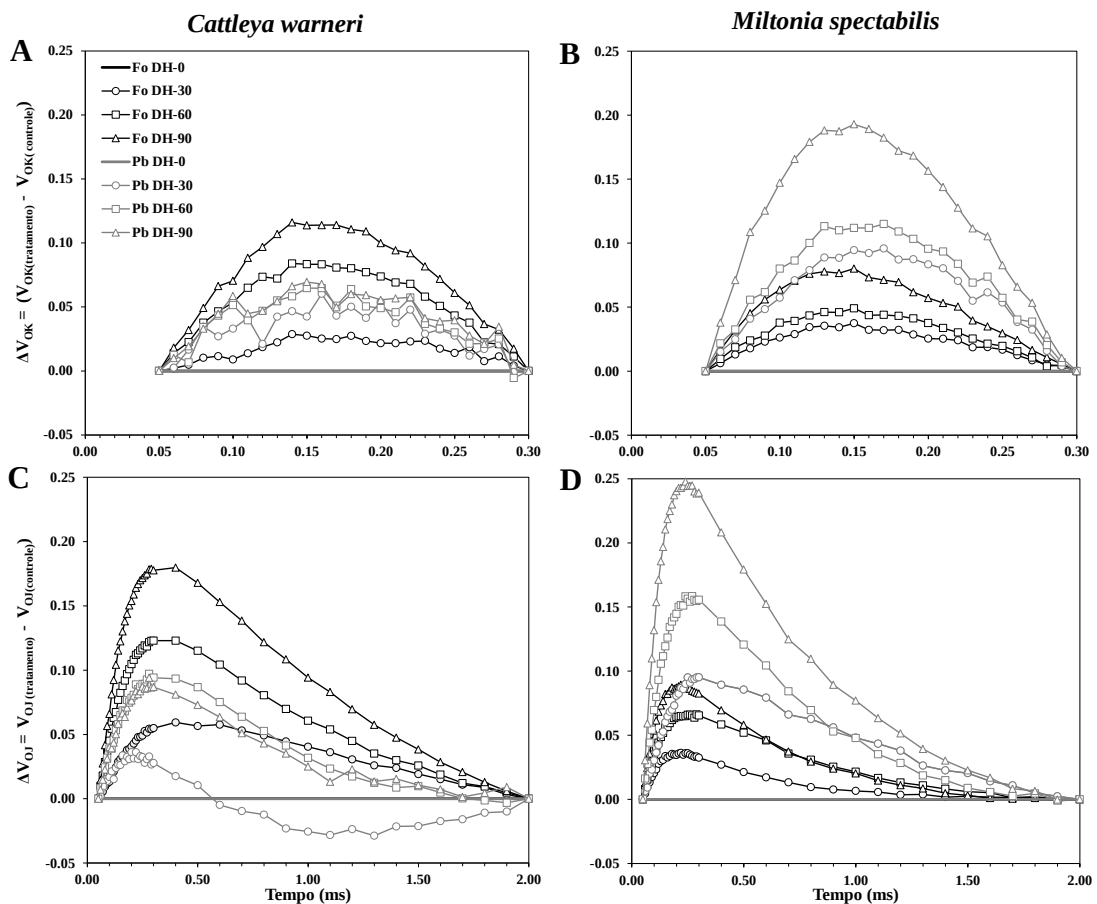


Figura 3. Diferença cinética de V_{OK} e V_{OJ} obtida após a dupla normalização entre os passos O-K [$\Delta V_{OK} = V_{OK(tratamento)} - V_{OK(controle)}$] evidenciando a banda L (A e B); e entre os passos O-J [$\Delta V_{OJ} = V_{OJ(tratamento)} - V_{OJ(controle)}$] evidenciando a banda K (C e D), em folhas (Fo) e pseudobulbos (Pb) de *Cattleya warneri* e *Miltonia spectabilis* submetidas ao déficit hídrico (DH) por 90 dias. Antes das avaliações, as amostras foram adaptadas ao escuro por 1h. ($n=5$).

Incrementos na fluorescência inicial (F_0) e declínios na eficiência fotoquímica máxima do FSII (F_v/F_m) em folhas e pseudobulbos de ambas as espécies foram observados (Figura 4). O aumento de F_0 foi mais acentuado nas folhas de *C. warneri* e nos pseudobulbos de *M. spectabilis* atingindo valores máximos ao final do experimento (DH-90) (Figura 4A e B). Ao mesmo tempo, decréscimos em F_v/F_m ocorreram ao longo do experimento, sendo no mesmo ritmo entre os órgãos de *C. warneri* (Figura 4C) e, de maneira mais acentuada, nos pseudobulbos de *M. spectabilis* (Figura 4D), com os mínimos valores no DH-90 para todos os casos.

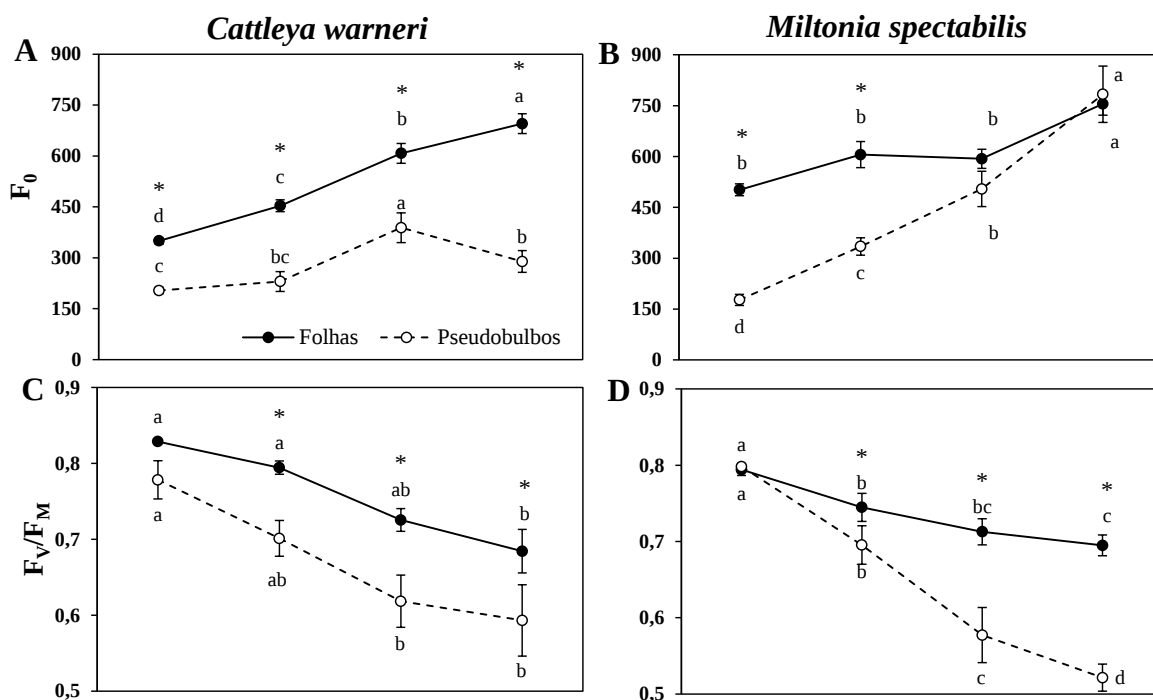


Figura 4- Efeitos do déficit hídrico (DH) sobre a fluorescência Inicial (F_0) (A e B) e a eficiência fotoquímica máxima do FSII (F_v/F_m) (C e D) em folhas e pseudobulbos de *Cattleya warneri* e *Miltonia spectabilis*. Barras verticais indicam o erro padrão, as letras indicam diferença entre os dias de DH e os asteriscos indicam diferença entre os órgãos em cada espécie no dia de DH ($P < 0.05$). ($n=5$).

De maneira geral, aumentos significativos dos parâmetros relacionados aos fluxos específicos de energia (ABS/RC , TR_0/RC , ET_0/RC e DI_0/RC) em folhas e pseudobulbos de *C. warneri* e *M. spectabilis* foram observados ao longo dos dias de DH (Figura 5), com pouca ou nenhuma diferença entre folhas e pseudobulbos para a espécie CAM (Figura 5A, C, E e G). Por outro lado, em *M. spectabilis*, o aumento nos valores desses parâmetros foi mais evidente nos pseudobulbos (Figura 5B, D, F e H).

