



RESPOSTAS FISIOLÓGICAS ENVOLVIDAS NA TOLERÂNCIA À RESTRIÇÃO HÍDRICA E ESTRESSE LUMINOSO EM ORCHIDACEAE EPÍFITAS

THAIS ARRUDA COSTA JOCA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Área de concentração Fisiologia e Bioquímica Vegetal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

RESPOSTAS FISIOLÓGICAS ENVOLVIDAS NA TOLERÂNCIA
AO DÉFICIT HÍDRICO E ESTRESSE LUMINOSO EM
ORCHIDACEAE EPÍFITAS

THAIS ARRUDA COSTA JOCA

PROF. DR. LUIZ FERNANDO ROLIM DE ALMEIDA

ORIENTADOR

PROF^a. DR^a. ANA SILVIA FRANCO PINHEIRO MOREIRA

CO - ORIENTADORA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Área de concentração Fisiologia e Bioquímica Vegetal.

BOTUCATU – SP

2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Joca, Thais Arruda Costa.

Respostas fisiológicas envolvidas na tolerância ao déficit hídrico e estresse luminoso em Orchidaceae epífitas / Thais Arruda Costa Joca. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Luiz Fernando Rolim de Almeida

Coorientador: Ana Silvia Franco Pinheiro Moreira

Capes: 20303009

1. Orquídea. 2. Balanço hidrológico. 3. Fotossíntese.
4. Desidratação (Hídrica). 5. Plantas - Efeito da luz.

Palavras-chave: Balanço hídrico; Gomesa fleuxosa; Hábito epifítico; *Oncidium sphacelatum*; Rendimento fotossintético.

À minha avó, Irma Marques Joca (*in memoriam*),
dona do maior orgulho, incentivo
e amor do mundo, dedico.

AGRADECIMENTOS

Embora pareça clichê, agradecer à Deus por me trazer até aqui, de mãos dadas, lado a lado, não é exagero. Gratidão à Ele que não se apresenta como pessoa, mas em tudo o que vejo, toco e acredito haver de melhor no mundo. Pelas lutas silenciosas e desafios travados ao longo da vida e em especial, nestes quatro anos, muito obrigada, meu senhor.

Agradeço à CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Departamento de Botânica, Instituto de Biociências de Botucatu e Universidade Estadual Paulista (UNESP) pelas instalações e disponibilização do material necessário para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), pela oportunidade de me vincular à pesquisa na instituição e por todo o apoio nos procedimentos que se fizeram pertinentes nas etapas do doutorado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Fernando Rolim de Almeida, além dos mais sinceros agradecimentos por tanto me ensinar sobre fisiologia vegetal, minha admiração. Admiração pelo tempo dedicado à pesquisa, ensino e administrativo, sem perder o entusiasmo pela ciência e o apoio aos seus orientados. Você me ensinou que é preciso se divertir com os dados e com o processo de doutoramento, muito além do resultado final. Por tudo isso, muito obrigada.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Ana Silvia Franco Pinheiro Moreira, pela parceria desde os tempos de mestrado, em que me abriu portas, acolheu e ensinou muito do que sei da pesquisa científica, da paixão e responsabilidade que carregamos ao falar de Orchidaceae. Obrigada pelos conselhos (pessoais e profissionais), e por me apoiar ao longo de toda trajetória.

Aos professores Dr. Vladimir Eliodoro Costa e Dr. Fernando Broetto, por todas as conversas edificantes e por terem aberto as portas do Centro de Isótopos Estáveis e Laboratório de Química e Bioquímica, respectivamente, me auxiliando em análises essenciais para o produto final do trabalho.

Ao Prof. Dr. João Domingos Rodrigues, Dr. Sérgio Akira Adachi e Prof. Dr. João Paulo Rodrigues Alves Delfino Barbosa, pelas valiosas contribuições na banca de qualificação.

Aos companheiros de caminhada da ecofisiologia, Angélica Lino, Angelo Bertholdi, Danilo Miralha, Felipe Yamashita, Jerônimo Schultz, Livia Leite, Luan Vitto, Luís Paulo, Rafael Guerreiro, Tatiana Tintino, Thayssa Schley e Victor Guimarães - Mariusso, que desde o apoio técnico, intelectual e não menos importante, emocional, me auxiliaram nessa jornada e tornaram os dias mais leves e muito, muito alegres.

Aos amigos de departamento, que permaneceram presentes até aqui ou que passaram por algum período durante estes 4 anos e deixaram grandes marcas, Bruna Helena, Daiane

Maia, Camila Vaz, Janaína Oliveira, Juan Nicolai, July Izquierdo, Marília Caixeta, Natália Fernandes, Luiz Ricardo, Stefany Cristina, Ivanilde Rodrigues, Wand Vargas. Ao Felipe Giroto, obrigada por ter me acompanhado nas inúmeras medidas, metodologias laboratoriais e discussões fisiológicas durante todo o desdobramento do projeto, você me salvou incontáveis vezes.

À turma egressa de 2016, que se tornou minha família de Botucatu, Fernanda Helena, Katiane Reis, Lorena Bueno, Luiza Alves, Marília Quinalha e Tayeme Piva, obrigada pelos momentos de descontração, desabafos e união. Vocês não sabem o peso que têm nessa conquista. Em especial à Diana Pacheco, que dividiu além da amizade de pós-graduação: nosso lar em Botucatu, sendo uma das pessoas com quem mais aprendi e aprendo, todos os dias.

Aos amigos João Custódio e Luisa Gouveia pela ajuda com estatística, discussão de dados e processamento do material de anatomia vegetal, no Laboratório de Anatomia e Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

À equipe “Lunare” em nome da querida Valquiria Gavlak, que me acolheu no primeiro ano em Botucatu enquanto aguardava a bolsa de doutorado, me oferecendo muito além de condições de trabalho para me manter na cidade, mas um laço terno de amizade que com toda certeza perdurará.

Às amigas de longa data, Liliane, Jéssica, Roberta e Ana Luísa, por sempre me aguardarem em cada ida à Uberaba, renovando minhas energias e oferecendo um colo que só vocês poderiam, obrigada.

À minha mãe, Ana Claudia Arruda, honestamente, me faltam palavras. Chegar até aqui é uma conquista a quatro mãos, com toda certeza. Obrigada por sempre me incentivar mesmo quando eu duvidava, e por me apoiar para que nunca me faltasse nada nessa caminhada. Lembro com carinho quando se propôs a trabalhar em três empregos para ajudar a me manter...e as inúmeras vezes que se renunciou para que eu tivesse o mais importante na vida: estudo. Obrigada, Deus queira que eu me torne, um dia, pelo menos como metade do que você é.

Ao meu pai Mário César, meus padrinhos Maria Cristina e Claudirce, meus tios Carmen e Milson, meus primos Pedro Henrique, João Vitor e Lucas Henrique, obrigada por me apoiarem sem medidas, e por serem a melhor família que eu poderia ter.

Aos meus avós, Irma Marques Joca (*in memoriam*) e Mário Joca. Ver o orgulho estampado no rosto de vocês sempre me deu muita força para encarar a distância física que nos separava. Perder minha segunda mãe no meio do percurso foi uma tristeza muito grande, uma dor inexplicável...mas a presença que se fez através do meu avô e à memória dela, que nunca poupou esforços para me ver feliz, me fez seguir a diante. Sua neta será doutora vó, e professora, como a senhor falava, com tanto orgulho.

Ao meu namorado, Leandro Rosa, companheiro de 10 anos que me entende e conhece melhor que eu mesma. Tantas vezes mesmo querendo que eu ficasse me disse “vai lá, estou com você”. Você não sabe o quanto seu apoio foi importante para mim, e o quanto tudo o que passamos me (nos) fortaleceu. Obrigada por me permitir voar e voar comigo.

A todos que colaboraram para essa conquista, meu eterno muito obrigada!

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

- A:** taxa de assimilação de CO₂
- A/C_i:** eficiência da enzima de carboxilação
- AHC:** análise hierárquica de cluster
- ATP:** trifosfato de adenosina
- CAM:** metabolismo ácido das crassuláceas
- C_i:** concentração interna de CO₂
- Chl *a*:** clorofila a
- CRA:** conteúdo relativo de água
- DFFFA:** densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos
- DPV:** déficit de pressão de vapor
- E:** taxa de transpiração
- EROs:** espécies reativas de oxigênio
- ETR:** taxa de transporte de elétrons
- EUA:** eficiência no uso da água
- g_s:** condutância estomática
- IVN:** índice de variação normalizada
- MD:** período meio-dia (*midday*)
- MF:** massa fresca
- MLG:** modelos lineares generalizados
- MS:** massa seca
- MT:** massa túrgida
- NADPH:** fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
- NaOH:** hidróxido de sódio
- NPQ:** dissipação não - fotoquímica
- ¹O₂:** oxigênio singlete
- O₂^{•-}:** radicais superóxido
- PCA:** análise de componentes principais
- PD:** período pré-manhã (*predawn*)

PEPC: fosfoenolpiruvato carboxilase

PSII: fotossistema II

Φ PSII: rendimento quântico efetivo do fotossistema II

qP: dissipação fotoquímica

R.Br.: Robert Brown

TBA: ácido tiobarbitúrico

TCA: ácido tricloroacético

UR: umidade relativa

Ψ_w : potencial da água

$\delta^{13}\text{C}$: composição isotópica do carbono

1º EV_{DH}: 1º Evento de Déficit Hídrico

2º EV_{DH}: 2º Evento de Déficit Hídrico

1º EV_{Luz}: primeiro evento de exposição à luz

2º EV_{Luz}: segundo evento de exposição à luz

LISTA DE FIGURAS

(Introdução Geral)

Figura 1. Espécies de Orchidaceae pertencentes à tribo Maxillarieae e subtribo Oncidiinae. (A) *Gomesa flexuosa* Sims e (B) *Oncidium sphacelatum* Lindley, evidenciando a morfologia floral distinta dentre as espécies.....21

(Capítulo 1)

Figura 1. Folhas de *Gomesa flexuosa* e *Oncidium sphacelatum*, duas orquídeas epífitas da subtribo Oncidiinae. (A) Detalhe de folhas delgadas de *G. flexuosa* e (B) *O. sphacelatum*. (C) e (D) Cortes transversais de folhas de *G. flexuosa* (C) e *O. sphacelatum* (D) evidenciando células epidérmicas isodiamétricas, mesofilo homogêneo com poucos espaços intercelulares e com feixes de fibras próximos à face abaxial. EP_{Abaxial} = Epiderme Abaxial; EP_{Adaxial} = Epiderme Adaxial; FF= Feixes de fibras; FV = Feixe vascular; HIP = hipoderme. Barra = 200 µm.....36

Figura 2. Região de transição entre folhas e pseudobulbos de *Gomesa flexuosa* e *Oncidium sphacelatum*, duas orquídeas epífitas da subtribo Oncidiinae. (A) Secção longitudinal de *G. flexuosa* e (B) secção radial de *O. sphacelatum* evidenciando a presença de aerênquimas associados aos feixes vasculares e (C) Detalhe de aerênquima associado a fibras do floema em *G. flexuosa*. (D) Pseudobulbo de *G. flexuosa* evidenciando grande quantidade de aerênquima disperso por todo o órgão. Ae = Aerênquima; F = Floema.....37

Figura 3. Discriminação isotópica foliar ($\delta^{13}\text{C}_{\text{Folha}}$) e acidez titulável foliar ($\Delta\text{H}^+_{\text{Folha}}$ noite e manhã) de *G. flexuosa* e *O. sphacelatum* após 60 dias de experimento. T1 refere-se a plantas submetidas à suspensão total de irrigação por todo o experimento e alta DFFFA e T2 refere-se ao tratamento com plantas mantidas hidratadas por todo o experimento, sob baixa DFFFA. (*) representa diferença significativa na acidez titulável acumulada no período noite/dia, com $P < 0.001$38

Figura 4. Discriminação isotópica do pseudobulbo ($\delta^{13}\text{C}_{\text{Pseudobulbo}}$) e acidez titulável ($\Delta\text{H}^+_{\text{Pseudobulbo}}$ noite e manhã) de *G. flexuosa* e *O. sphacelatum* após 60 dias de experimento. T1 refere-se a plantas submetidas à suspensão total de irrigação por todo o experimento e alta DFFFA e T2 refere-se ao tratamento com plantas mantidas hidratadas por todo o experimento, sob baixa DFFFA. (*) representa diferença significativa na acidez titulável acumulada no período noite/dia, com $P < 0.001$39

Figura 5. Acidez titulável para os órgãos vegetativos de *G. flexuosa* e *O. sphacelatum* após 60 dias de experimento e para as diferentes concentrações de ácido málico preparadas. T1 refere-se a plantas submetidas a suspensão total de irrigação por todo o experimento e alta DFFFA. T2 refere-se se ao tratamento com plantas mantidas hidratadas por todo o experimento, sob baixa DFFFA. F: folha. PSE: pseudobulbo.....40

(Capítulo 2)

Fig 1 Desenho esquemático de delineamento experimental. (A) Grupo de plantas de 1º Evento de Déficit Hídrico (1º EV_{DH}) com plantas sempre expostas ao fornecimento hídrico ao longo de 180 dias de experimento (T1), e plantas que passaram por restrição hídrica nos 60 dias finais (T2). (B) Grupo 2º Evento de Déficit Hídrico (2º EV_{DH}), composto por plantas expostas 180 ao fornecimento hídrico (T1), e plantas submetidas aos 60 dias iniciais do experimento à restrição hídrica, com posterior período de recuperação com fornecimento hídrico nos 60 dias seguidos, e submetidas à nova restrição hídrica nos 60 dias finais do experimento (T2). Quadro vermelho indica período em que foram realizadas as coletas das relações hídricas, quantificação dos teores de lipoperóxidos foliar e avaliações de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* foliar. 1º EV_{DH} = 1º Evento de Déficit Hídrico; 2º EV_{DH} = 2º Evento de Déficit Hídrico.....53

Fig 2 Dendograma resultante do agrupamento hierárquico cluster (AHC) do 1º Evento de Déficit Hídrico (1º EV_{DH}) e 2º Evento de Déficit Hídrico (2º EV_{DH}), para o controle (T1) e restrição hídrica (T2), em *G. flexuosa*. Utilizamos a medida do coeficiente de correlação de Pearson com coeficiente cofenético (-0.801) para a obtenção da similaridade múltipla.....60

Fig 3 Dendograma resultante do agrupamento hierárquico cluster (AHC) do 1º Evento de Déficit Hídrico (1º EV_{DH}) e 2º Evento de Déficit Hídrico (2º EV_{DH}), para o controle (T1) e restrição hídrica (T2), em *O. sphacelatum*. Utilizamos a medida do coeficiente de correlação de Pearson com coeficiente cofenético (-0.801) para a obtenção da similaridade múltipla.....62