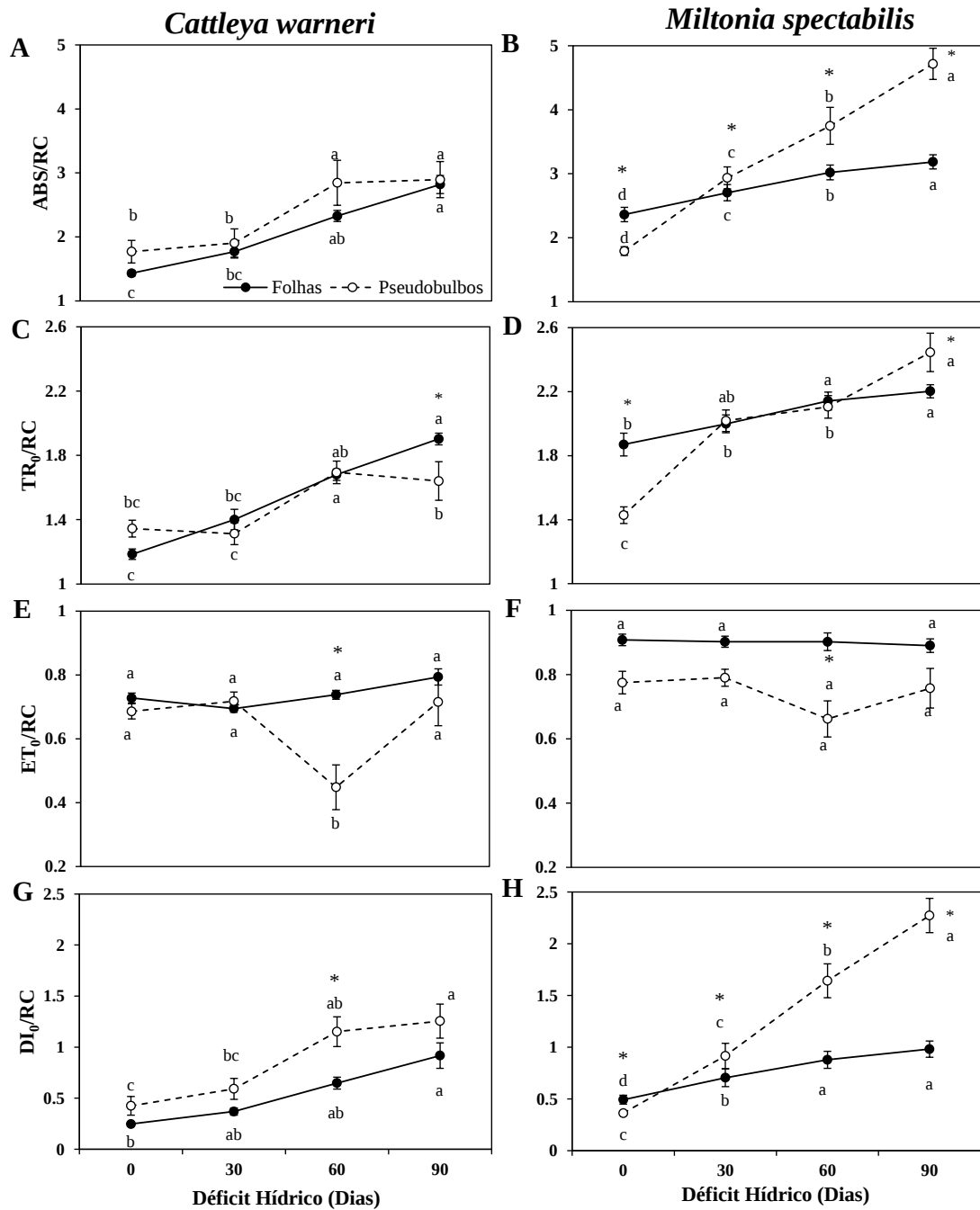


Figura 5. Efeitos do déficit hídrico (DH) sobre parâmetros de fluxos específicos de energia: fluxo de energia absorvida por CR (ABS/RC) (A e B); Fluxo de energia capturada por CR (TR₀/RC) (C e D); Fluxo de transporte de energia por CR (ET₀/RC) (E e F); Fluxo de energia dissipada por CR (DI₀/RC) (G e H), em folhas e pseudobulbos de *Cattleya warneri* e *Miltonia spectabilis*. Barras verticais indicam o erro padrão, as letras indicam diferença entre os dias de DH e os asteriscos indicam diferença entre os órgãos em cada espécie no dia de DH ($P < 0.05$). ($n=5$).

Analogamente, o rendimento quântico para o transporte de elétrons no FSII (ET_0/ABS), a probabilidade de éxciton capturado mover um elétron além da Q_A (ET_0/TR_0) e o índice de desempenho total para conservação de energia e redução dos aceptores finais do FSI (PI_{TOTAL}) também apresentaram reduções em ambos folhas e pseudobulbos ao longo do DH, com decréscimos iniciando-se no DH-30 ou 60 e os menores valores sendo observados no DH-90 (Figura 6). Para estes parâmetros também é mais expressiva as diferenças entre os órgãos de *M. spectabilis*, com decréscimos mais expressivos observados nos pseudobulbos.

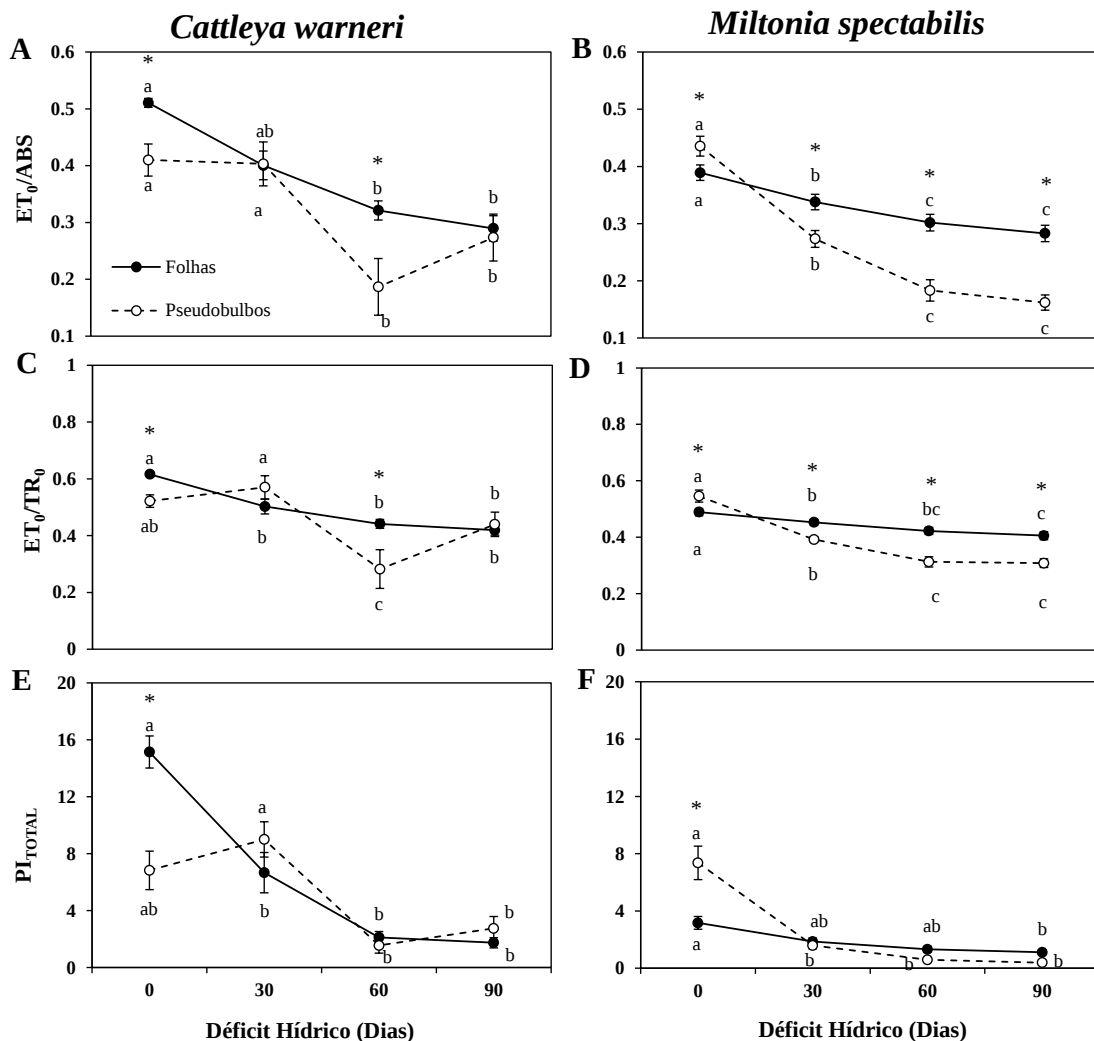


Figura 6. Efeitos do déficit hídrico (DH) sobre o rendimento quântico para o transporte de elétrons no FSII (ET_0/ABS) (A e B); probabilidade de éxciton capturado mover um elétron além da Q_A (ET_0/TR_0) (C e D); índice de desempenho total medindo a performance até os aceptores de elétrons do FSI (PI_{TOTAL}) (E e F), em folhas e pseudobulbos de *Cattleya warneri* e *Miltonia spectabilis*. Barras verticais indicam o erro padrão, as letras indicam diferença entre os dias de DH e os asteriscos indicam diferença entre os órgãos em cada espécie no dia de DH ($P < 0.05$). ($n=5$).

4. Discussão

As plantas de *Cattelya warneri* e *Miltonia spectabilis* submetidas ao déficit hídrico (DH) apresentaram características morfológicas típicas do estresse, incluindo a murcha de folhas e pseudobulbos a partir de aproximadamente 60 dias (DH-60) com intensificação ao final do experimento (DH-90). Além disso, algumas plantas de *M. spectabilis* apresentaram perda de folhas a partir do DH-60 (*ver* Anexo). De acordo com Mahouachi et al. (2006) a abscisão foliar é considerada um eficiente mecanismo para evitar danos durante períodos de baixa disponibilidade hídrica como observado em *Cordia africana*, *Croton macrostachyus*, *Millettia ferruginea* (Gindaba et al., 2004), e em *Reaumuria soongorica* (Liu et al., 2007; Xu et al., 2010). *Reaumuria soongorica*, por exemplo, é um arbusto nativo de deserto que perde suas folhas quando o conteúdo relativo de água (CRA) encontra-se abaixo de 45%. No presente estudo, *M. spectabilis* apresentou folhas com um CRA mínimo de 55% no DH-90, o que indica que folhas com CRA abaixo deste índice tendem a sofrer abscisão.

A supressão hídrica resultou, ainda, em significativa e contínua perda de água em folhas e pseudobulbos nas duas espécies estudadas, sendo que nos pseudobulbos esta perda foi mais elevada, assim como observado nos trabalhos de Stancato et al. (2001) e He et al. (2013) (Figura 1). Considerando-se as diferenças observadas no CRA entre *C. warneri* e *M. spectabilis* no decorrer do DH, sugere-se melhor capacidade de manutenção do status hídrico foliar para esta última espécie, uma vez que, redução significativa do CRA nas folhas ocorreu apenas no DH-60, ao passo que em *C. warneri*, esta redução ocorreu a partir do DH-30. Além disso, ao final do experimento (DH-90), *C. warneri* apresentou menor CRA, evidenciando-se menos capaz de regular a perda de água. Esses resultados divergem daqueles geralmente observados em plantas CAM, uma vez que estas são típicas de ambientes com restrição hídrica e, portanto, tendem a apresentar maior tolerância ao DH (Drennam e Nobel, 2000; Herrera, 2009; Taiz e Zeiger, 2013). Resultados que corroboram tal afirmativa foram encontrados por Rodrigues et al. (2013), os quais, ao trabalharem com espécies de orquídeas CAM e C₃, evidenciaram maior resistência à perda de água na espécie CAM (*C. walkeriana*) em relação à espécie C₃ (*Oncidium sp.*) após 30 dias de DH. Os autores atribuíram a maior resistência à perda de água na espécie CAM à presença de características morfológicas mais eficientes no controle da perda de água, tais como maior número de camadas celulares no córtex, paredes celulares mais lignificadas, cutícula mais espessa e elevada densidade de esclereídes nas folhas, que funcionam no armazenamento e como atalho para o transporte de água no mesofilo.

Uma possível explicação para a menor variação do CRA observada nas folhas de *M. spectabilis* no presente estudo pode estar relacionada à maior eficiência desta espécie em apresentar o pseudobulbo como órgão facilitador na mobilização de água para as folhas. Assim, como indicado por Stancato et al. (2001) e He et al. (2013), os pseudobulbos desempenham um importante papel fornecendo água às folhas, permitindo sua maior manutenção do status hídrico. Neste estudo, isso pode ser evidenciado pela redução mais acentuada do CRA nos pseudobulbos da espécie C₃, o que pode estar contribuindo para a manutenção do status hídrico foliar elevado por mais tempo. Na espécie CAM, *C. warneri*, essa relação não é observada e a redução do CRA nos pseudobulbos ocorre no mesmo ritmo das folhas (Figura 1). Além disso, as folhas senescentes em *M. spectabilis* podem também contribuir no processo de mobilização de água e manutenção do CRA nas folhas jovens, antes de sofrerem abscisão (Lim et al. 2007).

Outra possível explicação para a maior manutenção do status hídrico das folhas em *M. spectabilis* pode estar acoplada ao ajustamento osmótico. De acordo com Ali et al. (1999) e Blum (2005), o CRA pode ser mantido em níveis elevados mesmo em condições de DH, desde que a planta apresente um eficiente mecanismo de ajuste osmótico. Ennajeh et al. (2009) e Kakani et al. (2011) consideram como importantes substâncias de ajuste osmótico açúcares como a sacarose, frutose ou glicose, e, neste caso, a translocação de açúcares juntamente com água dos pseudobulbos para as folhas em *M. spectabilis* pode estar fornecendo o recurso necessário para a manutenção do status hídrico observado.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 1, as reduções na concentração de clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*) e clorofila total (Chl total) comuns às folhas das duas espécies podem ser atribuídas ao efeito fotodestrutivo causado pelo DH, o qual é responsável pela elevação das taxas de degradação e redução das taxas de biossíntese desses pigmentos (Tausz et al., 2001). He et al. (2013) e Minardi et al. (2014) também evidenciaram reduções na concentração de clorofilas em decorrência do DH nas folhas de orquídeas e samambaias epífitas, respectivamente.

A razão Chl *a*/Chl *b* pode ser eficientemente utilizada como um indicador de alterações na razão fotossistema I / fotossistema II (FSI/FSII) ou aumento/diminuição do tamanho do sistema antena (Haldrup et al., 1999; Liu et al., 2011). No presente trabalho, a razão Chl *a*/Chl *b* foi significativamente reduzida apenas em folhas de *C. warneri* aos 60 dias de DH, provavelmente em função de a Chl *a* ter sido degradada enquanto a Chl *b* ainda

manteve-se em níveis similares ao do controle. No DH-90, porém, com a redução do teor de Chl *b*, a razão Chl *a*/Chl *b* retornou a valores aproximados ao do DH-0.

Os pigmentos carotenoides são importantes substâncias que atuam no processo de proteção das plantas contra estresses ambientais. Isso ocorre a partir da degradação do β -caroteno, que dá início ao ciclo das xantofilas, e resulta em um eficiente mecanismo de dissipação da energia quando o aparato fotossintético está saturado energeticamente (Frank et al., 1999; Demmig-Adams et al., 2006; Lambers et al., 2008). Além disso, os carotenoides também atuam como mecanismos antioxidantes e suas concentrações podem ser elevadas quando as plantas estão em situação de DH (Pompelli et al., 2010; Gholami et al., 2012). Assim, a elevação nas concentrações de carotenoides ocorrida nas duas espécies (exceto nos pseudobulbos de *M. spectabilis*) evidencia que o DH prolongado (a partir de 60 dias) estimulou a biossíntese de pigmentos com papel fotoprotetor.

Com relação aos pseudobulbos, o DH não alterou significativamente a concentração de pigmentos em *M. spectabilis*, mas em *C. warneri*, com excessão da razão Chl *a* /Chl *b*, houve aumento na concentração de todos os pigmentos. Esses resultados sugerem uma resposta eficiente dos pseudobulbos da espécie CAM em compensar a redução das concentrações de pigmentos e consequente atividade fotossintética das folhas. Porém, estes incrementos devem ser poucos expressivos em termos de ganho em atividade fotossintética, uma vez que, como observado por He e Teo (2007), Moreira et al. (2009) e He et al. (2011), órgãos não foliares como pseudobulbos, pétalas e raízes contribuem muito pouco para a capacidade fotossintética da planta. Isso é confirmado pelas maiores concentrações de pigmentos fotossintéticos obtidos nas folhas em relação aos pseudobulbos para as duas espécies durante todo o experimento, assim como observado nos trabalhos de He et al. (2011) e He et al. (2013) (Tabela 1). Por se tratar de um órgão com maior capacidade fotossintética, a folha necessariamente apresenta maiores concentrações de clorofilas e carotenoides quando comparadas a outros órgãos, assim como encontrado por Moreira et al. (2009) nas folhas em relação a raízes de orquídeas adaptadas à sombra.

As curvas OJIP com comportamento polifásico característico revelaram que as folhas das duas espécies encontravam-se fotossinteticamente ativas durante todo o experimento (Strasser e Strasser, 1995). Os incrementos em todos os passos nas curvas observados nas folhas de *C. warneri* indicam que o DH causou decréscimos no transporte de elétrons além da quinona A (Q_A) (Haldiman e Strasser, 1999), com consequente acúmulo de formas reduzidas (Q_A^-) (Lazár et al., 1997) (Figura 2A). A relativa estabilidade nas curvas referentes

às folhas de *M. spectabilis* indicam que esta espécie pode ser capaz de equilibrar o transporte de elétrons sob condições de DH (Figura 2B). A presença de curvas com as fases OJIP suprimidas nos pseudobulbos de ambas as espécies revelam que, mesmo em condição controle (DH-0), estes órgãos podem evidenciar bloqueios parciais ou totais no fluxo de energia na cadeia transportadora de elétrons da fotossíntese (Mehta et al., 2010). Este resultado para pseudobulbos está de acordo com o proposto por Moreira et al. (2009), os quais afirmam que, mesmo em condições ótimas, órgãos não foliares apresentam menor capacidade fotossintética.