Fig 4 Diagrama biplot de ordenação das variáveis e suas observações nas duas primeiras componentes principais F1 e F2. Análise dos componentes principais (PCA) do 1º Evento de Déficit Hídrico (1º EV_{DH}) e 2º Evento de Déficit Hídrico (2º EV_{DH}), para o controle (T1) e restrição hídrica (T2), em *G. flexuosa*. Os quadrados representam os agrupamentos anteriores obtidos no agrupamento hierárquico cluster (AHC), sendo: quadrado azul: grupo I; quadrado vermelho: grupo II; quadrado verde: grupo III.....64

Fig 5 Diagrama biplot de ordenação das variáveis e suas observações nas duas primeiras componentes principais F1 e F2. Análise dos componentes principais (PCA) do 1º Evento de Déficit Hídrico (1º EV_{DH}) e 2º Evento de Déficit Hídrico (2º EV_{DH}), para o controle (T1) e restrição hídrica (T2), em *O. sphacelatum*. Os quadrados representam os agrupamentos anteriores obtidos no agrupamento hierárquico cluster (AHC), sendo: quadrado azul: grupo I; quadrado verde: grupo II.....65

(Capítulo 3)

Figura 1. Índice de variação normalizada (IVN) das variáveis de fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas e relações hídricas para *Gomesa flexuosa*, relacionando o tratamento com água e luz comparado ao controle (água e sombra, representado na linha pontilhada horizontal) no primeiro e segundo evento de exposição à alta luminosidade.....85

Figura 2. Índice de variação normalizada (IVN) das variáveis de fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas e relações hídricas para *Oncidium sphacelatum*, relacionando o tratamento com água e luz comparado ao controle (água e sombra, representado na linha pontilhada horizontal) no primeiro e segundo evento de exposição à alta luminosidade.....86

Figura 3. Índice de variação normalizada (IVN) das variáveis de fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas e relações hídricas para *Gomesa flexuosa*, relacionando o tratamento com restrição hídrica e luz comparado ao controle (restrição hídrica e sombra, representado na linha pontilhada horizontal) no primeiro e segundo evento de exposição à alta luminosidade.....88

Figura 4. Índice de variação normalizada (IVN) das variáveis de fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas e relações hídricas para *Oncidium sphacelatum*, relacionando o tratamento com restrição hídrica e luz comparado ao controle (restrição hídrica e sombra, representado na linha pontilhada horizontal) no primeiro e segundo evento de exposição à alta luminosidade.....89

LISTA DE TABELAS

(Capítulo 1)

Tabela 1. Acidez titulável expressa a partir de diferentes concentrações de Ácido Málico.....34

Tabela 2. Condutância estomática em folhas de *G. flexuosa* e *O. sphacelatum* às 9:00h (dia) e as 19:00h (noite) para plantas submetidas a suspensão total de irrigação por todo o experimento e alta DFFFA (T1); e plantas mantidas hidratadas por todo o experimento sob baixa DFFFA (T2).....38

(Capítulo 2)

Tabela 1. Comparação das relações hídricas de *G. flexuosa* e *O. sphacelatum* (midday) aos 180 dias nas duas condições experimentais, em plantas que passaram uma única vez pelo déficit hídrico e em plantas que foram submetidas duas vezes ao déficit hídrico.....57

Tabela 2. Comparação das variáveis de fluorescência da clorofila *a* de *G. flexuosa* e *O. sphacelatum* aos 180 dias nas duas condições experimentais, em plantas que passaram uma única vez pelo déficit hídrico e em plantas que foram submetidas duas vezes ao déficit hídrico.....58

Tabela 3. Comparação das variáveis de Trocas Gasosas de *G. flexuosa* e *O. sphacelatum* aos 180 dias nas duas condições experimentais, em plantas que passaram uma única vez pelo déficit hídrico e em plantas que foram submetidas duas vezes ao déficit hídrico.....59

Tabela 4. Componentes principais F1 e F2. Cont. (%) são as contribuições percentuais das variáveis e R as correlações entre as variáveis nas componentes principais (F1 e F2). Negrito representa as maiores contribuições percentuais dentre as variáveis.....61

Tabela 5. Componentes principais F1 e F2. Cont. (%) são as contribuições percentuais das variáveis e R as correlações entre as variáveis nas componentes principais (F1 e F2). Negrito representa as maiores contribuições percentuais dentre as variáveis.....63

(Capítulo 3)

Tabela 1. Índice de variação normalizada (IVN) das variáveis de fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas e relações hídricas para *Gomesa flexuosa* no tratamento com disponibilidade hídrica e 800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA comparado ao controle (disponibilidade hídrica e 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$

DFFFA) no primeiro e segundo evento de exposição à alta luminosidade.....85

Tabela 2. Índice de variação normalizada (IVN) das variáveis de fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas e relações hídricas para *Oncidium sphacelatum* no tratamento com disponibilidade hídrica e 800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA comparado ao controle (disponibilidade hídrica e 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA) no primeiro e segundo evento de exposição à alta disponibilidade.....87

Tabela 3. Índice de variação normalizada (IVN) das variáveis de fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas e relações hídricas para *Gomesa flexuosa* no tratamento com restrição hídrica e 800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA comparado ao controle (restrição hídrica e 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA) no primeiro e segundo evento exposição à alta luminosidade.....88

Tabela 4. Índice de variação normalizada (IVN) das variáveis de fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas e relações hídricas para *Oncidium sphacelatum* no tratamento com restrição hídrica e 800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA comparado ao controle (restrição hídrica e 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA) no primeiro e segundo evento de exposição à alta luminosidade.....90

Sumário

RESUMO	17
ABSTRACT	18
INTRODUÇÃO GERAL	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
MAPA CONCEITUAL DA TESE	26
CAPÍTULO 1	28
Atividade fotossintética em folhas e pseudobulbos de duas espécies de orquídeas epífitas da subtribo Oncidiinae sob variações de condições hídricas e luminosas	28
RESUMO	28
ABSTRACT	29
INTRODUÇÃO	30
MATERIAL E MÉTODOS	32
<i>Material vegetal e delineamento experimental</i>	32
<i>Análises estruturais</i>	32
<i>Condutância Estomática (mmol/m²s)</i>	33
<i>Discriminação isotópica de carbono ($\delta^{13}C$)</i>	33
<i>Determinação da Variação Diurna dos Ácidos Orgânicos (Acidez Titulável)</i>	33
<i>Análises dos dados</i>	34
RESULTADOS	34
<i>Análises estruturais</i>	34
<i>Condutância estomática (mmol/m²s)</i>	37
<i>Determinação da razão isotópica ($\delta^{13}C$) e da variação diurna dos ácidos orgânicos (ΔH^+)</i>	38
<i>Comparação da titulação das diferentes concentrações de ácido málico com a titulação teciduais das duas espécies</i>	39
DISCUSSÃO	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
CAPÍTULO 2	48
Memória fisiológica em resposta ao estresse hídrico em duas espécies da subtribo Oncidiinae (Orchidaceae)	48
RESUMO	48
ABSTRACT	49
INTRODUÇÃO	50
MATERIAL E MÉTODOS	51
<i>Material vegetal</i>	51
<i>Delineamento experimental</i>	52
<i>Relações hídricas</i>	53
<i>Conteúdo Relativo de Água (CRA)</i>	53

<i>Potencial hídrico (Ψ_w, MPa)</i>	54
<i>Quantificação dos teores de lipoperóxidos</i>	54
<i>Fluorescência da Clorofila a</i>	54
<i>Medição de trocas gasosas</i>	55
<i>Análise de Dados</i>	55
RESULTADOS	56
<i>Relações hídricas</i>	56
<i>Fluorescência da Clorofila a e quantificação dos teores de lipoperóxidos</i>	56
<i>Trocas gasosas</i>	56
<i>Conjunto de características avaliadas por Agrupamento Hierárquico Cluster (AHC) e Análise de componentes principais (PCA)</i>	60
DISCUSSÃO	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
CAPÍTULO 3	77
Desempenho de <i>Gomesa flexuosa</i> Sims e <i>Oncidium sphacelatum</i> Lindley em diferentes regimes luminosos sob influência de fornecimento e restrição hídrica	77
RESUMO	77
ABSTRACT	78
INTRODUÇÃO	79
MATERIAL E MÉTODOS	80
<i>Material vegetal e delineamento experimental</i>	80
<i>Relações hídricas</i>	81
<i>Conteúdo Relativo de Água (CRA)</i>	81
<i>Potencial químico da água (Ψ_w, MPa)</i>	82
<i>Fluorescência da Clorofila a</i>	82
<i>Medição de trocas gasosas</i>	82
<i>Análise de Dados</i>	83
RESULTADOS	84
<i>Influência da luz em tratamentos com disponibilidade hídrica</i>	84
<i>Influência da luz em tratamentos com restrição hídrica</i>	87
DISCUSSÃO	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
ANEXOS	99
CAPÍTULO 4	111
“O cultivo de orquídeas e as exigências de luz e água”	111
CONSIDERAÇÕES FINAIS	112

JOCA, T. A. C. **Respostas fisiológicas envolvidas na tolerância a restrição hídrica e estresse luminoso em Orchidaceae epífitas.** 2020. 113p. TESE (DOUTORADO) –INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

RESUMO

Orquídeas epífitas estão expostas a diferentes microclimas, que são caracterizados pela alta irradiância imposta ao dossel e baixa irradiância em plantas situadas no sub-bosque. Além disso, este grupo de plantas frequentemente lida com a restrição hídrica. Na produção comercial, o estabelecimento de orquídeas é em quase sua totalidade limitada pela distribuição e intensidade destes mesmos fatores disponibilizados em casas de vegetação. *Gomesa flexuosa* Sims e *Oncidium sphacelatum* Lindley pertencem à subtribo Oncidiinae, e quando hibridizadas dão origem a O. ‘Aloha’ (uma orquídea CAM facultativa e importante híbrida comercial). O objetivo deste estudo foi elucidar a performance fotossintética e as estratégias de balanço hídrico de *G. flexuosa* e *O. sphacelatum* sob condições de estresse hídrico e luminoso, focando tanto nas diferenças interespecíficas como nas funções dos diferentes órgãos em um mesmo indivíduo. Para isso, analisamos trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, quantificação de lipoperóxidos, discriminação isotópica, acidez titulável, conteúdo relativo de água e potencial hídrico em tecidos foliares, de pseudobulbos e raízes, em diferentes tratamentos envolvendo restrição hídrica e variação luminosa. Depois de restrição hídrica por 60 dias, *G. flexuosa* apresentou conversão de metabolismo C3 para CAM, o que deu subsídios para uma melhor performance das trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, mecanismo de fotoproteção e relações hídricas. Quando submetida a dois eventos de restrição hídrica, mostrou capacidade de armazenar informações de experiência prévias, apresentando memória fisiológica. Ao avaliar como a restrição hídrica somada ao estresse luminoso influencia nas respostas fisiológicas de ambas as espécies por 180 dias, mais uma vez *G. flexuosa* apresentou melhor performance e possibilidade de rustificação pela luz, enquanto *O. sphacelatum* não se rustificou e não apresentou memória fisiológica. Estes dados podem contribuir para programas de conservação de espécies nativas, além de nortear estratégias de cultivo para fins comerciais.

PALAVRAS CHAVE: *Gomesa flexuosa*, *Oncidium sphacelatum*, balanço hídrico, hábito epifítico, rendimento fotossintético

Physiological responses involved in water restriction tolerance and light stress in epiphytes Orchidaceae

ABSTRACT

Epiphyte orchids are exposed to different microclimates, which are characterized by high irradiance imposed on the canopy and low irradiance in plants located on the understory. In addition, this group of plants frequently deals with water restriction. In commercial production, the distribution and intensity of these same factors inside the greenhouses also limit the orchids establishment. *Gomesa flexuosa* Sims and *Oncidium sphacelatum* Lindley are Oncidiinae species and when hybridized, it gave origin to *O.* 'Aloha' (a facultative CAM orchid and an important commercial hybrid). The aim of this study was to elucidate the photosynthetic performance and the water balance strategies of *G. flexuosa* and *O. sphacelatum* under water and light stress conditions, focusing on interspecific differences as well as on different organ functions in the same individual. For that, we analyzed the gas exchange, chlorophyll *a* fluorescence, lipoperoxides quantification, isotopic discrimination, titratable acidity, water relative content and water potential of leaf, pseudobulb and root tissues in different treatments involving water restriction and light variation. After 60 days of water restriction, *G. flexuosa* converted the photosynthetic metabolism from C3 to CAM, which provided a better performance on gas exchanges, chlorophyll *a* fluorescence, photoprotection mechanism and water relations. When *G. flexuosa* was submitted to two events of water restriction, it showed a capacity to store information from previous stress experiences, demonstrating physiological memory. When evaluating how water restriction added to light stress influences the physiological responses of both species for 180 days, *G. flexuosa* again showed better performance and light rusting possibility, while *O. sphacelatum* did not rust and did not show physiological memory. Our results can contribute to conservation programs of native orchids species as well to guide cultivation strategies for commercial purposes.

KEYWORDS: *Gomesa flexuosa*, *Oncidium sphacelatum*, water balance, epiphytic habit, photosynthetic yield

INTRODUÇÃO GERAL

A grande diversidade existente dentre aproximadamente 25.000 epífitas nos trópicos, se dá principalmente pelos diferentes tipos de vegetação em que se estabelecem, ocorrendo desde o sub-bosque até a periferia das copas das árvores (BENZING, 1990; ZOTZ & HIETZ, 2001). Essencialmente, a maior desvantagem associada ao hábito epifítico é a aquisição de água e o baixo suprimento de nutrientes, que advém quase em sua totalidade de fontes pluviais (WENT, 1940; ZOTZ & HIETZ, 2001). Apesar disso, o acesso à luz e a competição por esse recurso, além da maior exposição de flores aos polinizadores, prevenção de herbívoros terrestres e melhor dispersão de sementes estão entre as vantagens do estabelecimento epífita (DRESSLER, 1981; GOWLAND et al. 2013).

Dentre as plantas vasculares epifíticas, podemos citar representantes das famílias Araceae, Bromeliaceae, Cactaceae, Piperaceae, Orchidaceae, entre outros, com destaque especial para as orquídeas. Este grupo de plantas é muito bem-sucedido e altamente diversificado, sendo que dentre as mais de 23.000 espécies em todo o mundo, cerca de 70% são epífitas (ZOTZ, 2013). Isso se deve principalmente aos mecanismos estruturais e fisiológicos necessários para superar flutuações na disponibilidade de recursos que permitem ajustes aos ambientes contrastantes ao longo do processo evolutivo, incluindo o epifítico (BLACK, 1973; CRONQUIST, 1981; NADKARNI, 1986; DRESSLER, 1993; ZOTZ & HIETZ, 2001; MOREIRA et al., 2013; JOCA et al., 2017).

Estudos sugerem que a distribuição vertical de epífitas é influenciada por três fatores principais: microclima, interações bióticas e tipo de substrato (BENZING, 1990; ZOTZ & VOLLRATH, 2003; KRÖMER et al., 2007; RUIZ-CÓRDOVA et al. 2014). Dentre esses fatores, muitas espécies de orquídeas são altamente vulneráveis a mudanças na qualidade do habitat (microclima), causada, muitas vezes, pelo desmatamento e fragmentação da floresta (KÖSTER et al., 2009). Isso influencia a interação entre as necessidades de luz e água, bem como dos nutrientes (SANFORD, 1969; ZOTZ, 2016). Por outro lado, a atividade econômica oriunda da exploração comercial de orquídeas, amplamente difundidas em todos os continentes e almeçadas por orquidófilos e colecionadores (FARIA & COLOMBO, 2015) é em quase sua totalidade, limitada pelos mesmos fatores (FAN & NEUMANN, 2004). O crescimento e a produtividade das plantas dependem do manejo do regime hídrico e luminoso em ambiente natural ou disponibilizado em casas de vegetação. O estabelecimento e sobrevivência estão relacionados com o interesse comercial e paisagístico, os quais observam as características botânicas tais como folhas, pseudobulbos, brotação e florescimento.

Apesar da disponibilidade hídrica estar entre os fatores mais limitantes, a intensidade do estresse induzido pela seca e suas causas subjacentes podem depender da sobreposição de outras variações ambientais (CHAVES, 1991), tais como a alta irradiância imposta ao dossel ou baixa irradiância em plantas situadas ao sub-bosque.

Em geral, onde há incidência luminosa controlada e recursos hídricos limitados, há menos impacto no desempenho da planta (CANHAM et al., 1996; CAVATTE et al., 2012). Neste caso, algumas espécies podem apresentar ajustes aos eventos de seca, uma vez que a limitação luminosa pode ser compensada com menores déficits de pressão de vapor e consequente manutenção do estado hídrico foliar (HOLMGREN, 2000). Entretanto, a seca pode se tornar mais prejudicial em algumas espécies com pouca disponibilidade luminosa, principalmente quando levado em consideração os “trade-offs” entre da alocação da biomassa em resposta às limitações de recursos. Em um outro cenário, sob intensa irradiação combinada à escassez de água, as plantas podem apresentar decréscimos mais fortes na fotossíntese líquida e podem estar mais propensas à fotoinibição devido aos danos na etapa fotoquímica (HOLMGREN, 2000).

Ventre-Lespiaucq e colaboradores (2017) estudaram os padrões de interceptação de luz na orquídea *Rodriguezia granadensis* e encontraram resposta consistente independente da posição dentro do forófito. Neste estudo, evidenciou-se que o gradiente vertical da disponibilidade de luz no dossel da floresta pode não representar um fator limitante para epífitas tropicais. Entretanto, os estudos ecofisiológicos em orquídeas epífitas se concentra muitas vezes em espécies cultivadas em locais mais expostos e supostamente estressantes (LÜTTGE, 1997; BENZING, 2000; ZOTZ & ANDRADE, 2001), apresentando respostas de curto prazo ao estresse e em nível de órgãos individuais, principalmente folhas (ZOTZ & HIETZ, 2001). Dessa forma, o efeito desse gradiente vertical levando em consideração níveis de luz e disponibilidade hídrica, ainda precisa ser estudado em outras espécies de orquídeas epífitas.

Apesar da fixação de CO₂ em orquídeas ter sido amplamente estudada e comumente utilizada nos estudos de ecofisiologia com plantas de hábito epifítico, pouca atenção é direcionada às rotas fotossintéticas que ocorrem em outros tecidos e órgãos (e.g. pseudobulbos e raízes), verificando qual sua possível relação com o desempenho fotossintético da planta como um todo (RODRIGUES et al., 2013). Na orquídea *Laelia anceps* (que apresenta metabolismo CAM) por exemplo, a fotossíntese na folha é amplamente influenciada pela exposição do pseudobulbo à luz (ANDO & OGAWA, 1987). Essa condição é necessária para que as folhas realizem as trocas gasosas de maneira mais eficiente. Além disso, o conhecimento das variações de condições moduladas de disponibilidade hídrica e luminosa com posterior período de reidratação, permitem gerar uma afirmação global da eficiência deste processo. Isso por que,

sob estresse hídrico, o transporte de água nas plantas e sua manutenção nos tecidos é alterado (KUDOYAROVA et al., 2013), sendo acionados ajustes no processo de perda e absorção de água, a fim de manter o equilíbrio hídrico. Sendo assim, a duração, severidade e número de exposições à restrição hídrica interferem nas respostas fisiológicas das plantas (CHAVES et al., 2003), e permitem entender como os principais processos metabólicos e bioquímicos são afetados.

Com base nessas informações, o presente trabalho visa integrar o conhecimento relacionado ao rendimento fotossintético e às estratégias de balanço hídrico de Orchidaceae, tanto do ponto de vista interespecífico, quanto de funções relacionadas aos diferentes órgãos em um mesmo indivíduo. As espécies *Gomesa flexuosa* Sims (**Figura 1-A**) e *Oncidium sphacelatum* Lindley (**Figura 1-B**), orquídeas de interesse ornamental e medicinal, nativas de vegetações tropicais e semidecíduas da América Latina foram utilizadas como modelo. Ambas pertencem à subtribo Oncidiinae, que compreende cerca de 55 gêneros e 1700 espécies dentro da tribo Maxillarieae (CHASE et al., 2005), diferindo entre si não apenas na morfologia floral e vegetativa, mas também quanto ao tipo de via metabólica utilizada para fixação do carbono (SILVERA et al., 2010). *Oncidium sphacelatum* é uma epífita nativa do México, encontrada em fragmentos remanescentes de florestas tropicais e semidecíduas, que floresce de setembro a março, dependendo das condições climáticas e altitude (DAMON & CRUZ-LÓPEZ, 2006). *Gomesa flexuosa*, por sua vez, é uma epífita comum em fragmentos remanescentes de Mata Atlântica em alguns estados do Brasil, Paraguai e Argentina (GASPI et al., 2011).

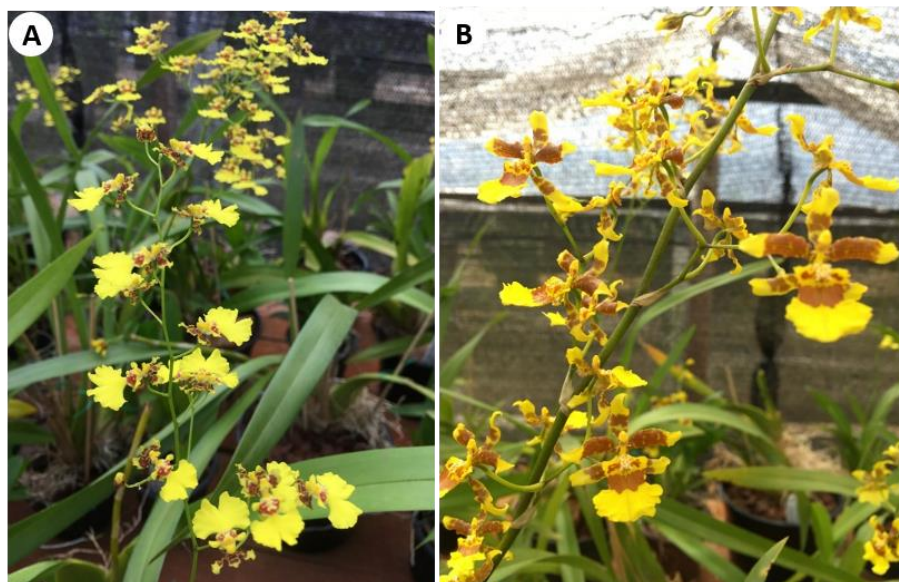


Figura 1. Espécies de Orchidaceae pertencentes à tribo Maxillarieae e subtribo Oncidiinae. (A) *Gomesa flexuosa* Sims e (B) *Oncidium sphacelatum* Lindley, evidenciando a morfologia floral distinta dentre as espécies.

A indução da restrição hídrica por um longo período foi delineada de forma a averiguar se as espécies apresentam o modelo de compartimentalização fotossintética e conversão de metabolismo C3 para CAM (Capítulo 1); a performance das trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, mecanismo de fotoproteção e relações hídricas foram utilizadas para caracterizar memória fisiológica em grupos submetidos à longos períodos de restrição hídrica, comparando plantas que passaram por um único evento de restrição com aquelas que foram submetidas a dois eventos de restrição hídrica (Capítulo 2); e, por fim, foi avaliado como a restrição hídrica somada ao estresse luminoso influenciam nas respostas fisiológicas de *G. flexuosa* e *O. sphacelatum* em um período de 180 dias (Capítulo 3). Os dados gerados então, poderão contribuir para programas de conservação de espécies nativas, além de gerar estratégias de cultivo de espécies híbridas, amplamente demandadas na sociedade orquidófila para fins comerciais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

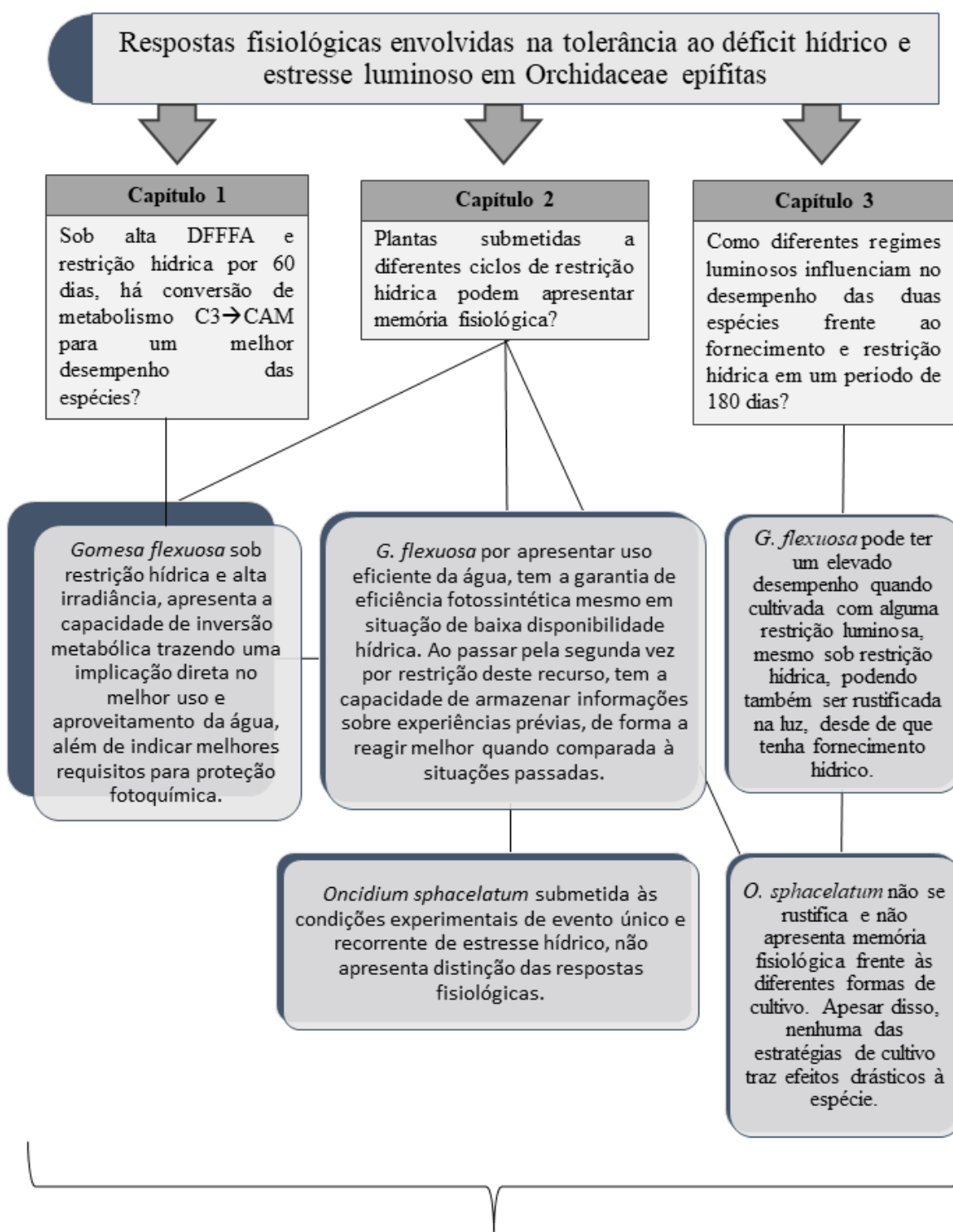
- ANDO, T.; OGAWA, M. Photosynthesis of leaf blades of *Laelia anceps* Lindl. is influenced by irradiation of pseudobulb. **Photosynthetica**, v. 21, p. 588-590, 1987.
- BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence a probe of photosynthesis. In Vivo Review of Plant Biology, **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 89-113, 2008.
- BENZING, D. H. **Vascular epiphytes**. General biology and related biota. Cambridge: Cambridge University Press, 1990.
- BENZING, D. H. **Bromeliaceae - profile of an adaptive radiation**. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.
- BLACK, P. M. **Orquídeas**. Rio de Janeiro: Ed. Ao Livro Técnico S/A, 1973.
- BUTLER, W. L. Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 29, p. 345-378, 1978.
- CANHAM, C. D. et al. Biomass allocation and multiple resource limitation in tree seedlings. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 26, p. 1521-1530, 1996.
- CHASE M. W.; HANSON, L.; ALBERT, V. A.; WHITTEN, W. M.; WILLIAMS, N. H. Life history evolution and genome size in subtribe Oncidiinae (Orchidaceae). **Annals of Botany**, v. 95, p. 191-199, 2005.
- CAVATTE, P.C. et al. Could shading reduce the negative impacts of drought on coffee? A morphophysiological analysis. **Physiologia Plantarum**, v. 144, p. 111-122, 2012.
- CHAVES, M. M. Effects of water deficits on carbon assimilation. **Journal of Experimental Botany**, v. 42, p. 116, 1991.