Os acréscimos observados nas curvas V_T e ΔV_T das folhas de ambas as espécies indicam declínios da capacidade de reduzir fotoquimicamente Q_A e das propriedades cinéticas requeridas para redução do *pool* de plastoquinonas (PQ) (Figura 2C-F). Assim, pode-se sugerir que o DH causa o acúmulo de formas reduzidas dos intermediários da cadeia transportadora de elétrons, limitando o fluxo fotoquímico entre o FSII e FSI nas folhas de ambas as espécies, porém, de maneira mais evidente em *C. warneri* ($\approx 12\%$ a mais) (Schansker et al., 2005; Tóth et al., 2007; Xin et al., 2013). A manutenção das curvas no DH-30, elevação no DH-60 e posteriores decréscimos no DH-90 nos pseudobulbos de *C. warneri* indicam um equilíbrio inicial seguido de um desequilíbrio e posterior reequilíbrio parcial das atividades redox do *pool* de plastoquinonas (Figura 2C e E). Por conseguinte, as elevações progressivas ocorridas nas curvas V_T e ΔV_T dos pseudobulbos de *M. spectabilis* indicam efeitos similares ao das folhas, mas, de maneira mais evidente (Figura 2D e F). As curvas com amplitudes menos positivas nas folhas e mais positivas nos pseudobulbos da espécie C_3 , *M. spectabilis*, são indicativos da melhor capacidade em reduzir fotoquimicamente Q_A bem como de manter as propriedades cinéticas para a redução/oxidação da PQ sob DH nas folhas, órgãos fotossinteticamente mais ativos. Isto pode estar ocorrendo por duas razões, primeiro em função da capacidade de manutenção de água nas folhas desta espécie com consequente melhor estabilidade fotoquímica, proporcionada pelo potencial de translocação de água dos pseudobulbos e das folhas senescentes e, segundo pelo papel da fotorrespiração, que ocorre na espécie C_3 e caracteriza-se como um mecanismo fotoprotetor pela capacidade de dissipação de ATP e poder redutor, o que estimula a utilização de fótons mesmo em condições limitadas de CO_2 e previne o aparato fotossintético contra danos oxidativos (Peterhansel e Maurino 2011; Sperling, 2014; Zhang et al. 2016).

O aparecimento das Bandas-L e K observadas nas duas espécies de orquídeas indicam que a conectividade energética e a estabilidade do CEO foram comprometidas tanto em folhas

quanto em pseudobulbos a partir do DH-30, mesmo antes do aparecimento dos sinais visíveis decorrentes da supressão hídrica (Figura 3). Isto está de acordo com o proposto por Oukarroum et al. (2009), que sugerem as Bandas-L e K como eficientes mecanismos de identificação de distúrbios ecofisiológicos, mesmo antes da manifestação visível dos danos.

A Banda-L (150 μ s) é um indicador da conectividade energética ou agrupamento entre as subunidades do FSII e relaciona-se à manutenção da estrutura/empilhamento dos tilacoides nos cloroplastos (Strasser e Stirbet, 1998; Oukarroum et al., 2007; Tsimilli-Michael e Strasser, 2008). A Banda-K (300 μ s) é indicativa da inativação do CEO e/ou incremento do tamanho da antena do FSII (Strasser et al., 2004; Yusuf et al., 2010). Assim, quanto maiores forem os valores positivos da Banda-L, como observados no decorrer do DH no presente estudo, menor é a conectividade energética e o agrupamento entre as subunidades (Yusuf et al., 2010) e, quanto maiores forem os valores da Banda-K, maior será o desequilíbrio energético entre os lados doador e aceptor do FSII, onde o fluxo de elétrons do CEO para P_{680} no lado doador do FSII é mais lento que o fluxo do FSII para Q_A no lado aceptor (Strasser, 1997; Lazar, 2006; Jiang et al., 2008; Yusuf et al., 2010).

Os valores mais elevados para as Bandas-L e K observados nas folhas de *C. warneri* (Figura 3A e C) e nos pseudobulbos de *M. spectabilis* (Figura 3B e D) indicam que estes órgãos tendem a ser mais sensíveis ao DH nas respectivas espécies, com declínios acentuados na conectividade energética (Banda-L) e na estabilidade do CEO (Banda-K) de maneira progressiva ao longo do experimento, alcançando o ponto máximo no DH-90. Do mesmo modo, valores das Bandas-L e K evidenciam que os pseudobulbos de *C. warneri* e as folhas de *M. spectabilis* tendem a apresentar-se mais tolerantes aos efeitos do DH. Estes resultados sugerem uma menor relação entre os órgãos em *C. warneri* e maior em *M. spectabilis*. Isto, porque, como observado nas curvas V_T e ΔV_T , parece haver maior tolerância ao DH das folhas na espécie C_3 , *M. spectabilis*, em detrimento a um maior comprometimento (e consequente declínio das atividades fotoquímicas) dos pseudobulbos, ao disponibilizarem recurso para melhor manutenção das folhas. Essa relação entre folhas e pseudobulbos não ocorre de maneira tão efetiva na espécie CAM, uma vez que os efeitos do DH nas folhas não são atenuados tão eficientemente em detrimento aos pseudobulbos.

O aumento nos valores de F_0 observado nas espécies de orquídeas sob DH (Figura 4A e B), pode ser atribuído a incrementos no número de CR's inativos, baixa transferência ou bloqueio de energia entre os sistema antena até os CR's do FSII devido à dissociação entre o complexo do sistema antena e o núcleo do FSII, ou a inativação do complexo de evolução do

oxigênio (CEO) (Pospíšil et al., 1998; Bertamini et al., 2004; Kalaji et al. 2011; Ghotbi-Ravandi et al., 2014). No presente estudo, os incrementos em F_0 observados em folhas e pseudobulbos das duas espécies, de maneira mais expressiva nas folhas de *C. warneri* e pseudobulbos de *M. spectabilis*, pode estar associado tanto ao incremento no número de CR's inativos, observado por elevações em absorção e dissipação de energia por CR (ABS/RC e DI_0/RC) (Figura 5A, B, G e H) quanto pela inativação do CEO, como observado por incrementos da Banda-K (Figura 3C e D). Além disso, incrementos em F_0 influenciaram diretamente na diminuição de F_V/F_M mais expressivamente nos pseudobulbos da espécie *C₃* (Figura 4C e D). F_V/F_M diz respeito à eficiência fotoquímica do FSII e é considerada por Björkman e Demmig (1987) como a taxa proporcional de fotossíntese em folhas intactas.

Se os danos às unidades do FSII forem parciais e recuperados em pouco tempo, têm-se o fenômeno da fotoinibição dinâmica, o qual pode ser observado pelo retorno dos valores às condições iniciais ou prévias ao estresse tanto em F_V/F_M , quanto em F_0 (Long et al., 1994; Osmond, 1994). No presente trabalho, porém, o decréscimo contínuo de F_V/F_M associado às elevações de F_0 causado pelo DH ao longo de meses, implica em uma condição de estresse severo conhecido como fotoinibição crônica, especialmente nas folhas de *C. warneri* e nos pseudobulbos de *M. spectabilis* (Figura 4). Nesta situação, ocorre redução da eficiência fotoquímica do FSII devido aos danos que tendem a ser irreversíveis causando a fotodestruição de estruturas como a proteína D1 nos CR's e destruição dos pigmentos fotossintéticos, como observado pelos declínios nos valores das clorofilas (Tabela 1) (Krause e Somersalo, 1989; Venkateswarlu et al., 2012., He et al. 2013). Efeitos fotoinibitórios decorrentes do DH prolongado e evidenciado por incrementos em F_0 e/ou declínios em F_V/F_M também foram documentados em trabalhos com outras espécies de orquídeas (Stancato et al. 2001, He et al., 2013), plantas de deserto (Van Heerden et al., 2007 e Campos et al., 2014) e plantas cultivadas (Ghotbi-Ravandi et al., 2014 e Jedmowski et al., 2014). No entanto, como postulado por Force et al. (2003) e Jiang et al. (2008) a fotoinibição é um fenômeno melhor explicado quando é observado incrementos na dissipação de energia na forma de calor (DI_0/RC) e decréscimos significativos na eficiência de transporte de elétrons para as reações redox além da Q_A (ET_0/TR_0) do que simplesmente declínios em F_V/F_M e incrementos em F_0 . E, como já observado para F_V/F_M e F_0 , todos os resultados favorecem à aceitação da ocorrência de fotoinibição dado o aumento em DI_0/RC e declínios em ET_0/TR_0 obtido para ambas as espécies.

A ocorrência de danos à eficiência fotoquímica do FSII (F_V/F_M) refletiu em significativas alterações nas razões de fluxos. O fluxo de energia absorvida por CR (ABS/RC) evidencia o tamanho efetivo da antena de um CR ativo e é calculado pelo número total de fótons absorvidos pelas moléculas de clorofila nos CR's, dividido pelo número total de CR's ativos (Strasser e Strasser, 1995; Mehta et al., 2010), sendo assim, influenciado por variações na razão de CR's ativos/inativos. No presente estudo, elevações em ABS/RC ocorridas em folhas e pseudobulbos das orquídeas ao longo do experimento (Figura 5A e B) podem ter duas explicações possíveis: (1) aumento efetivo no tamanho da antena que fornece energia de excitação para os RC's ou (2) redução da atividade dos RC's redutores de Q_A (Strasser e Stirbet 1998; Yusuf et al. 2010). Assim como observado por Gomes et al. (2012) e Martins et al. (2015), a segunda explicação parece ser provável, uma vez que, as elevações em ABS/RC foram acompanhadas por reduções na conectividade energética entre as subunidades do FSII (Banda L) (Figura 4A e B), indicando que folhas e pseudobulbos de ambas as espécies apresentaram redução da atividade nos CR's redutores de Q_A , sendo este efeito mais expressivo nos pseudobulbos de *M. spectabilis*.

Com a redução ou inativação das atividades dos CR's de Q_A , o fluxo de energia capturada por CR (TR_0/RC) aumentou significativamente entre o início (DH-0) e o término do experimento (DH-90) em ambas as espécies, sendo, mais uma vez, de maneira mais expressiva nos pseudobulbos da espécie *C.3*, *M. spectabilis* (Figura 5C e D). Gonçalves et al. (2007), Jiang et al. (2008) e Strasser et al. (2010) também evidenciaram elevações em TR_0/RC em plantas sob condições de estresse, indicando que, assim como no presente estudo, uma menor quantidade de CR's ativos estão sendo responsáveis pela captura da energia de excitação que é absorvida.

A etapa seguinte ao processo de captura de energia (TR_0/RC) é o fluxo de transporte desta energia por CR (ET_0/RC). No presente estudo, a manutenção de ET_0/RC em *M. spectabilis* e as oscilações em *C. warneri* evidenciam que, apesar das elevações nos valores de absorção (ABS/RC) e captura (TR_0/RC) de energia, esta não está sendo direcionada ao transporte de elétrons (Figura 5E e F). De acordo com o observado para os valores de dissipação da energia por CR (DI_0/RC), a energia proveniente das elevações de ABS/RC e TR_0/RC que não está seguindo para o transporte de elétrons (ET_0/RC), passa, então, a ser dissipada na forma de calor (DI_0/RC) (Figura 5G e H) (Öquist et al., 1992; Strasser et al., 2004; Demetrius et al., 2007). Corroborando os resultados observados para ABS/RC e TR_0/RC , incrementos em DI_0/RC foram expressivos nos dois órgãos de ambas as espécies, de

maneira mais expressiva nos pseudobulbos de *M. spectabilis*, atingindo valores máximos no DH-90.

De acordo com Strasser et al. (2004), elevações em DI_0/RC estão diretamente relacionados a conversão de CR's redutores em CR's dissipadores, um mecanismo de fotoproteção do FSII em eventos onde não são observadas correlações fortes e significativas entre ABS/RC e ET_0/RC . Assim, DI_0/RC atua como um mecanismo de fotoinibição dinâmica, prevenindo danos permanentes ao aparato fotossintético e suas subunidades ativas por meio da rápida dissipação de energia excedente na forma de calor (Öquist et al., 1992; Hermans 2003). No presente trabalho, porém, esse eficiente mecanismo na prevenção de danos ao sistema fotossintético não é o suficiente, pois, como observado anteriormente, a ocorrência de declínios em F_V/F_M e incrementos em F_0 durante todo o experimento indicam a ocorrência de fotoinibição crônica, com danos generalizados e permanentes sobre o sistema fotossintético.

Decréscimos observados no rendimento quântico para o transporte de elétrons no FSII (ET_0/ABS) e na probabilidade de um éxciton capturado mover um elétron além da Q_A (ET_0/TR_0) indicam que o DH prolongado inibiu as reações luminosas primárias e as reações redox independentes da luz após a Q_A devido à interrupção no fluxo de elétrons da Q_A até os aceptores do FSI (Figura 6A-D). Estes são fenômenos relacionados e, de acordo com Xiang et al. (2013), uma vez que o fluxo de elétrons além da Q_A é inibido, forte decréscimo é observado em ET_0/ABS . Estes efeitos foram observados nos órgãos das duas espécies, com maior intensidade nos pseudobulbos de *M. spectabilis*.

Além destes últimos parâmetros, fortes decréscimos foram observados no índice de desempenho total medindo a performance até os aceptores de elétrons do FSI (PI_{TOTAL}), especialmente nas folhas de *C. warneri* e pseudobulbos de *M. spectabilis* (Figura 6E e F). PI_{TOTAL} é um indicador de vitalidade da planta e tem sido considerado como um parâmetro mais sensível para a detecção de estresses nos vegetais (Christen et al., 2007; Oukarroum et al., 2007; Yusuf et al., 2010), pois incorpora em seu cálculo parâmetros relacionados com a conservação de energia de fótons absorvidos pelo FSII (ABS), captura da energia de excitação (TR) e conversão da energia de excitação para o transporte de elétrons para o intersistema (ET) e a redução dos aceptores finais do FSI (RE) (Tsimilli-Michael e Strasser, 2010). Este parâmetro não responde apenas às perdas na atividade do FSII, mas também a danos relativos ao FSI (Xiang et al., 2013). Assim, reduções nas amplitudes da fase I-P da curva de fluorescência (dados não mostrados) indicam que o DH prolongado pode causar perda da

estrutura e função do FSI, resultando na inibição da doação de elétrons e redução dos aceptores finais do FSI, com consequente contribuição nas reduções de PI_{TOTAL} .

Através deste estudo, observou-se que ambas as espécies de orquídeas demonstraram-se vulneráveis ao DH prolongado, com declínio no CRA, fotodestruição dos pigmentos fotossintéticos e declínios nas atividades fotoquímicas, como observado pelas elevações das curvas V_T , ΔV_T , Bandas-L e K e alterações nos parâmetros do teste JIP, especialmente após 30 dias de DH. Porém, a melhor manutenção dos valores de CRA associado a menor perda do desempenho das reações fotoquímicas observados nas folhas da espécie C_3 , *M. spectabilis*, e maior comprometimento dos pseudobulbos indicam que esta espécie apresenta-se mais tolerante ao DH de longo prazo. O fator que diferencia uma espécie da outra está relacionado à fotorrespiração, que ocorre na espécie C_3 , mas principalmente ao papel dos pseudobulbos. Como observado previamente, os pseudobulbos são órgãos com limitada capacidade fotossintética em relação às folhas, e sua contribuição para o ganho de carbono na planta é mínima. Entretanto, há de se conhecer que a importância deste órgão está ligada a regulação do balanço hídrico no corpo das plantas de orquídeas, sendo determinante para a sobrevivência e capacidade de manutenção da espécie numa condição adversa em ambiente natural. No que tange a este argumento, o maior comprometimento dos pseudobulbos em *M. spectabilis*, observado pelos grandes decréscimos no CRA e atividade fotoquímica em relação a *C. warneri* indica que a espécie C_3 apresenta um órgão facilitador mais eficiente em condição de DH. Assim, permite-se afirmar que, a despeito dos pseudobulbos como órgãos facilitadores em espécies de orquídeas, *M. spectabilis* evidencia-se mais tolerante ao DH.

5. Referências Bibliográficas

- Ali M., Jensen C.R., Mogensen V.O., Andersen M.N., Henson I.E.** 1999. Root signalling and osmotic adjustment during intermittent soil drying sustain grain yield of field grown wheat. *Field Crops Research*. 62:35-52.
- Anjum S.A., Xie X.Y., Wang L.C., Saleem M.F., Man C., Lei W.** 2011. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research*. 9:2026-2032.
- Arnon D.I.** 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*. 24:1-15.

- Barrs H.D., Weatherley P.E.** 1962. A Re-Examination of the Relative Turgidity Technique for Estimating Water Deficits in Leaves. *Australian Journal of Biological Sciences*. 15:413-28.
- Benzing D.H.** 1990. Vascular epiphytes: general biology and related biota. Cambridge: Cambridge University Press.
- Bertamini M., Muthuchelian K., Nedunchezian N.** 2004. Photoinhibition of photosynthesis in sun and shade grown leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Photosynthetica*. 42:7-14.
- Björkman O., Demmig B.** 1987. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta*. 170:89–504.
- Blum A.** 2005. Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? *Australian Journal of Agricultural Research*. 56:1159-1168.
- Campos H., Trejo C., Peña-Valdivia C.B., García-Nava R., Conde-Martínez F.V., Cruz-Ortega M.D.R.** 2014. Photosynthetic acclimation to drought stress in *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck seedlings is largely dependent on thermal dissipation and enhanced electron flux to photosystem I. *Photosynthesis research*. 122:23-39.
- Chaitanya K.V., Jutur P.P., Sundar D., Ramachandra R.A.** 2003. Water stress effects on photosynthesis in different mulberry cultivars. *Plant Growth Regulation*. 40:75-80.
- Chen S., Kang Y., Zhang M., Wang X., Strasser R.J., Zhou B., Qiang S.** 2015. Differential sensitivity to the potential bioherbicide tenuazonic acid probed by the JIP-test based on fast chlorophyll fluorescence kinetics. *Environmental and Experimental Botany*. 112:1-15.
- Christen D., Schönmann S., Jermini M., Strasser R.J., Défago G.** 2007. Characterization and early detection of grapevine (*Vitis vinifera*) stress responses to esca disease by in situ chlorophyll fluorescence and comparison with drought stress. *Environmental and Experimental Botany*, 60: 504-514.
- Cockerham S.T., Leinauer B.** 2011. Turfgrass Water Conservation, University of California, Agriculture and Natural Resources, Davis, Calif, USA.
- Cushman J.C.** 2001. Crassulacean Acid Metabolism. A Plastic Photosynthetic Adaptation to Arid Environments. *Society*. 127:1439-48.