- CHAVES, M. M. Effects of water deficits on carbon assimilation. **Journal of Experimental Botany**, v. 42, p. 116, 1991.
- CHAVES, M. M.; MAROCO, J. P.; PEREIRA, J. S. Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, v. 30, p. 239-264, 2003.
- CRONQUIST, A. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**. New York: Columbia University Press, 1981.
- DAMON, A. A.; CRUZ-LÓPEZ, L. Fragrance in Relation to Pollination of *Oncidium sphacelatum* and *Trichocentrum oerstedii* (Orchidaceae) in the Soconusco Region of Chiapas, Mexico. **Selbyana**, v. 27, n. 2, p. 186-194, 2006.
- DRESSLER, R. L. **The Orchids: natural History and Classification**. Harvard University Press, Cambridge, 1981.
- DRESSLER, R. L. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Portland: Dioscorides Press, p. 312, 1993.
- FAN, L.; NEUMANN, P. M. The spatially variable inhibition by water deficit of maize root growth correlates with altered profiles of proton flux and cell wall pH. **Plant Physiology**, v. 135, p. 2291-2300, 2004.
- FARIA, R. T.; COLOMBO, R. C. *Oncidium*: a orquídea em expansão no cenário florícola. **Horticultura Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 533, 2015.
- FERRAREZI, E.; VIEIRA, A. O. S.; FARIA, R. T. **Orquídeas: o gênero *Oncidium* no Paraná**. Londrina: Editora da Universidade Estadual de Londrina, p. 120, 2007.
- GASPI, F. O. D. G. DE et al. Effects of the topical application of hydroalcoholic leaf extract of *Oncidium flexuosum* Sims. (Orchidaceae) and microcurrent on the healing of wounds surgically induced in Wistar rats. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.
- GOWLAND, K. M.; VAN DER MERWE, M. M.; LINDE, C. C.; CLEMENTS, M. A.; NICOTRA, A. B. The host bias of three epiphytic Aeridinae orchid species is reflected, but not explained, by mycorrhizal fungal associations. **American Journal of Botany**, v. 100, p. 764-77, 2013.
- HOLMGREN, M. Combined effects of shade and drought on tulip poplar seedlings: trade-off in tolerance or facilitation? **Oikos**, v. 90, p. 67-78, 2000.
- JOCA, T.A.C. et al. The velamen of epiphytic orchids: variation in structure and correlations with nutrient absorption. **Flora**, v. 230, p. 66-74, 2017.
- KÖSTER, N.; FRIEDRICH, K.; NIEDER, N.; BARTHLOTT, W. Conservation of epiphyte diversity in an Andean landscape transformed by human land use. **Conservation Biology**, v. 23, n. 4, p. 911-919, 2009.

- KRÖMER, T.; KESSLER, M.; GRADSTEIN, S. R. Vertical stratification of vascular epiphytes in submontane and montane forest of the Bolivian Andes: the importance of the understory. **Plant Ecology**, v. 189, p. 261-278, 2007.
- KUDOYAROVA, G. R.; KHOLODOVA, V. P.; VESELOV, D. S. Current state of the problem of water relations in plants under water deficit. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 60, n. 2, p. 165-175, 2013.
- LÜTTGE, U. Physiological ecology of tropical plants. Berlin: Springer Verlag, 1997.
- MOREIRA, A. S. F. P.; LEMOS FILHO, J. P.; ISAIAS, R. M. S. Structural adaptations of two sympatric epiphytic orchids (Orchidaceae). **Revista de Biologia Tropical**, v. 61, p. 1053-1065, 2013.
- NADKARNI, N. M. The nutritional effects of epiphytes on host trees with special references to alteration of precipitation chemistry. **Selbyana**, v. 9, p. 44-55, 1986.
- RODRIGUES, M. A. et al. Spatial patterns of photosynthesis in thin- and thick leaved epiphytic orchids: unravelling C3-CAM plasticity in an organ-compartmented way. **Annals of Botany**, v. 112, p. 17-29, 2013.
- RUIZ-CÓRDOVA, J. P.; TOLEDO-HERNÁNDEZ, V. H.; FLORES-PALACIOS, A. The effect of substrate abundance in the vertical stratification of bromeliad epiphytes in a tropical dry forest (Mexico). **Flora**, v. 209, n.8, p. 375-384, 2014.
- SANFORD, W. W. The distribution of epiphytic orchids in Nigeria in relation to each other and geographic location, climate, type of vegetation and tree species. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 1, p. 247-285, 1969.
- SILVERA, K., L. S.; SANTIAGO, J. C.; CUSHMAN, K.; WINTER, K. 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**, v. 163, p. 194-222, 2010.
- VENTRE-LESPIAUCQ, A. B.; DELGADO, J. A.; OSPINA-CALDERÓN, N. H.; OTERO, J. T.; ESCUDERO, A.; SÁNCHEZ, M.; BALAGUER, L.; FLANAGAN, N. S. A tropical epiphytic orchid uses a low-light interception strategy in a spatially heterogeneous light environment. **Biotropica**, v. 49, n. 3, p. 318-327, 2017.
- WENT, E. W. Soziologie der Epiphyten eines tropischen Urwaldes. **Annales du Jardin Botanique de Buitenzorg**, v. 50, p. 1-98, 1940.
- ZOTZ, G. The systematic distribution of vascular epiphytes – a critical update. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 171, p. 453-481, 2013.
- ZOTZ, G. **Plants on Plants- the Biology of Vascular Epiphytes**. Springer, Heidelberg, Berlin, 2016.

- ZOTZ, G.; ANDRADE, J. L. **Ecología de epífitas y hemiepífitas**. In: Guariguata M, Kattan G, eds. *Ecología de Bosques lluviosos Neotropicales*. San José, Costa Rica: IICA (in press), 2001.
- ZOTZ, G.; HIETZ, P. The physiological ecology of vascular epiphytes: current knowledge, open questions. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p.2067-2078, 2001.
- ZOTZ, G.; VOLLRATH, B. The epiphyte vegetation of the palm *Socratea exorrhiza* – correlations with tree size, tree age and bryophyte cover. **Journal of Tropical Ecology**, v. 19, p. 81-90, 2003.

MAPA CONCEITUAL DA TESE



Esses dados destacam a necessidade urgente de aprofundar estudos objetivando desenvolver estratégias para o cultivo e conservação de orquídeas epífitas, principalmente para as espécies nativas. Além disso, a produção e o uso de plantas nativas com potencial ornamental podem contribuir para a valorização e conservação da biodiversidade regional.

Conforme estabelecido pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica) do IBB, UNESP, os resultados obtidos neste projeto de doutorado foram reunidos em três artigos científicos para publicação. Um quarto capítulo foi adicionado a fim de promover a divulgação científica com impacto social voltado para ação de extensão universitária, apresentando os resultados obtidos na Tese em forma de cartilha educativa.

CAPÍTULO 1:

Atividade fotossintética em folhas e pseudobulbos de duas espécies de orquídeas epífitas da subtribo Oncidiinae sob variações de condições hídricas e luminosas

(Escrito de acordo com as normas da ABNT 10520)

CAPÍTULO 2:

Memória fisiológica em resposta ao estresse hídrico em duas espécies da subtribo Oncidiinae (Orchidaceae)

(Escrito de acordo com as normas da revista Acta Physiologiae Plantarum (Qualis CAPES A3).

CAPÍTULO 3:

Desempenho de Gomesa flexuosa Sims e Oncidium sphacelatum Lindley em diferentes regimes luminosos sob influência de fornecimento e restrição hídrica

(Escrito de acordo com as normas da ABNT 10520)

CAPÍTULO 4:

Cartilha educativa: “O cultivo de orquídeas e as exigências de luz e água”

CAPÍTULO 1

Atividade fotossintética em folhas e pseudobulbos de duas espécies de orquídeas epífitas da subtribo Oncidiinae sob variações de condições hídricas e luminosas

JOCA, T.A.C.¹; CAMPOS, F.G.¹; LANA, L. G.²; COSTA, V. E.³; MOREIRA, A. S. F. P.²; ALMEIDA, L. F. R.¹

¹Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) / Departamento de Botânica / Instituto de Biociências - Rubião Junior – 18618970 - Botucatu, SP – Brasil.

² Universidade Federal de Uberlândia/ Campus Umuarama/ Instituto de Biologia - R. Ceará, s/n - 38400902, Uberlândia - Minas Gerais - Brasil

³ Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) / Centro de Isótopos Estáveis/ Instituto de Biociências - Rubião Junior - 18618689 - Botucatu, SP – Brasil.

RESUMO

A alta irradiância aliada à diminuição na disponibilidade hídrica acomete grande parte das espécies de orquídeas epífitas e podem implicar prejuízos em diferentes fases do seu desenvolvimento. No entanto, a exposição a estes estresses de forma sinérgica exige estratégias estruturais e metabólicas que permitem alto sucesso das orquídeas nesses ambientes. Dentre essas estratégias, a transição do metabolismo fotossintético C3 para CAM é altamente eficiente, uma vez que o fechamento estomático diurno evita a perda de água e auxilia na proteção da integridade do aparato fotossintético. *Gomesa flexuosa* Sims e *Oncidium sphacelatum* Lindley são matrizes filogenéticas hibridizadas que deram origem a *O. ‘Aloha’* (orquídea CAM facultativa). Neste estudo, investigamos qual das espécies dentre *G. flexuosa* e *O. sphacelatum* teria contribuição para o metabolismo fotossintético de *O. ‘Aloha’*. Para isso utilizou-se valores da discriminação isotópica e titulação de ácidos orgânicos encontrada em folhas e pseudobulbos, bem como a descrição da estrutura anatômica nesses órgãos, que possivelmente converge na eficiência do metabolismo. Apesar de ambas as espécies apresentarem aerênquimas associados aos feixes vasculares, *Gomesa flexuosa* foi a única espécie que quando induzida à eventos de restrição hídrica apresentou modelo de compartimentalização fotossintética e expressão da via CAM nos pseudobulbos. A queda na condutância estomática diurna e noturna sugere que produção de ácidos orgânicos nos pseudobulbos pode ser oriunda da fixação noturna de CO₂, originada pela respiração noturna das células do mesófilo foliar.

PALAVRAS CHAVE: anatomia de Orchidaceae, metabolismo CAM, compartimentalização fotossintética, discriminação isotópica

Photosynthetic activity in leaves and pseudobulbs of two epiphy orchids species on Oncidiinae subtribe under water and light conditions variation

ABSTRACT

The high irradiance combined with water availability reduction affects most of the epiphytic orchids species, which can imply damage in their different development stages. However, the exposure to these stresses synergistically requires structural and metabolic strategies, which enable orchids a high success in these environments. Among these strategies, the transition from C3 to CAM photosynthetic metabolism is highly efficient, since daytime stomatal closure prevents water loss and helps on photosynthetic apparatus integrity. *Gomesa flexuosa* Sims and *Oncidium sphacelatum* Lindley hybridized and gave origin to O. 'Aloha' (a facultative CAM orchid). In this study, we investigated which species among *G. flexuosa* and *O. sphacelatum* would have contributed to the photosynthetic metabolism of the O. 'Aloha'. For this, we analyzed isotopic discrimination and organic acids titration in leaves and pseudobulbs, as well as described the anatomical structure of these organs, which possibly converge in metabolism efficiency. Although both species present aerenchyma associated with vascular bundles, *G. flexuosa* was the only species that presented a photosynthetic compartmentalization model and CAM pathway expression in pseudobulbs during the water restriction events. The drop in daytime and nighttime stomatal conductance suggests that the organic acids production in pseudobulbs may be due to CO₂ nocturnal fixation, caused by nocturnal respiration on leaf mesophyll cells.

KEY WORDS: Orchidaceae anatomy, CAM metabolism, photosynthetic compartmentalization, isotopic discrimination

INTRODUÇÃO

As orquídeas epífitas podem expressar os metabolismos C3 ou CAM em suas diversas variações fisiotípicas, em resposta às variações ambientais como disponibilidade de água, umidade relativa, temperatura e qualidade de luz (LEE & GRIFFITHS, 1987; WINTER, 2019), revelando forte plasticidade fotossintética. Essa transição de C3 a CAM pode ser benéfica, dentre outras razões, pelo fato de que uma vez submetidas à baixa disponibilidade hídrica e altas temperaturas, o fechamento estomático diurno evita a perda de água e auxilia na proteção da integridade do aparato fotossintético (WINTER & ZIEGLER, 1992; WINTER et al., 2008). Por outro lado, quando há alta disponibilidade hídrica, o caminho inverso pode ser realizado, e essas plantas passam de CAM para fotossíntese C3, podendo abrir os estômatos durante o dia e garantindo uma maior fixação de CO₂ a um menor custo energético para a planta (ANDRADE et al., 2004).

Devido à gama de possibilidades das orquídeas em usarem as vias C3, CAM ou intermediárias de fixação de carbono, é evidenciada uma relação de cada uma das principais vias com sua composição isotópica de carbono - $\delta^{13}\text{C}$ (SILVERA et al., 2009; SILVERA et al., 2010a). Para plantas C₃, a faixa de valores isotópicos varia de -35 a -20 ‰, enquanto na via CAM encontram-se valores de -10 a -22‰.

Entretanto, a assinatura isotópica representa o histórico evolutivo do metabolismo da planta, e por isso, a expressão das vias fotossintéticas em determinado momento, ou sobre qualquer condição ambiental, deve ser avaliada utilizando outros parâmetros para distinção, tais como captação noturna de CO₂, flutuações de carboidratos de armazenamento, atividades de transporte associadas ao tonoplasto, expressão de enzimas PEPC e de descarboxilação, grau de succulência da folha, flutuações dielétricas em ácidos orgânicos, dentre outros (TING, 1985; NELSON et al., 2005; CUSHMAN et al., 2008).

Segundo Winter (2019), medidas da acidez titulável de amostras de tecidos maduros são altamente sensíveis quando coletados ao entardecer e ao amanhecer, podendo demonstrar conclusivamente os níveis de acidificação diurnas e noturnas de 1 a 2 $\mu\text{mol H}^+ \text{g}^{-1}$ de massa fresca. Dessa forma, podemos obter classificações dentre as categorias de CAM, até mesmo plantas CAM “fraca” ou fracamente expressa, que podem ou não estar associadas à redução líquida CO₂ no período da noite, onde, em muitos casos, o balanço noturno de carbono permanece negativo.

Além disso, há as características estruturais que podem ser utilizadas como parâmetros de distinção entre plantas que exibem vias CAM ou C₃ (SILVERA et al., 2010a; RODRIGUES et al., 2013). Dentre elas, pode-se citar o aumento da espessura das folhas, do tamanho das

células e conseqüentemente o aumento da espessura do mesófilo, que em última instância leva à aparência de suculência, frequentemente observada em plantas CAM.

Estudos mostraram que espécies de *Oncidiinae*, uma subtribo com cerca de 55 gêneros e 1700 espécies dentro da tribo *Maxillarieae* (CHASE et al. 2005), diferem entre si não apenas na morfologia floral e vegetativa, mas também quanto ao tipo de via metabólica utilizada para fixação do carbono (SILVERA et al. 2010b). Mais do que isso, Rodrigues e colaboradores (2013) propuseram que indivíduos de *Oncidium* 'Aloha', uma orquídea híbrida com folhas tipicamente C3, apresentassem mecanismo de carboxilação compartimentalizado em diferentes órgãos quando expostos à seca: ocorre fixação noturna do CO₂ através da PEPC nos pseudobulbos e, durante o dia, uma carboxilação via Rubisco nas folhas. Isso revelou que a disponibilidade modulada de água pode afetar diferentes regiões de um mesmo indivíduo com reação sistêmica, fazendo com que sejam realizadas diferentes vias fotossintéticas.