- Demetriou G., Neonaki C., Navakoudis E., Kotzabasis K.** 2007. Salt stress impact on the molecular structure and function of the photosynthetic apparatus - the protective role of polyamines. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1767:272-280.
- Demmig-Adams B., Adams W.W.III., Mattoo A.** 2006. Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment. *Advances in Photosynthesis and Respiration* (Series ed. Govindjee), vol. 21. Dordrecht: Springer.
- Drennan P.M., Nobel P.S.** 2000. Responses of CAM species to increasing atmospheric CO₂ concentrations. *Plant, Cell and Environment*. 23:767-781.
- Ennajeh M., Vadel A.M., Khemira H.** 2009. Osmoregulation and osmoprotection in the leaf cells of olive cultivars subjected to severe water deficit. *Acta Physiologiae Plantarum*. 31:711-721.
- Force L., Critchley C., Van Rensen J. J. C.** 2003. New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plant. 1. The effect of illumination on the fluorescence of the JIP-test. *Photosynthesis Research*. 78:1-33.
- Frank H.A., Young A.J., Britton G., Cogdell R.J.** 1999. The photochemistry of carotenoids. *Advances in Photosynthesis and Respiration* (Series ed., Govindjee), vol. 8. Dordrecht: Kluwer Academic (now Springer).
- Gholami M., Rahemib M., Kholdebarinc B., Rastegar S.** 2012. Biochemical responses in leaves of four fig cultivars subjected to water stress and recovery. *Scientia Horticulturae*. 148:109-117.
- Ghotbi-Ravandi A.A., Shahbazi M., Shariati M., Mulo P.** 2014. Effects of Mild and Severe Drought Stress on Photosynthetic Efficiency in Tolerant and Susceptible Barley (*Hordeum vulgare* L.) Genotypes. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 200:403-415, 2014.
- Gindaba J., Rozanov A., Negash L.** 2004. Response of seedlings of two *Eucalyptus* and three deciduous tree species from Ethiopia to severe water stress. *Forest Ecology and Management*. 201:119-129.
- Gomes M.T.G.G., Luz A.C., Santos M.R., Batitucci M.C.P., Silva D.M., Falqueto A.R.** 2012. Drought tolerance of passion fruit plants assessed by the OJIP chlorophyll *a* fluorescence transient. *Scientia Horticulturae*. 142:49-56.
- Gonçalves J.F.C., Silva C.E., Guimarães D.G., Bernardes R.S.** 2010. Análise dos transientes da fluorescência da clorofila *a* de plantas jovens de *Carapa guianensis* e de *Dipteryx odorata* submetidas a dois ambientes de luz. *Acta Amazonica*. 40:89-98.

- Haldiman P., Strasser R.J.** 1999. Effects of anaerobiosis as probed by the polyphasic chlorophyll a fluorescence rise kinetic in pea (*Pisum sativum* L.). *Photosynthesis Research*. 62:67-83.
- Haldrup A., Naver H., Scheller H.V.** 1999. The interaction between plastocyanin and photosystem I is inefficient in transgenic Arabidopsis plants lacking the PSI-N subunit of photosystem I. *The Plant Journal*. 17:689-698.
- Han S.K., Wagner D.** 2014. Role of chromatin in water stress responses in plants. *Journal of experimental botany*. 65:2785-99.
- He J., Teo L.C.D.** 2007. Susceptibility of green leaves and green flower petals of CAM *Dendrobium* cv. Burana Jade to high irradiance under tropical natural conditions. *Photosynthetica*. 45:214-221.
- He J., Tan B.H.G., Qin L.** 2011. Source-to-sink relationship between green leaves and green pseudobulbs of C3 orchid in regulation of photosynthesis. *Photosynthetica*. 49:209-218.
- He J., Norhafis H., Qin L.** 2013. Responses of Green Leaves and Green Pseudobulbs of CAM Orchid *Cattleya laeliocattleya* Aloha Case to Drought Stress. 2013:1-9.
- Hermans C., Smeyers M., Rodriguez R.M., Eyletters M., Strasser R.J., Delhaye J-P.** 2003. Quality assessment of urban trees: a comparative study of physiological characterisation, airborne imaging and on site fluorescence monitoring by the OJIP-test. *Journal of Plant Physiology*. 160:81-90.
- Herrera A.** 2009. Crassulacean acid metabolism and fitness under water deficit stress: if not for carbon gain, what is facultative CAM good for? *Annals of Botany*. 103:645-653.
- Hew C.S., Yong J.W.H.** 1997. *The Physiology of Tropical Orchids in Relation to the Industry*. – World Sci. Publ., Singapore.
- Hiscox J.D., Israelstam G.F.** 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany*. 57:1332-1334.
- IPCC: Summary for Policymakers.** – In: Stocker, T.F., Qin, D., Plattner, G.K., Tignor M.M.B., Allen S.K., Boschung J., Nauels A., Xia Y., Bex V., Midgley P.M. ed.): *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge and New York.
- Jedmowski C., Bayramov S., Brüggemann W.** 2014. Comparative analysis of drought stress effects on photosynthesis of Eurasian and North African genotypes of wild barley. *Photosynthetica*. 52:564-573.

- Jiang H.X., Chen L.S., Zheng J.G., Han S., Tang N. Smith B.R.** 2008. Aluminum-induced effects on Photosystem II photochemistry in Citrus leaves assessed by the chlorophyll a fluorescence transient. *Tree Physiology*. 28:1863-1871.
- Joliot P., Joliot A.** 2002. Cyclic electron transfer in plant leaf. *Plant Biology*. 99:10209-10214.
- Kakani V.G., Vu J.C.V., Allen J.R., L. H., Boote K.J.** 2011. Leaf photosynthesis and carbohydrates of CO₂-enriched maize and grain sorghum exposed to a short period of soil water deficit during vegetative development. *Journal of Plant Physiology*. 168:2169-2176.
- Kalaji H.M., Govindjee, Bosa K., Koscielniak J., Zuk-Golaszewskae K.** 2011. Effects of salt stress on photosystem II efficiency and CO₂ assimilation of two Syrian barley landraces. *Environmental and Experimental Botany*. 73:64-72.
- Ko J., Piccinni G.** 2009. Corn yield responses under crop evapotranspiration-based irrigation management. *Agricultural Water Management*. 96:799-808.
- Krause G.H., Somersalo S.** 1989. Fluorescence as a tool in photosynthesis research: application in studies of photoinhibition, cold acclimation and freezing stress. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. 323:281-293.
- Krause G.H., Weis E.** 1991. Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 42:313-49.
- Lambers H., Chapin III., F.S., Pons T.L.** 2008. *Plant Physiological Ecology*. 2 ed. Springer, 604 p.
- Lazár D., Llik P., Nauš, J.** 1997. An appearance of K-peak in fluorescence induction depends on the acclimation of barley leaves to higher temperatures. *Journal of Luminescence*. 72-74:595-596
- Lazár D.** 2006. The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. *Functional Plant Biology*. 33:9-30.
- Lichtenthaler H.K.** 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*. 148:350-382.
- Liu Y.B., Zhang T.G., Li X.R., Wang G.** 2007. Protective mechanism of desiccation tolerance in *Reaumuria soongorica*: Leaf abscission and sucrose accumulation in the stem. *Science China of Life Sciences*. 50:15-21.
- Liu C., Liu Y., Guo K., Fan D., Li G., Zheng Y., Yu L., Yang R.** 2011. Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six woody plant species in

- karst habitats of southwestern China. *Environmental and Experimental Botany*. 71:174-183.
- Long S.P., Humphries S., Falkowski P.G.** 1994. Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 45:633-662.
- Lüttge U.** 2004. Ecophysiology of Crassulacean Acid Metabolism (CAM). *Annals of Botany*. 93:629-52.
- Mahouachi J., Socorro A.R., Talon M.** 2006. Responses of papaya seedling (*Carica papaya* L.) to water stress and re-hydration: growth, photosynthesis and mineral nutrient imbalance. *Plant Soil*. 281:137-146.
- Martins J.P.R., Schimidt E.R., Alexandre R.S., Falqueto A.R., Otoni W.C.** 2015. Chlorophyll a fluorescence and growth of *Neoregelia concentrica* (Bromeliaceae) during acclimatization in response to light levels. In *Vitro Cellular e Developmental Biology – Plant*. 5pp.
- McDowell N., Pockman W.T., Allen C.D., Breshears D.D., Cobb N., Kolb T., Plaut J., Sperry J., West A., Williams D.G., Yezzer E.A.** 2008. Mechanisms of plant survival and mortality during drought: Why do some plants survive while others succumb to drought? *New Phytologist*. 178:719-39.
- Mehta P., Jajoo A., Mathur S., Bharti S.** 2010. Chlorophyll a fluorescence study revealing effects of high salt stress on Photosystem II in wheat leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*. Elsevier Masson SAS. 48:16-20.
- Minardi B.D., Paula A., Voytena L., Santos M., Randi Á.M., Randi M.** 2014. The Epiphytic Fern *Elaphoglossum luridum* (Fée) Christ. (Dryopteridaceae) from Central and South America: Morphological and Physiological Responses to Water Stress. 2014:1-9.
- Moreira A.S.F.P., Filho J.P.L., Zotz G., Isaias R.M.S.** 2009. Anatomy and photosynthetic parameters of roots and leaves of two shade-adapted orchids, *Dichaea cogniauxiana* Schltr. and *Epidendrum secundum* Jacq. *Flora*. 204:604-611.
- Öquist G., Chow W.S., Anderson J.M.** 1992. Photoinhibition of photosynthesis represents a mechanism for the long-term regulation of photosystem II. *Planta*. 186:450-460.
- Osmond C.B.** 1994. What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. In: Baker NR, Bowyer JR (eds) *Photoinhibition of photosynthesis from molecular mechanisms to the field*. Bios Scientific Publishers, Oxford, pp 1-24

- Oukarroum A., Madidi S.E., Schansker G., Strasser R.J.** 2007. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll *a* fluorescence OJIP under drought stress and re-watering. *Environmental and Experimental Botany*. 60:438-46.
- Oukarroum A., Schansker G., Strasser R.J.** 2009. Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotolerance analyzed using Chl *a* fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance. *Physiologia Plantarum*. 137:188-199.
- Peterhansel C., Maurino V.G.** 2011. Photorespiration Redesigned. *Plant Physiology*. 155:49-55.
- Pompelli M.F., Barata-Luís R., Vitorino H.S., Gonçalves E.R., Rolim E.V., Santos M.G., Almeida-Cortez J.S., Ferreira V.M. Lemos E.E., Endres L.** 2010. Photosynthesis, photoprotection and antioxidant activity of purging nut under drought deficit and recovery. *Biomass and Bioenergy*. 34:1207-1215.
- Pospíšil P., Skotnica J., Jan Nauš J.** 1998. Low and high temperature dependence of minimum F_0 and maximum F_M chlorophyll fluorescence in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1363:95-99.
- Rodrigues M.A., Matiz A., Cruz A.B., Matsumura A.T., Takahashi C.A., Hamachi L., Félix L.M., Pereira P.N., Latansio-Aidar S.R., Aidar M.P.M., Demarco D., Freschi L., Mercier H., Kerbaudy G.B.** 2013. Spatial patterns of photosynthesis in thin-and thick-leaved epiphytic orchids: Unravelling C_3 -CAM plasticity in an organ-compartmented way. *Annals of Botany*. 112:17-29.
- Schansker G., Tóth S.Z., Strasser R.J.** 2005. Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl *a* fluorescence rise OJIP. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1706:250-261.
- Silvera K., Neubig K.M., Whitten W.M., Williams N.H., Winter K., Cushman J.C.** 2010a. Evolution along the crassulacean acid metabolism continuum. *Functional Plant Biology*. 37:995-1010.
- Silvera K., Santiago L.S., Cushman J.C., Winter K.** 2010b. The incidence of crassulacean acid metabolism in Orchidaceae derived from carbon isotope ratios: A checklist of the flora of Panama and Costa Rica. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 163:194-222.
- Sinclair R.** 1983. Water Relations of Tropical Epiphytes. 34:1652-1663.
- Sperling O., Lazarovitch N., Schwartz A., Shapira O.** 2014. Effects of high salinity irrigation on growth, gas-exchange, and photoprotection in date palms (*Phoenix dactylifera* L., cv. Medjool). *Environmental and Experimental Botany*. 99:100-109.

- Stancato G.C., Mazzafera P., Buckeridge M.S.** 2001. Effect of a drought period on the mobilisation of non-structural carbohydrates, photosynthetic efficiency and water status in an epiphytic orchid. *Plant Physiology and Biochemistry*. 39:1009-1016.
- Stirbet A., Govindjee.** 2011. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll *a* fluorescence induction) and Photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. Elsevier B.V. 104:236-57.
- Strasser B.J., Strasser R.J.** 1995. Measuring fast fluorescence transient to address environmental questions: The JIP-test. In: P. Mathis (Ed.); *Photosynthesis: from Light to Biosphere*. Springer Netherlands. p.977-980.
- Strasser B.J.** 1997. Donor side capacity of Photosystem II probed by chlorophyll *a* fluorescence transients. *Photosynthesis Research*. 52:147-155.
- Strasser R.J., Stirbet A.D.** 1998. Heterogeneity of photosystem II probed by the numerically simulated chlorophyll *a* fluorescence rise (O–J–I–P). *Math. Comput. Simulat.* 48:3-9.
- Strasser R.J., Michael M.T., Srivastava A.** 2004. Analysis of the Chlorophyll *a* Fluorescence Transient. In: G. ;Govindje. Papageorgiou (Ed.); *Advances in Photosynthesis and Respiration Chlorophyll Fluorescence a Signature of Photosynthesis*. Kluwer Academic Publishers. p.321-362.
- Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Qiang S., Goltsev V.** 2010. Simultaneous in vivo recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1797, p. 1313-1326.
- Taiz L, Zeiger E.** 2013. *Fisiologia Vegetal*. 5^a ed. São Paulo.
- Tausz M., Hietz P., Briones O.** 2001. The significance of carotenoids and tocopherols in photoprotection of seven epiphytic fern species of a Mexican cloud forest. *Australian Journal of Plant Physiology*. 28:775-783.
- Tóth S.Z., Schanker G., Strasser R.J.** 2007. A non-invasive assay of the plastoquinone pool redox state based on the OJIP – transient. *Photosynthesis Research*. 93:193-203.
- Tsimilli-Michael M., Strasser R.J.** 2008. In vivo Assessment of Stress Impact on Plant's Vitality: Applications in Detecting and Evaluating the Beneficial Role of Mycorrhization on Host Plants. In: A. Varma (Ed.); *Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics*. Dordrecht: Springer. p. 679-703.

- Van-Heerden P.D.R., Swanepoel J.W., Krüger G.H.J.** 2007. Modulation of photosynthesis by drought in two desert scrub species exhibiting C₃-mode CO₂ assimilation. *Environmental and Experimental Botany*. 61:124-136.
- Venkateswarlu B., Shanker A.K., Shanker C., Maheswari M.** 2012. *Crop Stress and Its Management: Perspectives and Strategies*. Springer, Amsterdam, The Netherlands.
- Wang Z.X., Chen L., Ai J., Qin H.Y., Liu Y.X., Xu P.L., Jiao, Z.Q., Zhao, Y., Zhang, Q.T.** 2012. Photosynthesis and activity of photosystem II in response to drought stress in Amur Grape (*Vitis amurensis* Rupr.). *Photosynthetica*. 50:189-196.
- Waseem M., Ali A., Tahir M., Nadeem M.A., Ayub M., Tanveer A., Ahmad R., Hussain M.** 2011. Mechanisms of drought tolerance in plant and its management through different methods. *Continental Journal of Agricultural Science*. 5:10-25.
- Xiang M., Chen S., Wang L., Donga Z., Huang J., Zhang Y., Strasser R.J.** 2013. Effect of vulculic acid produced by *Nimbya alternantherae* on the photosynthetic apparatus of *Alternanthera philoxeroides*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 65:81-88
- Xin C.P., Yang J., Zhu X.G.** 2013. A model of chlorophyll a fluorescence induction kinetics with explicit description of structural constraints of individual photosystem II units. *Photosynthesis Research*. 117:339-354
- Xu D.H., Su P.X., Zhang R.Y., Li H.L., Zhao L., Wang G.** 2010. Photosynthetic parameters and carbon reserves of a resurrection plant *Reaumuria soongorica* during dehydration and rehydration. *Plant Growth Regulation*. 60:183-190.
- Xu D.H., Fang X.W., Su P.X., Wang G.** 2012. Ecophysiological responses of *Caragana korshinskii* Kom. under extreme drought stress: Leaf abscission and stem survives. *Photosynthetica*. 50:541-548.
- Yusuf M.A., Kumar D., Rajwanshi R., Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Govindjee, Sarin N.B.** 2010. Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. Elsevier B.V. 1797:1428-1438.
- Zhang C., Zhan D.X., Luo H.H., Zhang Y.L., Zhang W.F.** 2016. Photorespiration and photoinhibition in the bracts of cotton under water stress. *Photosynthetica*. 54:12-18.
- Zotz G., Hietz P.** 2001. The physiological ecology of vascular epiphytes: current knowledge, open questions. *Journal of experimental botany*. 52:2067-2078.

CONCLUSÕES GERAIS

- Declínios do CRA e concentração de pigmentos fotossintéticos, elevação dos transientes OJIP e alterações nos parâmetros do teste JIP indicam que as duas espécies são vulneráveis ao DH;
- A similaridade do decréscimo das atividades ao redor do FSI para as duas espécies indica que distinto comportamento fotoquímico entre estas pode estar restrito apenas ao FSII;
- Fortes declínios observados em F_v/F_m e PI_{TOTAL} e elevações em F_0 indicam a ocorrência de fotoinibição crônica nas duas espécies;
- Elevação na concentração de pigmentos carotenoides e dos índices de dissipação (DI_0/RC) indicam a atuação de mecanismos fotoprotetores diante do DH nas duas espécies;
- Melhor manutenção do status hídrico associado a menores perdas do desempenho fotoquímico observados nos transientes OJIP e parâmetros do teste JIP nas folhas de *M. spectabilis*, indicam maior tolerância desta espécie ao DH;
- Melhor manutenção do status hídrico foliar e atividade fotoquímica nas folhas da espécie *C₃*, *M. spectabilis*, associados a um maior comprometimento dos pseudobulbos, indicam que estes órgãos podem estar atuando como importantes facilitadores na manutenção das folhas nesta espécie;
- Menores valores nas concentrações dos pigmentos fotossintéticos e as supressões observadas nas curvas OJIP durante todo o experimento revelam que em ambas as espécies os pseudobulbos apresentam capacidade fotossintética limitada em relação às folhas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O *status* hídrico, a concentração de pigmentos fotossintéticos e a fluorescência transiente da clorofila *a* mostraram-se bastante eficientes na avaliação de respostas ecofisiológicas em folhas e pseudobulbos de plantas de orquídeas CAM e C₃ sob condição de DH. O uso dessas ferramentas possibilitou caracterizar fisiologicamente os órgãos das duas espécies estudadas em termos de tolerância ao estresse hídrico.