Ademais, com base nessa proposição, pelo menos parte da produção de ácidos orgânicos nos pseudobulbos pode vir da carboxilação de CO₂ gerada através da respiração noturna das células mesófilas das folhas ou mesmo da atmosfera, se os estômatos foliares estiverem abertos à noite. As isoformas específicas de enzimas que catalisam a fixação do CO₂ na presença de HCO³⁻ e Mg²⁺, produzem principalmente oxaloacetato e fosfato inorgânico (RODRIGUES et al., 2013). O oxaloacetato é então convertido em malato e armazenado no vacúolo. O ácido málico é descarboxilado, resultando na liberação e refixação de CO₂ pela Rubisco (ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase /oxigenase) (CUSHMAN & BOHNERT, 1997), neste caso, nas folhas. Isso pode ocorrer principalmente se os estômatos foliares permanecerem fechados devido às limitações de recursos hídricos, de forma que a descarboxilação de ácidos orgânicos nas células de clorênquima dos pseudobulbos poderia fornecer CO₂ para as células do mesófilo foliar através dos dutos de aerênquima.

Considerando os aspectos abordados, o presente ensaio tem como hipótese que as espécies *O. sphacelatum* e *G. flexuosa*, matrizes filogenéticas que participaram da hibridização para compor *O.* 'Aloha', apresentam o modelo de compartimentalização fotossintética proposto por Rodrigues e colaboradores (2013). Desta forma, buscou-se investigar qual das espécies matrizes teria maior contribuição para o metabolismo fotossintético de *O.* 'aloha', utilizando valores da discriminação isotópica e titulação de ácidos orgânicos encontrada não só em folhas, mas também em pseudobulbos das duas espécies em condições controle e de restrição hídrica e excesso luminoso, bem como a variação anatômica nesses órgãos.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e delineamento experimental

Indivíduos de *Gomesa flexuosa* Sims e *Oncidium sphacelatum* Lindley foram obtidos do orquidário ZDZ, em Botucatu/SP, transferidos para vasos padronizados com substrato de casca de pinus/ carvão vegetal, e aclimatados por um ano em casa de vegetação da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, com duas regas semanais (vasos irrigados até a ocorrência de percolação). A casa de vegetação está localizada no Instituto de Biociências (22° 53' S, 48° 26' O), e possui sistema controlado com umidade relativa do ar em torno de 60% e temperatura de 25° a 29°C. No seu interior, a densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) pode atingir até 800 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, durante o dia.

Após o período de aclimação, indivíduos das duas espécies foram separados aleatoriamente em dois grupos, submetidos respectivamente a dois tratamentos: (T1) plantas submetidas a suspensão total de irrigação por todo o experimento e alta (DFFFA) - até 800 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$; e (T2) plantas mantidas hidratadas por todo o experimento (controle), com vasos irrigados até a ocorrência de percolação duas vezes por semana, e sob baixa DFFFA - aproximadamente 200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (ambiente coberto com tela de sombreamento preta 70% - sombrite ®).

As intensidades luminosas de DFFFA foram verificadas com auxílio do medidor de radiação acoplado no fluorômetro WALZ.

Análises estruturais

Ao final dos 60 dias de experimento, para as análises anatômicas, foram utilizados 15 cortes transversais das folhas e pseudobulbos de 10 indivíduos de cada espécie. Cortes transversais de folhas maduras provenientes da brotação mais recente e de pseudobulbos foram obtidos a partir da desidratação de fragmentos em série etanólica e inclusão em historresina Leica® (Leica, Alemanha), conforme recomendações do fabricante. Os blocos foram cortados em espessura de 5 μm utilizando-se um micrótomo rotativo (YD315, ANCAP, Brasil). As seções foram coradas com azul de toluidina 0,05% em NaHPO_4 0,1 M (pH 6,8) (O'BRIEN & MCCULLY, 1981), montadas em glicerina 50% (KRAUS & ARDUIN, 1997) e analisadas em microscópio de luz Leica DM500.

Condutância Estomática (mmol/m²s)

As medições da condutância estomática (g_s , mmol/m²s) foram efetuadas utilizando-se de um porômetro em estado de equilíbrio dinâmico (Leaf Porometer) - Modelo SC-1 (Decagon/EUA). Foram selecionadas folhas completamente expandidas e expostas para realizar medidas, no período diurno (9:00 h) e noturno (19:00h).

Discriminação isotópica de carbono ($\delta^{13}C$)

O metabolismo fotossintético de folhas e pseudobulbos foi avaliado de acordo com a razão isotópica dos ¹²C/¹³C ($\delta^{13}C$) segundo técnicas descritas por Ehleringer e Osmond (1989). Fragmentos de folhas e pseudobulbos de cada uma das espécies em cada tratamento (n=3) foram coletados e levados ao Centro de Isótopos Estáveis da UNESP – Campus Botucatu para serem processados. O material foi seco em estufa a 50°C para posterior maceração e moagem criogênica. Cerca de 50 µg de massa seca de cada amostra foi armazenado em cápsulas de estanho e levados ao espectrômetro de massa (Delta-S, Finnigan MAT, Bremen, Alemanha). O metabolismo fotossintético foi determinado comparando-se os valores de $\delta^{13}C$ encontrados, com os valores propostos por Deines (1980), sendo de -20 a 35‰ para plantas C3, e de -10 a 22‰ para plantas CAM.

Determinação da Variação Diurna dos Ácidos Orgânicos (Acidez Titulável)

Para a determinação da acidez titulável dos tecidos foliares e dos pseudobulbos de cada espécie (n =3) foram coletadas amostras no período da manhã (*pre-dawn*) e início da noite (*sunset*). Aproximadamente 0,2g de amostra tecidual foram acrescidas de 5mL de água deionizada previamente fervida em tubo de ensaio. Os tubos foram colocados em banho-maria à 100°C por 5 minutos e após resfriar, centrifugados à 8.000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente.

Duplicatas de 2,0 mL do sobrenadante foram tituladas com NaOH 0,01N utilizando-se fenolftaleína como indicador. A concentração de H⁺ foram calculadas por unidade de massa fresca de acordo com proposto por Hartsock e Nobel (1976).

Para complementar a interpretação da quantificação dos ácidos orgânicos, além da titulação realizada com as amostras foliares e de pseudobulbos, foi realizada a titulação com diferentes concentrações de ácido málico, de forma que os valores de acidez titulável para esse composto orgânico foram obtidos. Para isso, a partir da solução de 10µmol mq⁻¹ de ácido málico P.A., foram feitas as seguintes diluições e encontradas os seguintes valores de H⁺:

Tabela 1. Acidez titulável expressa a partir de diferentes concentrações de Ácido Málico.

Concentrações de Ácido Málico em mM	Ácido Málico (mL)	Água destilada deionizada (mL)	$\Delta H^+(\mu\text{mol H}^+\text{g}^{-1})$
0,0	0	50	2,2
2,0	10	40	2,6
4,0	20	30	4,6
6,0	30	20	7,4
8,4	42	8	9
10,0	50	0	11,2

Análises dos dados

Após o teste de normalidade Shapiro-Wilk ($P < 0,05$), os dados de discriminação isotópica e acidez titulável de folhas e pseudobulbos foram submetidos ao teste T- Student's, com nível de significância a 5%, realizado com o programa SigmaPlot versão 12.0.

RESULTADOS

A partir dos dados avaliados, foi possível determinar que entre as espécies estudadas, apenas *G. flexuosa* quando submetida à restrição hídrica apresentou o modelo de compartimentalização fotossintética. Além de apresentar aerênquimas associados aos feixes vasculares, apresenta queda na condutância estomática diurna e noturna, e pseudobulbo com alterações expressivas na acidificação noturna, com valores correspondente a 60% da concentração de ácido málico, e discriminação isotópica com valores na faixa C3 e CAM.

Análises estruturais

Oncidium sphacelatum e *G. flexuosa* não apresentam folhas suculentas (**Figura 1 A-B**). Para *G. flexuosa* (**Figura 1- C**), as folhas em seção transversal apresentam espessura variando de 227 a 322 μm . São revestidas por uma cutícula fina sobre células epidérmicas isodiamétricas em ambas as faces da folha. O mesofilo é homogêneo com espessura variando de 187 a 268 μm , tamanho médio das células variando de 477 a 1032 μm^2 e feixes de fibras homogêneas próximo à epiderme abaxial. Poucos espaços intercelulares dispersos pelo mesofilo (**Figura 1 C- D**). A hipoderme é contínua e unisseriada, composta por células maiores da região adaxial. Feixes vasculares colaterais são circundados por uma bainha do feixe pouco diferenciada. As folhas de *O. sphacelatum* (**Figura 1-D**), apresentam espessura entre 236 e 275 μm . São revestidas por uma cutícula fina e células epidérmicas isodiamétricas em ambas as faces. O

mesofilo é homogêneo, com espessura de 209 a 242 μm e tamanho médio das células entre 357 a 1258 μm^2 . Assim como *G. flexuosa*, a hipoderme é contínua e unisseriada, composta por células maiores adaxialmente, há a presença feixes vasculares colaterais circundados por uma bainha do feixe pouco diferenciada, e há fibras homogêneos que ocorrem próximos à epiderme abaxial.

Na transição folha-pseudobulbo, foram observados aerênquimas associados aos feixes vasculares, em ambas as espécies (**Figura 2 A-B**). No pseudobulbo, desprovido de estômatos, está presente uma grande quantidade de aerênquima disperso por todo o órgão, associados às células condutoras do floema nos feixes vasculares (que estão dispersos por todo o órgão) (**Figura 2 C e D**).

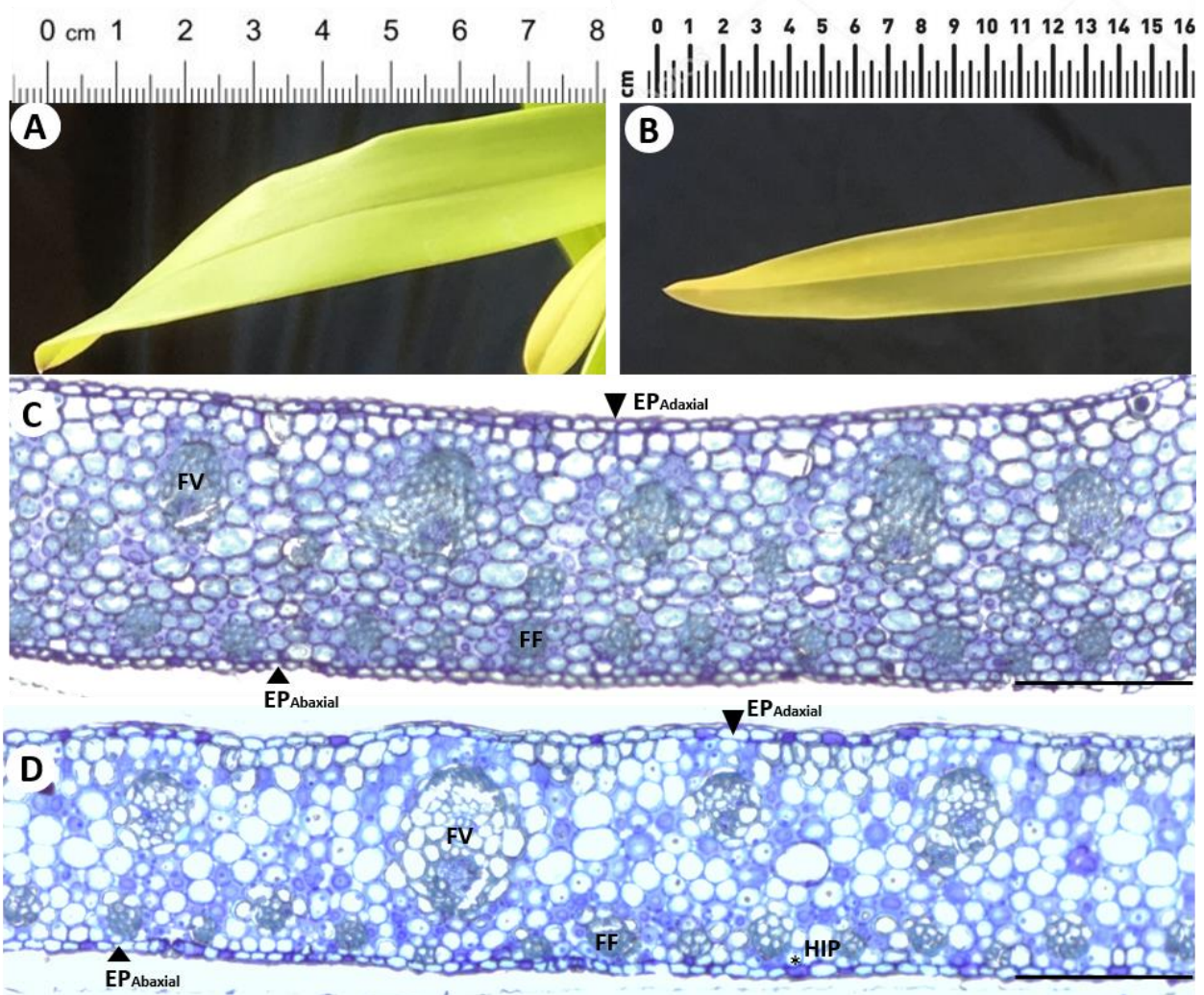


Figura 1. Folhas de *Gomesa flexuosa* e *Oncidium sphacelatum*, duas orquídeas epífitas da subtribo Oncidiinae. (A) Detalhe de folhas delgadas de *G. flexuosa* e (B) *O. sphacelatum*. (C) e (D) Cortes transversais de folhas de *G. flexuosa* (C) e *O. sphacelatum* (D) evidenciando células epidérmicas isodiamétricas, mesófilo homogêneo com poucos espaços intercelulares e com feixes de fibras próximos à face abaxial. EP_{Abaxial} = Epiderme Abaxial; EP_{Adaxial} = Epiderme Adaxial; FF= Feixes de fibras; FV = Feixe vascular; HIP = hipoderme. Barra = 200 µm.

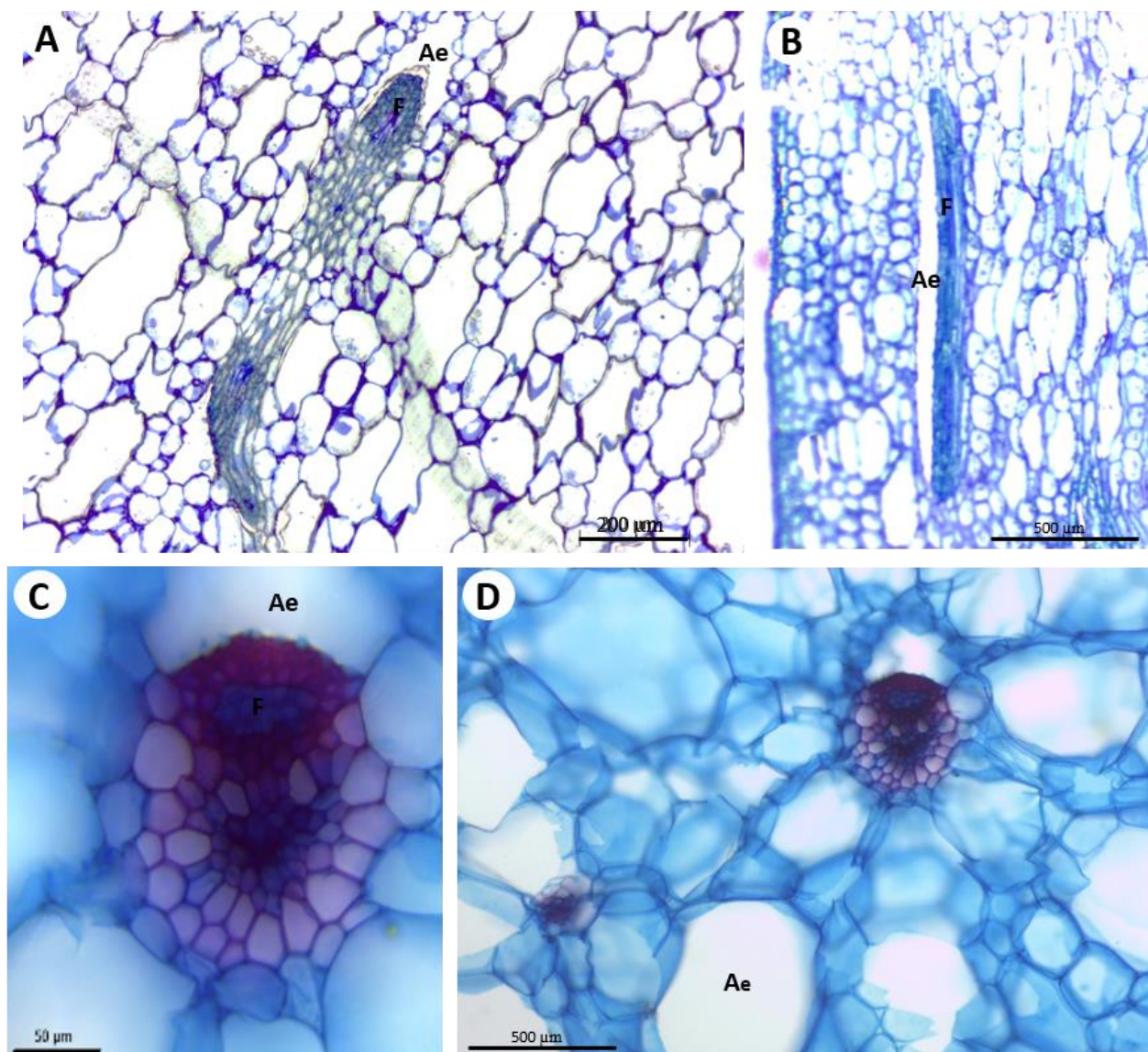


Figura 2. Região de transição entre folhas e pseudobulbos de *Gomesa flexuosa* e *Oncidium sphacelatum*, duas orquídeas epífitas da subtribo Oncidiinae. (A) Secção longitudinal de *G. flexuosa* e (B) secção radial de *O. sphacelatum* evidenciando a presença de aerênquimas associados aos feixes vasculares e (C) Detalhe de aerênquima associado a fibras do floema em *G. flexuosa*. (D) Pseudobulbo de *G. flexuosa* evidenciando grande quantidade de aerênquima disperso por todo o órgão. Ae = Aerênquima; F = Floema.

Condutância estomática (mmol/m²s)

Aos 60 dias de cultivo nas condições experimentais, *G. flexuosa* apresentou condutância média de 3,2 mmol/m²s em T1 e 32,5 mmol/m²s em T2 às 9:00 horas. Para *O. sphacelatum*, g_s foi de 2,6 mmol/m²s em T1 e 33,10 mmol/m²s em T2 neste horário. Para ambas as espécies, às 19:00 horas a condutância se aproximou dos valores de T1, não havendo diferenças significativas entre as espécies (**Tabela 2**).

Tabela 2. Condutância estomática em folhas de *G.flexuosa* e *O. sphacelatum* às 9:00h (dia) e as 19:00h (noite) para plantas submetidas a suspensão total de irrigação por todo o experimento e alta DFFFA (T1); e plantas mantidas hidratadas por todo o experimento sob baixa DFFFA (T2).

Espécie	Tratamento	Condutância Estomática ($mmol/m^2s$) 9:00h (dia)	Condutância Estomática ($mmol/m^2s$) 19:00h (noite)	Significância (P)
<i>Gomesa flexuosa</i>	T1	3,02 ± 0,20	2,57 ± 0,60	NS
	T2	29,17 ± 2,93	2,97 ± 0,25	*
<i>Oncidium sphacelatum</i>	T1	2,43 ± 0,21	2,47 ± 0,42	NS
	T2	31,9 ± 1,08	2,17 ± 0,38	*

Os dados representam média ± desvio padrão, com n=3 para cada tratamento. Os dados foram submetidos ao teste T- Student's, com nível de significância a 5%. (*) representa diferença significativa entre os períodos do dia e noite para cada tratamento, com P<0.001, enquanto NS representa não significativo.

Determinação da razão isotópica ($\delta^{13}C$) e da variação diurna dos ácidos orgânicos (ΔH^+)

Gomesa flexuosa apresentou valores de $\delta^{13}C$ foliar maiores que -23‰, independente dos tratamentos, sendo -21,68‰ em T1 e -22,79‰ em T2. Para o T1, houve aumento significativo dos valores de acidez titulável nas análises do período da noite ($-10,84 \pm 0,90$), enquanto para o T2 não houve variação significativa entre os períodos ($0,55 \pm 0,21$) (**Figura 3**). *O. sphacelatum* apresentou valores de $\delta^{13}C$ foliar similares entre os tratamentos (~-25‰). Houve pequena elevação de H^+ no período da manhã para o T1 ($1,19 \pm 0,37$) resultante do acúmulo noturno, porém em T2 não foram observadas alterações significativas ($0,29 \pm 0,17$) (**Figura 3**).

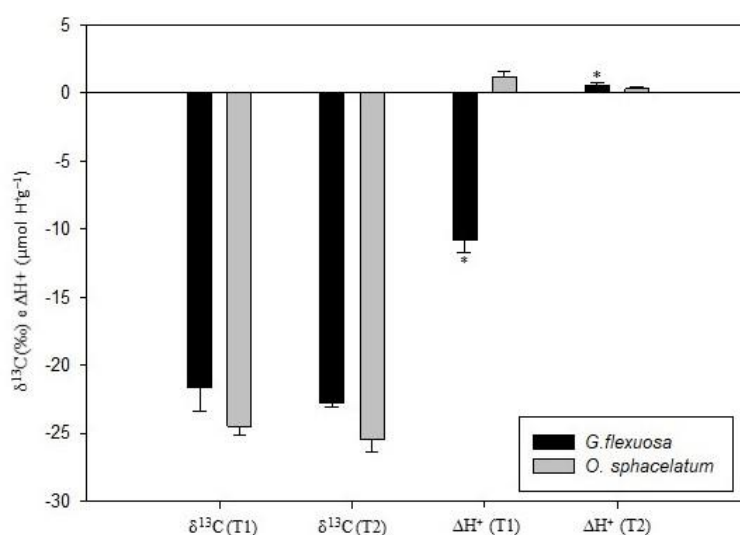


Figura 3. Discriminação isotópica foliar ($\delta^{13}C_{Folha}$) e acidez titulável foliar (ΔH^+_{Folha} noite e manhã) de *G. flexuosa* e *O. sphacelatum* após 60 dias de experimento. T1 refere-se a plantas submetidas à suspensão total de irrigação por todo o experimento e alta DFFFA e T2 refere-se ao tratamento com plantas mantidas hidratadas por todo o experimento, sob baixa DFFFA. (*) representa diferença significativa na acidez titulável acumulada no período noite/dia, com P<0.001.

Quanto ao pseudobulbo, a razão isotópica não diferiu entre os tratamentos para ambas as espécies (**Figura 4**), com valores médios de $-23,12\text{‰}$ para *G. flexuosa* e $-26,25\text{‰}$ para *O. sphacelatum*. Entretanto, houve um aumento significativo na acidez durante a noite apenas no T1 para *G. flexuosa* ($7,60 \pm 1,90$). O T2 nessa espécie, apresentou ΔH^+ de $0,37 \pm 0,28$ e para *O. sphacelatum* os valores foram de $-0,74 \pm 0,36$ em T1 e $0,44 \pm 0,26$ em T2 (**Figura 4**).

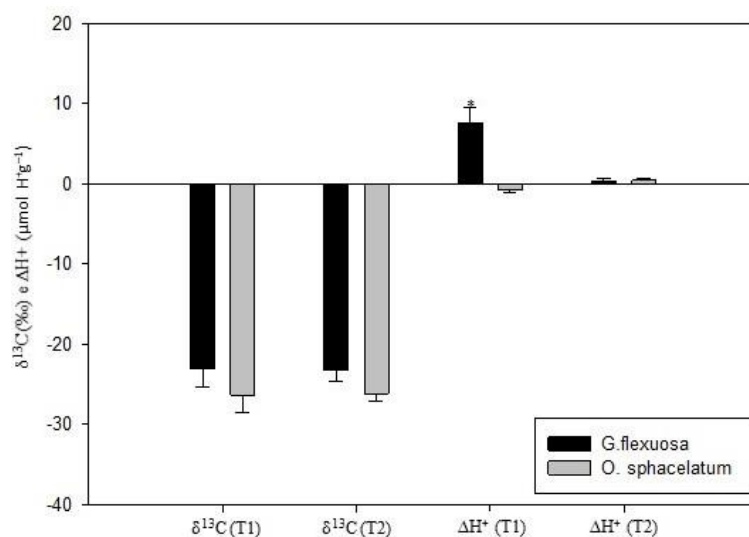


Figura 4. Discriminação isotópica do pseudobulbo ($\delta^{13}\text{C}_{\text{Pseudobulbo}}$) e acidez titulável ($\Delta\text{H}^+_{\text{Pseudobulbo}}$ noite e manhã) de *G. flexuosa* e *O. sphacelatum* após 60 dias de experimento. T1 refere-se a plantas submetidas à suspensão total de irrigação por todo o experimento e alta DFFFA e T2 refere-se ao tratamento com plantas mantidas hidratadas por todo o experimento, sob baixa DFFFA. (*) representa diferença significativa na acidez titulável acumulada no período noite/dia, com $P < 0.001$.

Comparação da titulação das diferentes concentrações de ácido málico com a titulação teciduais das duas espécies

A partir dos valores de acidez titulável para os órgãos vegetativos das duas espécies nos diferentes tratamentos, foi possível observar que apenas o pseudobulbo de *G. flexuosa* em T1 apresentou $7,60 \mu\text{mol H}^+\text{g}^{-1}$, obtendo um padrão semelhante ao corresponde à $6,0 \text{ mM}$ da concentração de ácido málico (**Figura 5**).

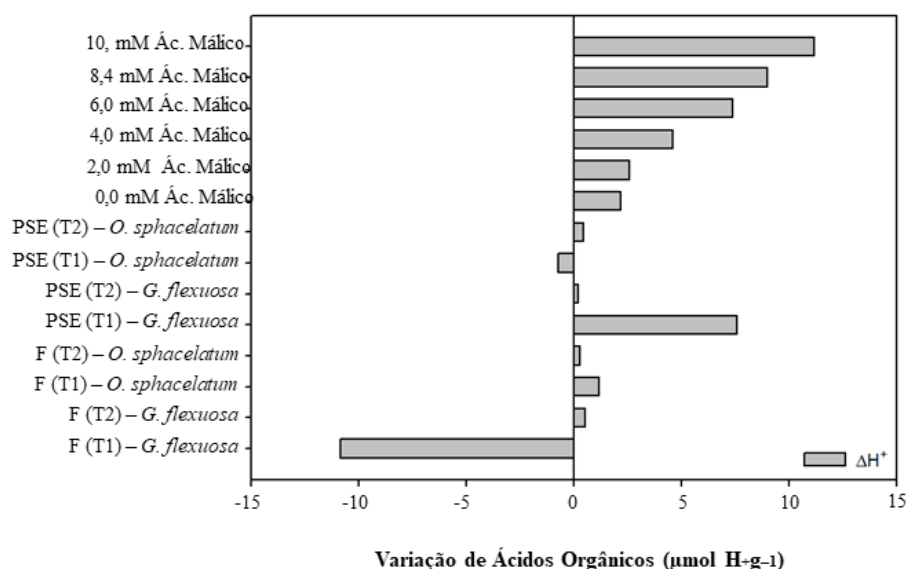


Figura 5. Acidez titulável para os órgãos vegetativos de *G. flexuosa* e *O. sphacelatum* após 60 dias de experimento e para as diferentes concentrações de ácido málico preparadas. T1 refere-se a plantas submetidas a suspensão total de irrigação por todo o experimento e alta DFFFA. T2 refere-se se ao tratamento com plantas mantidas hidratadas por todo o experimento, sob baixa DFFFA. F: folha. PSE: pseudobulbo.

DISCUSSÃO

Gomesa flexuosa e *O. sphacelatum*, espécies envolvidas na hibridização de *O. 'Aloha'*, a exemplo do que foi descrito por Arditti (1992), possuem pseudobulbo com a presença de cutícula espessa, ausência de estômatos e abundância de células armazenadoras de água, sendo um órgão essencial para a sobrevivência e crescimento de orquídeas (HEW & YONG, 1994). Além de armazenar água, carboidratos e minerais, o órgão pode contribuir positivamente para o balanço de carbono na planta, reciclando o CO₂ que de outra forma seria perdido. Apesar de ambas as espécies apresentarem o mesmo padrão encontrado *O. 'Aloha'* de feixes vasculares associados a aerênquimas (RODRIGUES et al., 2013), para *G. flexuosa* sugere-se que a produção de ácidos orgânicos nos pseudobulbos pode ter vindo da fixação noturna de CO₂, originada neste caso pela respiração noturna das células do mesófilo foliar, uma vez que os estômatos se encontram fechados.

A organização estrutural onde aerênquimas estão associados ao floema do pseudobulbo foram descritas também para algumas orquídeas, incluindo espécies de Oncidiinae (HOLTZMEIER et al., 1998; STERN & CARLSWARD, 2006). As indagações sobre a complexa interação entre folhas e pseudobulbos em orquídeas de folhas delgadas tiveram início quando Hew e Yong, em 1994, apresentaram dados em que fotossintatos nas folhas de *Oncidium 'Goldiana'* foram de alguma forma transportados para o pseudobulbo. A partir deste estudo, foram descritos possíveis padrões únicos de particionamento de fotoassimilados em

orquídeas tropicais resultantes de conexões vasculares complexas (Hew e Yong, 1994; YONG & HEW, 1995; HEW et al., 1996; NG & HEW, 2000).