No primeiro experimento, onde parâmetros fotossintéticos foram medidos, por meio da fluorescência da clorofila *a*, a cada 15 dias nas folhas das orquídeas, observou-se que ambas as espécies foram sensíveis ao déficit hídrico. Isto pode ser constatado pela presença de bandas nas fases O-J e J-I (curvas V_T e ΔV_T) evidenciando uma limitação no fluxo de elétrons como resultado do acúmulo de formas reduzidas dos aceptores do FSII, presença das bandas-L e K que evidenciam perda da energia de conectividade entre as unidades do FSII e inativação do complexo de evolução do oxigênio, além de decréscimos na taxa global de redução do *pool* de aceptores de elétrons do FSI, como observado pelas curvas negativas na fase I-P em ambas as espécies. Porém, estes efeitos foram observados de maneira mais expressiva nas folhas da espécie CAM, *C. warneri*, indicando que esta apresenta desvantagem em relação a *M. spectabilis* em termos de eficiência no uso de energia pelo FSII sob DH.

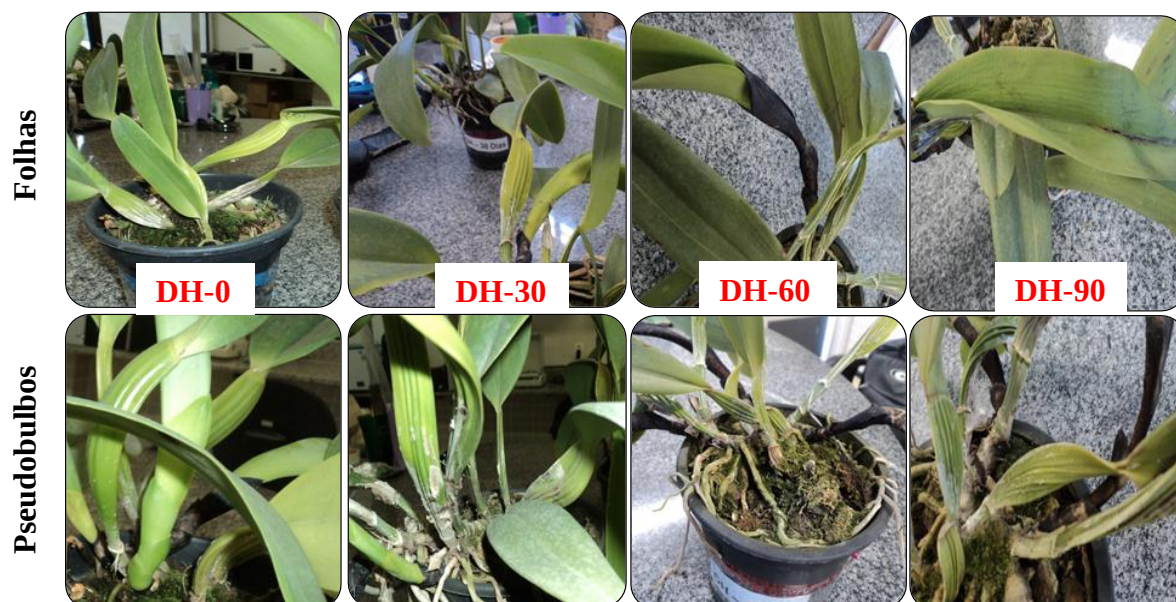
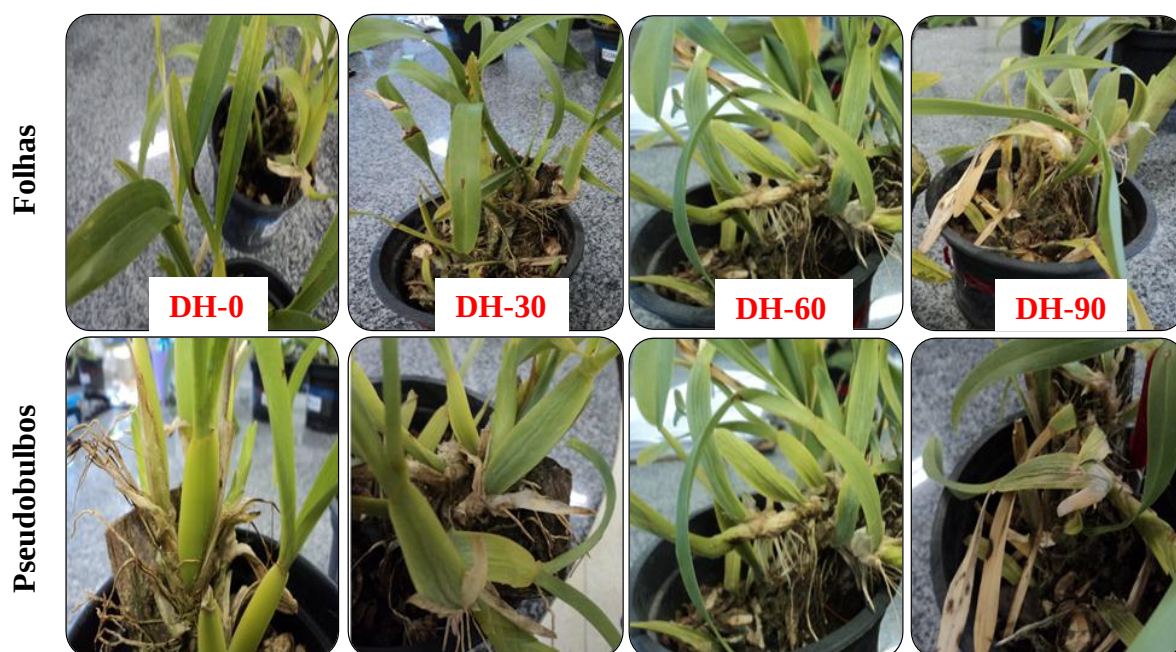
O segundo experimento, que avalia, além dos parâmetros da fluorescência da clorofila *a*, o CRA e concentração de pigmentos fotossintéticos em folhas e pseudobulbos a cada 30 dias de DH, confirmam os efeitos do estresse fisiológico sobre os dois órgãos nas espécies de orquídeas. Declínio no CRA, fotodestruição dos pigmentos fotossintéticos e declínios nas atividades fotoquímicas, como observado pelas elevações das curvas V_T , ΔV_T , Bandas-L e K e alterações nos parâmetros do teste-JIP, ocorreram em folhas e pseudobulbos das espécies, evidenciando a vulnerabilidade de ambas ao DH. Além disso, as duas espécies foram capazes de apresentar mecanismos fotoprotetores contra o estresse, com elevação na concentração de pigmentos carotenoides e dos índices de dissipação de energia na forma de calor (DI_0/RC). Mas declínios em F_v/F_m e PI_{TOTAL} e elevações em F_0 indicam a ocorrência de fotoinibição crônica, sugerindo que os mecanismos fotoprotetores não são suficientes para evitar danos severos ao aparato fotoquímico nos órgãos das orquídeas.

Vale destacar, porém, que ambos os experimentos evidenciaram a ocorrência de danos às reações fotoquímicas com menor intensidade nas folhas da espécie C₃, *M. spectabilis*. A explicação para isso pode estar relacionada ao papel da fotorrespiração e, principalmente à capacidade da espécie C₃ em manter mais elevado o CRA nas folhas, como evidenciado no

segundo experimento. Isto, por sua vez, pode estar associado à maior eficiência na mobilização de água das folhas senescentes, e, principalmente, dos pseudobulbos para as folhas jovens, uma vez que o CRA decresce mais rapidamente nos pseudobulbos e lentamente nas folhas de *M. spectabilis* em relação à *C. warneri*. O maior comprometimento do pseudobulbo indica que este órgão pode estar atuando como importante facilitador, mantendo elevado o CRA das folhas e permitindo melhor manutenção das atividades fotoquímicas. Neste sentido, maior tolerância ao DH pode ser atribuída à *M. spectabilis*, a despeito da maior susceptibilidade de espécies com metabolismo fotossintético C_3 descrita na literatura.

Os pseudobulbos são eficientes órgãos no armazenamento de água e carboidratos, e o fato de desempenharem a função facilitadora de maneira mais eficiente em *M. spectabilis*, pode estar relacionada a um ajuste osmótico mais preciso entre estes e as folhas. Um maior acúmulo de solutos nas folhas reduz o seu potencial hídrico e demanda mais água dos pseudobulbos. Juntamente com a água, carboidratos de estoque são mobilizados para as folhas reduzindo ainda mais seu potencial hídrico. Se essa dinâmica ocorre de maneira mais efetiva em *M. spectabilis*, encontra-se a chave para explicar a maior manutenção do CRA e eficiência fotossintética nesta espécie. Com isto, pode-se considerar que os pseudobulbos de *M. spectabilis* assumem uma importância maior, comparado aos de *C. warneri*, no estabelecimento e sobrevivência das plantas em um ambiente natural, sujeito a restrições hídricas. Para melhor explicar a dinâmica de mobilização entre folhas e pseudobulbos nas duas espécies, além das influências do ajuste osmótico neste papel, faz-se necessária ainda a análise de carboidratos solúveis (como sacarose, glicose e frutose) e amido nesses dois órgãos nas duas espécies submetidas ao DH de longo prazo.

ANEXO

Cattleya warneri*Miltonia spectabilis*

Características morfológicas apresentadas por folhas e pseudobulbos de orquídeas (*Cattleya warneri* e *Miltonia spectabilis*) submetidas ao déficit hídrico (DH) por 90 dias.