Em *G. flexuosa*, quando mantida sob restrição hídrica e elevada incidência de luz, foi observado o aumento da acidez em tecidos do pseudobulbo, produto da fixação noturna, com valores próximos à 60 % da concentração de malato. A partir desse dado, fica evidente que o local de acúmulo de ácido orgânico ocorre nos vacúolos maiores das células no pseudobulbo suculento dessa orquídea, e não em folhas suculentas, como geralmente é reportado para outras orquídeas que expressam o metabolismo CAM (HERPPICH et al., 1996; HOLTUM et al., 2017; WINTER & HOLTUM, 2017). Exemplo disso é que *Bulbophyllum vaginatum*, *Dendrobium leonis* e *Phalaenopsis cornu-cervi*, orquídeas de folhas grossas, possuem características de plantas que fixam carbono principalmente através do metabolismo ácido crassuláceo (CAMERON et al., 1999), enquanto orquídeas de folhas finas, como *Coelogynes rochussenii*, *Coelogynes mayeriana* e *Bulbophyllum membranaceum*, são plantas que fixam carbono principalmente pela via C3 (ARDITTI & WOOLHUSE, 1980; NEALES & HEW, 1975).

Sob o ponto de vista metabólico, a estratégia de acumular ácido orgânico nos pseudobulbos aprimora a aquisição de recursos em ambientes restritos, uma vez que a separação espacial entre a fixação noturna de CO₂ via PEPC (pseudobulbos) e a carboxilação diurna pela Rubisco (folhas) limita ainda mais qualquer perda de CO₂ para a atmosfera, uma vez que os pseudobulbos não possuem estômatos (GOUK et al., 1997; HE et al., 2013). Embora os pseudobulbos não apresentem estômatos e sejam majoritariamente impermeáveis à água e gases (WITHNER et al., 1974; NG & HEW, 2000), a expressão da via fotossintética CAM pode ser baseada em reciclagem do CO₂ respiratório, como evidenciado neste estudo e observado para outras espécies em Hew e Yong (1994), e Ng e Hew (2000).

Muitas vezes a assinatura isotópica de carbono é realizada de forma isolada, na ausência de medições adicionais como acidez e trocas gasosas e/ou feita majoritariamente em folhas, sem levar em consideração um valor integrado das contribuições da fixação de CO₂ em outros órgãos. Dessa forma, a visão de plantas C3 e CAM fica limitada, não estando claro “onde C3 termina e CAM começa” (WINTER & HOLTUM, 2011). Neste estudo, partimos de uma avaliação sistêmica e integrada das folhas e pseudobulbos, pois apesar do valor reconhecido destes últimos, a maioria dos trabalhos em epífitas vasculares tem se concentrado principalmente em suas folhas (SUN et al., 2014; ZHANG et al., 2015).

Essa investigação forneceu parâmetros para compreender a dinâmica de carboxilação que ocorre em *G. flexuosa*, que apresenta característica típica de uma CAM fraca no pseudobulbo quando submetido a seca e alta incidência luminosa, enquanto as folhas

permanecem com metabolismo fotossintético C₃. Apesar de impermeáveis à água e aos gases, já foi reportado por Ng e Hew (2000) que os pseudobulbos de *Oncidium Goldiana* são capazes de realizar fotossíntese e que as reações do processo fotossintético no órgão dentro do gênero *Oncidium* funcionariam essencialmente para a refixação do carbono respiratório produzido pelo parênquima maciço subjacente (HEW & YONG, 1994). Isso porque, enzimas para fixação de carbono (ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase e fosfoenolpiruvato carboxilase) estão presentes no tecido do pseudobulbo (HEW et al., 1996), e já em 1987, Ando e Ogawa descreveram a capacidade do pseudobulbo em regular a capacidade CAM em *Laelia anceps*, embora não existisse ainda evidências do transporte de ácidos orgânicos das folhas ao pseudobulbo. Este padrão de transporte via características anatômicas, já descrito por Rodrigues e colaboradores (2013) e encontrado aqui em outras duas espécies do gênero *Oncidium*, reforça a ideia de que a restrição hídrica impulsiona o fechamento dos estômatos foliares, com redução na captação de CO₂ e subsequentemente regula a eficiência fotossintética, fato que pode ser amenizado pela refixação de carbono através do metabolismo CAM, ainda obtendo importante economia de água (HAAG-KERWER et al., 1992; CORNIC & FRESNEAU, 2002; RODRIGUES et al., 2013).

De acordo com Silvera e colaboradores (2009) e Pérez-Harguindeguy e colaboradores (2013), o metabolismo fotossintético e a eficiência intrínseca ao uso da água podem ser determinados a partir dos dados de composição isotópica de carbono. A partir da comparação proposta pelos valores sugeridos por Deines (1980), evidenciou-se que *G. flexuosa*, com valor isotópico em torno de -23‰ no pseudobulbo e -22‰ nas folhas, apresenta valores dentro da faixa de C₃ mas também no espectro de valores para determinação CAM, principalmente nas folhas. Outros autores, como Pérez-Harguindeguy e colaboradores (2013), apresentam a faixa de valores para as espécies de fotossíntese C₃ variando de -21‰ a -35‰, espécies CAM facultativas de -15‰ a -20‰ e CAM obrigatórias de -10‰ a -15‰. Muito embora estes valores não demonstrem que *G. flexuosa* estaria na faixa de CAM facultativa ou obrigatória, os próprios autores sugerem que embora a via fotossintética de uma espécie possa ser determinada pela análise isotópica, outras variáveis, como características anatômicas e medição diurna da concentração de ácidos orgânicos, seriam importantes para atestar os resultados. Os valores similares para δ¹³C entre folhas e pseudobulbos desta espécie, indica ainda uma translocação de fotoassimilados entre folhas e pseudobulbos, não havendo compartimentalização do produto final da fotossíntese nestes órgãos. Para *O. sphacelatum*, ambos os dados de composição isotópica (em média -25‰ para folhas e -26‰ em pseudobulbos) e acidez titulável tecidual, indicam metabolismo fotossintético C₃.

A reconstrução do estado ancestral de plantas CAM em uma filogenia das espécies de Oncidiinae indica pelo menos oito origens independentes de CAM dentro do clado (SILVERA et al. 2010a). *Gomesa flexuosa* é uma espécie mais basal em relação à *O. sphacelatum*, e apresenta linhagem C₃. Nossos resultados, dessa forma, auxiliam na compreensão dos fatores que influenciam os parâmetros fotossintéticos em epífitas, evidenciando que o conhecimento dos ajustes ecofisiológicos nestas plantas ainda enfrenta muitas limitações. Possivelmente, a característica apresentada para *G. flexuosa* pode contribuir de forma expressiva na capacidade da híbrida *O. 'Aloha'* apresentar a dinâmica complexa que coordena a interdependência fotossintética observada entre as folhas e os pseudobulbos.

Ademais, nossos dados sugerem que o cultivo e a produção de plantas devem levar em consideração a capacidade de conversão metabólica de *G. flexuosa* sob restrição hídrica e alta irradiação, uma vez que pode trazer uma implicação direta no melhor uso e aproveitamento da água, além de indicar melhores requisitos para proteção fotoquímica em condições extremas. Essas inferências, baseadas nos dados obtidos, nos leva a indagar sobre os possíveis benefícios caso essas informações sejam armazenadas na planta, podendo auxiliar em um momento de novo desafio. De fato, as plantas poderão responder de maneira diferente a um novo estresse ou desencadear um melhor resultado? Investigar esse aspecto, com evidências fisiológicas podem fornecer informações significativas sobre os mecanismos responsáveis pela memória de estresse da planta, uma vez que tanto no aspecto comercial quanto na interação com épocas sazonais, a variação hídrica é um fator que persiste ao longo do ciclo de vida das orquídeas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDO, T.; OGAWA, M. Photosynthesis of leaf blades of *Laelia anceps* Lindl. is influenced by irradiation of pseudobulb. **Photosynthetica**, v. 21, p. 588-590, 1987.
- ANDRADE, J. L.; DE LA BARRERA, E.; GARCÍA, C. R.; RICALDE, M. F.; SOTO, G. V.; CERVERA, J. C. El metabolismo ácido de las crasuláceas: diversidad, fisiología ambiental y productividad. **Boletín de la Sociedad Botánica de México**, v. 81, p. 37-50, 2007.
- ARDITTI, J. **Fundamentals of Orchid Biology**. Wiley, New York, 1992.
- ARDITTI, J.; WOOLHUSE, W. H. **Aspects of the Physiology of Orchids**. In: Woolhouse, H., Ed., *Advances in Botanical Research*, Academic Press, London, p. 421-655, 1980.
- BENZING, D. Vulnerabilities of Tropical Forests to Climate Change: The Significance of Resident Epiphytes. **Climatic Change**, v. 39, p. 519-540, 1998.

- BORLAND, A. M.; BARRERA ZAMBRANO, V. A.; CEUSTERS, J.; SHORROCK, K. The photosynthetic plasticity of crassulacean acid metabolism: an evolutionary innovation for sustainable productivity in a changing world. **New Phytologist**, v. 191, n. 3, p. 619-633. 2011.
- CAMERON, K. M.; CHASE, M. W.; WHITTEN, W. M.; KORES, P. J.; JARRELL, D. C.; ALBERT, V. A.; et al. A Phylogenetic Analysis of the Orchidaceae: Evidence from rbcL Nucleotide Sequences. **American Journal of Botany**, v. 86, p. 208-224, 1999.
- CHASE M. W.; HANSON, L.; ALBERT, V. A.; WHITTEN, W. M.; WILLIAMS, N. H. Life history evolution and genome size in subtribe Oncidiinae (Orchidaceae). **Annals of Botany**, v. 95, p. 191–199, 2005.
- CHAVES, M. M. Effects of water deficits on carbon assimilation. **Journal of Experimental Botany**, v. 42, p. 116, 1991.
- CORNIC, G.; FRESNEAU, C. Photosynthetic Carbon Reduction and Carbon Oxidation Cycles Are the Main Electron Sinks for Photosystem II Activity during a Mild Drought. **Annals of Botany**, v. 89, p. 887-894, 2002.
- CUSHMAN, J. C.; BOHNERT, H. J. Molecular genetics of crassulacean acid metabolism. **Plant Physiology**, v. 113, p. 667–676, 1997.
- CUSHMAN, J. C.; TILLET, R.L.; WOOD, J. A.; BRANCO, J. M.; SCHLAUCH, K. A.; Large-scale mRNA expression profiling in the common ice plant, *Mesembryanthemum crystallinum*, performing C₃ photosynthesis and crassulacean acid metabolism (CAM). **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 1875-1894, 2008.
- DEINES, P. **The isotopic composition of reduced organic carbon**. In Handbook of Environmental Isotope Geochemistry (eds P. Fritz and J.Ch. Fontes), Elsevier, Amsterdam, p. 329-406, 1980.
- EHLERINGER, J. R.; OSMOND, C. B. **Stable isotopes**. In Plant physiological ecology, Field Methods and Instrumentation. Chapman and Hall, New York, p. 281-300, 1989.
- GOUK, S. S.; YONG, J. W. H.; HEW, C. S. Effects of super-elevated CO₂ on the growth and carboxylating enzymes in an epiphytic CAM orchid plantlet. **Journal of Plant Physiology**, v. 151, n. 2, p. 129-136, 1997.
- GRAVENDEEL, B.; SMITHSON, A.; SLIK, F.J.W.; SCHUITEMAN, A. Epiphytism and pollinator specialization: drivers for orchid diversity? Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B. **Biological Sciences**, v. 359, p.1523-1535, 2004.
- HAAG-KERWER, A.; FRANCO, A. C.; LUTTGE, U. The Effect of Temperature and Light on Gas Exchange and Acid Accumulation in the C₃-CAM Plant *Clusia minor* L. **Journal of Experimental Botany**, v. 43, p. 345-352, 1992.

- HARTSOCK, T. I.; NOBEL, P. S. Watering converts a CAM plant to daytime CO₂ uptake. **Nature**, v. 262, p. 574-576, 1976.
- HE, J.; NORHAFIS HAZELMAN, H.; QIN, L. Responses of Green Leaves and Green Pseudobulbs of CAM Orchid *Cattleya laelio*, *Cattleya Aloha* Case to Drought Stress. **Journal of Botany**, v. 2013, p. 1-9, 2013.
- HERPPICH, W. B.; MIDGLEY, G.; VON WILLERT, D. J.; VESTE, M. CAM variations in the leaf-succulent *Delosperma tradescantioides* (Mesembryanthemaceae), native to southern Africa. **Physiologia Plantarum**, v. 98, p. 485-492, 1996.
- HEW, C. S.; YONG, J. W. H. Growth and photosynthesis of *Oncidium 'Goldiana'*. **Journal of Horticultural Science**, v. 69, n. 5, p. 809-819, 1994.
- HEW, C. S.; NG, C. K. Y.; GOUK, S.S.; YONG, J. W. H.; WONG, S.C. Variation in $\delta^{13}\text{C}$ values for different plant parts of an *Oncidium* orchid, **Photosynthetica**, v. 32, p. 135-139, 1996.
- HOLTUM, J. A. M.; HANCOCK, L. P.; EDWARDS, E. J.; WINTER, K. Facultative CAM photosynthesis (crassulacean acid metabolism) in four species of Calandrinia, ephemeral succulents of arid Australia. **Photosynthesis Research**, v. 134, p. 17–25, 2017.
- HOLTZMEIER, M. A.; STERN, W. L.; JUDD, W. S. Comparative anatomy and systematics of Senghas's cushion species of Maxillaria (Orchidaceae), **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 127, p. 43-82, 1998.
- JOCA, T.A.C. et al. The velamen of epiphytic orchids: variation in structure and correlations with nutrient absorption. **Flora**, v. 23, 2017.
- JOHANSSON, D.R. Ecology of vascular epiphytes in West African rain forest. **Acta Phytogeographica Suecica**, p. 136, 1974.
- KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Editora da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1997.
- LEE, H. S. J.; GRIFFITHS, H. Induction and repression of CAM in *Sedum telephium* L. in response to photoperiod and water stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 38, p. 834–841, 1987.
- MOREIRA, A. S. F. P.; LEMOS FILHO, J. P.; ISAIAS, R. M. S. Structural adaptations of two sympatric epiphytic orchids (Orchidaceae). **Revista de Biologia Tropical**, v. 61, p. 1053-1065, 2013.
- NADKARNI, N. M. The nutritional effects of epiphytes on host trees with special references to alteration of precipitation chemistry. **Selbyana**, v. 9, p. 44-55, 1986.
- NEALES, T. F.; HEW, C. S. Two Types of Carbon Fixation in Tropical Orchids. **Planta**, v. 123, p. 303-306, 1975.

- Nelson, E. A.; Sage, T. L.; Sage, R. F. Functional leaf anatomy of plants with crassulacean acid metabolism. **Functional Plant Biology**, v. 32, p. 409-419, 2005.
- NG, C. K. Y.; HEW, C. S. Orchid pseudobulbs – ‘false’ bulbs with a genuine importance in orchid growth and survival! **Scientia Horticulturae**, v. 83, p. 165- 172, 2000.
- O'BRIEN, T. P.; MCCULLY, M. E. **The study of plant structure principles and selected methods**, 1981.
- PÉREZ-HARGUINDEGUY, N. et al. New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. **Australian Journal of Botany**, v. 61, p. 167–234, 2013.
- RODRIGUES, M.A. et al. Spatial patterns of photosynthesis in thin- and thick leaved epiphytic orchids: unravelling C3-CAM plasticity in an organ-compartmented way. **Annals of Botany**, v. 112, p. 17-29, 2013.
- SILVERA, K.; SANTIAGO, L. S.; CUSHMAN, J. C.; WINTER, K. Crassulacean acid metabolism and epiphytism linked to adaptive radiations in the Orchidaceae. **Plant Physiology**, v. 149, p. 1838–1847, 2009.
- SILVERA, K., K. M.; NEUBIG, M. W.; WHITTEN, N. H.; WILLIAMS, K.; WINTER, K.; CUSHMAN, K. Evolution along the crassulacean acid metabolism continuum. **Functional Plant Biology**, v. 37, p. 995-1010, 2010a.
- SILVERA, K., L. S.; SANTIAGO, J. C.; CUSHMAN, K.; WINTER, K. 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**, v. 163, p. 194-222, 2010b.
- STERN, W. L.; CARLSWARD, B. S. Comparative vegetative anatomy and systematics of Oncidiinae (Maxillarieae, Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 152, p. 91-107, 2006.
- SUN, M. et al. Correlated evolution in traits influencing leaf water balance in *Dendrobium* (Orchidaceae). **Plant Ecology**, v. 215, p. 1255-1267, 2014.
- TING, I. Crassulacean acid metabolism. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 36, p. 595–622, 1985.
- WINTER, K. Ecophysiology of constitutive and facultative CAM photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, n. 22, p. 6495-6508, 2019.
- WINTER K., HOLTUM, J. A. Induction and reversal of crassulacean acid metabolism in *Calandrinia polyandra*: effects of soil moisture and nutrients. **Functional Plant Biology**, v. 38, n. 7, p 576-582, 2011.
- WINTER K.; HOLTUM, J. A. M. Facultative crassulacean acid metabolism (CAM) in four small C3 and C4 leaf-succulents. **Australian Journal of Botany**, v. 65, p. 103-108, 2017.

- WINTER, K.; ZIEGLER, H. Induction of crassulacean acid metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum* increases reproductive success under conditions of drought and salinity stress. **Oecologia**, v. 92, p. 475–479, 1992.
- WITHNER, C. L.; NELSON, P. K.; WEJKSNORA, P. J. **The anatomy of orchids**. The orchids: scientific studies. New York: J. Wiley, p. 267-334, 1974.
- WINTER, K. GARCIA, M.; HOLTUM, J. A. M. On the nature of facultative and constitutive CAM: environmental and developmental control of CAM expression during early growth of *Clusia*, *Kalanchoë*, and *Opuntia*. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 7, p. 1829–1840, 2008.
- YONG, J. W. H.; HEW, C. S. The importance of photoassimilate contribution from the current shoot and connected back shoots to inflorescence size in the thin-leaved sympodial orchid *Oncidium Goldiana*. **International Journal of Plant Sciences**, v. 156, n. 4, p. 450-459, 1995.
- ZHANG, S.B. et al. Differentiation of water-related traits in terrestrial and epiphytic Cymbidium species. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 260, 2015.
- ZOTZ, G.; HIETZ, P. The physiological ecology of vascular epiphytes: current knowledge, open questions. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 2067-2078, 2001.
- ZOTZ, G.; WINTER, K. Annual carbon balance and nitrogen use efficiency in tropical C3 and CAM epiphytes. **New Phytologist**, v. 126, p. 481– 492, 1994.
- ZOTZ, G.; WINKLER, U. Aerial roots of epiphytic orchids: the velamen radicum and its role in water and nutrient uptake. **Oecologia**, v.171, p.733-741, 2013.

CAPÍTULO 2

Memória fisiológica em resposta ao estresse hídrico em duas espécies da subtribo *Oncidiinae* (Orchidaceae)

JOCA, T.A.C¹.; BERTHOLDI, A.A.S¹.; MOREIRA, A. S. F. P.²; ALMEIDA, L. F. R¹

¹Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) / Departamento de Botânica / Instituto de Biociências - Rubião Junior – 18618970 - Botucatu, SP – Brasil.

² Universidade Federal de Uberlândia/ Campus Umuarama/ Instituto de Biologia - R. Ceará, s/n - 38400902, Uberlândia - Minas Gerais – Brasil

RESUMO

Modificações estruturais, genéticas e bioquímicas ocorrem no vegetal quando há a exposição contínua a fatores estressantes. Isso pode torná-lo mais tolerante a exposições futuras. A indução experimental de restrição hídrica em mais de um ciclo em orquídeas epífitas é rara, implicando a falta de conhecimento dos padrões de respostas fisiológicas dessas plantas em tais condições. Neste estudo, investigamos se os eventos subsequentes de estresse hídrico afetam a capacidade de se ajustar às mudanças ambientais através do processo de aprendizagem em duas espécies (*G. flexuosa* and *O. sphacelatum*). Foram verificados por meio das técnicas de análise hierárquica de cluster (AHC) e análise de componentes principais (PCA) os parâmetros de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, mecanismo de fotoproteção e relações hídricas em dois tratamentos: um grupo submetido à restrição hídrica por dois eventos, e outro submetido a um único evento de restrição hídrica. Em *Gomesa flexuosa*, as plantas que passaram pela segunda vez pela restrição hídrica demonstraram capacidade de armazenar informações de experiências prévias, reagindo de forma mais eficiente. Principalmente com uso eficiente da água, que proporcionou maior eficiência do fotossistema II e a manutenção do fluxo de elétrons, indicando garantia na eficiência fotossintética mesmo em situação de restrição hídrica. Em *O. sphacelatum*, não houve diferenças entre os dois tratamentos, uma vez que os clusters foram formados apenas relacionando o fornecimento e restrição hídrica. Isso indica que *O. sphacelatum* não apresenta capacidade para armazenar informações de experiências de estresses anteriores.

PALAVRAS CHAVE: aprendizagem em plantas, ciclo de estresse, *Gomesa flexuosa*, *Oncidium sphacelatum*

Physiological memory in response to water stress in two species of Oncidiinae subtribe (Orchidaceae)

ABSTRACT

Structural, genetic and biochemical changes occur in plants when there is continuous exposure to stressors. This can make plants more tolerant to future exposures. More than one cycle of water deficit induction is rare in epiphyte orchids. Therefore, there is a lack of knowledge of physiological responses patterns of these plants in such conditions. In this study, we investigated whether subsequent events of water stress affects the ability to adjust to environmental changes by learning process in two species (*G. flexuosa* and *O. sphacelatum*). We used the Hierarchical Cluster Analysis (HCA) and Principal Component Analysis (PCA) techniques to analyze the gas exchange, chlorophyll *a* fluorescence, photoprotection mechanism and water relations parameters between two treatments: one submitted to two events of water restriction and other submitted by a single water restriction event. In *Gomesa flexuosa*, the plants that were submitted to two events of water restriction showed a capacity to store information from previous stress experiences, reacting more efficiently. Mainly with water efficient use, which provided greater efficiency of photosystem II and electron flow maintenance, indicating photosynthetic efficiency guarantee even in water restriction situations. In *O. sphacelatum*, there were no differences between the two treatments, since clusters were formed only in relation to water supply and restriction. This indicates that *O. sphacelatum* does not have the capacity to store information from previous stress experiences.

KEY WORDS: plant learning, stress cycle, *Gomesa flexuosa*, *Oncidium sphacelatum*

INTRODUÇÃO

As plantas estão submetidas a flutuações ambientais e a diferentes tipos de estresses em seu meio natural, sendo que a exposição prévia ao estresse pode alterar as respostas bioquímicas e fisiológicas a um evento subsequente (Guedes et al. 2019). Neste contexto, a família Orchidaceae possui história de vida complexa e estratégias de adaptação diversificadas, sendo que aproximadamente 2/3 do grupo possui hábito epifítico (Benzing 1990; Zhang et al. 2016). Essas espécies se beneficiam de irradiância abundante e relativamente pouca competição, mas, por outro lado, possuem suprimentos limitados de nutrientes e principalmente de água (Zotz e Hietz 2001). De fato, modificações estruturais, genéticas e bioquímicas ocorrem devido à exposição contínua a esses fatores, e isso pode tornar a planta mais resistente à exposição futura a esse mesmo fator (Fleta-Soriano e Munné -Bosch 2016), devido a eventos de memória fisiológica.

Apesar de não contarem com um sistema nervoso especializado para “guardar lembranças de eventos passados de estresse”, cada vez mais estudos sugerem que as plantas são capazes de gerar um tipo de informação que persiste após o período de remoção e recuperação do estímulo subsequente (Gagliano et al. 2016; Baluška e Mancuso 2018; Witzany et al. 2018; Guedes et al. 2019). Essas informações integradas então, podem auxiliar em um posterior evento em que, desafiadas novamente, as plantas apresentem plasticidade fenotípica com respostas fisiológicas otimizadas no evento estressante seguinte (Avramova 2015; Crisp et al. 2016).

Esse mecanismo de memória ou até mesmo de condicionamento ou aclimatação, se resume ao fato de que gerar respostas diferenciadas ou mais rápidas a um evento de estresse subsequente (Bruce et al. 2007; Crisp et al. 2016). O conhecimento atual sobre essa temática engloba desde o uso de diversas abordagens com dados transcriptômicos e epigenômicos (Ding et al. 2014; Crisp et al. 2017; de Guedes et al. 2018), bem como a associação com evidências fisiológicas que fornecem informações significativas sobre os mecanismos responsáveis pela memória de estresse da planta.

Muitos trabalhos trazem parâmetros fisiológicos clássicos evidenciando a criação de memória de curto prazo, permitindo uma aclimatação mais robusta em eudicotiledôneas muito utilizadas para fins comerciais, como em videiras (*Vitis vinifera* L.) e amendoins (*Arachis hypogaea* L.) submetidos a estresse hídrico recorrente. Assim, plantas apresentaram maior condutância estomática, taxas de transpiração foliar, eficiência do uso da água e status antioxidante em relação às plantas mantidas bem irrigadas (Qin et al. 2017; Tombesi et al. 2018). Estudos com *Arabidopsis* também são comumente realizados devido à gama de

informações relacionadas à espécie, demonstrando, dentre outros parâmetros, que podem perder menos água quando expostas previamente à seca quando comparadas às plantas que passam pelo primeiro evento de estresse (Ding et al. 2013). Quanto às monocotiledôneas, em *Zea mays* L. e espécies de Poaceae pré-estressadas, há menor taxa de perda de água quando expostas a evento de seca subsequente, e aprimoramento da fotoproteção, respectivamente (Walter et al. 2011; Ding et al. 2014).

No entanto, desenhos experimentais de indução de restrição hídrica em mais de um ciclo aplicados a orquídeas epífitas são raros, implicando na falta de conhecimento dos padrões de respostas fisiológicas dessas plantas em tais condições. A elucidação desses padrões pode fornecer informações significativas sobre possível memória, e então auxiliar na geração de técnicas para melhorar a produção de algumas espécies, e até mesmo prever sua adaptação à longo prazo em meio natural.

Com isso, neste trabalho, utilizou-se plantas de duas espécies de orquídeas epífitas da subtribo Oncidiinae, um dos grupos que possuem o maior número de representantes dentro dos Neotrópicos (Chase et al. 2015), sendo representado aqui por uma espécie do gênero *Oncidium* Sw. (gênero tipo), e por uma espécie do gênero *Gomesa* R.Br. (agrupado por arranjos e recircunscrições apoiadas por análises moleculares, em relação às espécies brasileiras). Partindo do pressuposto de que as plantas são capazes de se adaptar a mudanças ambientais pelo processo de aprendizagem, baseado em ajustes fisiológicos que podem ser aperfeiçoados para o próximo evento de estresse (Crisp et al. 2016; Gagliano et al. 2016), hipotetizamos que orquídeas representantes dos dois gêneros apresentariam melhorias nos parâmetros de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, mecanismo de fotoproteção e relações hídricas em um grupo submetido à dois eventos de seca, quando comparadas à plantas que passaram por um único evento de restrição hídrica.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Indivíduos de *Gomesa flexuosum* Sims e *Oncidium sphacelatum* Lindley foram obtidos do orquidário ZDZ, em Botucatu/SP, e transferidos para vasos padronizados com substrato de casca de pinus/ carvão vegetal, sendo mantidos em casa de vegetação do Departamento de Botânica por um ano, com duas regas semanais (vasos irrigados até a ocorrência de percolação) para aclimação. A casa de vegetação está localizada no Instituto de Biociências (22° 53' S, 48° 26' O), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Botucatu, SP, Brasil.

A casa de vegetação estava equipada com sistema controlado com umidade relativa do ar em torno de 60% e temperatura em torno de 25° - 29°C. No período do experimento, os dados de déficit de pressão de vapor do ambiente (DPV - kPa) foram obtidos a partir da umidade relativa e temperatura média, utilizando o porômetro (Decagon Devices Inc., Pullman, WA, USA), com os cálculos de DPV segundo Jones (1992). Dessa forma, no 1º Evento de Déficit Hídrico o DPV ambiental foi de 1,45 ($\pm 0,09$); enquanto no 2º Evento de Déficit Hídrico foi de 1,58 ($\pm 0,03$), não havendo diferença entre os períodos.

A densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) pode atingir até 800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ durante o dia, no entanto, as plantas foram cultivadas sob DFFFA de aproximadamente 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, sendo mantidas em ambiente coberto com tela de sombreamento preta 70% - sombrite ®. As DFFFA foram verificadas com auxílio do medidor de radiação acoplado no fluorômetro WALZ, e, no 1º Evento de Déficit Hídrico a média foi em torno 225,11 ($\pm 40,79$); enquanto no 2º Evento de Déficit Hídrico foi de 219,52 ($\pm 60,77$), não havendo diferença entre os períodos.

Delineamento experimental

Após o período de aclimação, a partir do mês de julho 12 plantas de cada espécie foram separadas aleatoriamente em dois grupos, com dois tratamentos, sendo que em cada grupo haviam plantas: 1) com fornecimento hídrico constante, cujos vasos eram irrigados duas vezes por semana até a ocorrência de percolação ($n=3$), denominado T1; e 2) com restrição hídrica ($n=3$), denominado T2. O primeiro grupo denominado 1º Evento de Déficit Hídrico (1º EV_{DH}) foi constituído de plantas expostas 180 dias na condição T1 e 60 dias na condição T2; enquanto o segundo grupo, denominado 2º Evento de Déficit Hídrico (2º EV_{DH}), foi composto por plantas expostas 180 dias condição T1, e outras foram inicialmente submetidas a 60 dias restrição hídrica, logo após foram recuperadas por 60 dias seguidos na condição T1, e posteriormente submetidas à nova restrição hídrica por um período também de 60 dias (**Figura 1**).

Ao final do período de 60 dias do 1º EV_{DH} e do último estresse aplicado no 2º EV_{DH} foram realizadas (1) coletas das relações hídricas: conteúdo relativo de água (CRA) e potencial da água (Ψ_w) nas folhas, pseudobulbos e raízes; (2) coletas para quantificação dos teores de lipoperóxidos foliar; (3) avaliações de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* foliar (**Figura 1**).

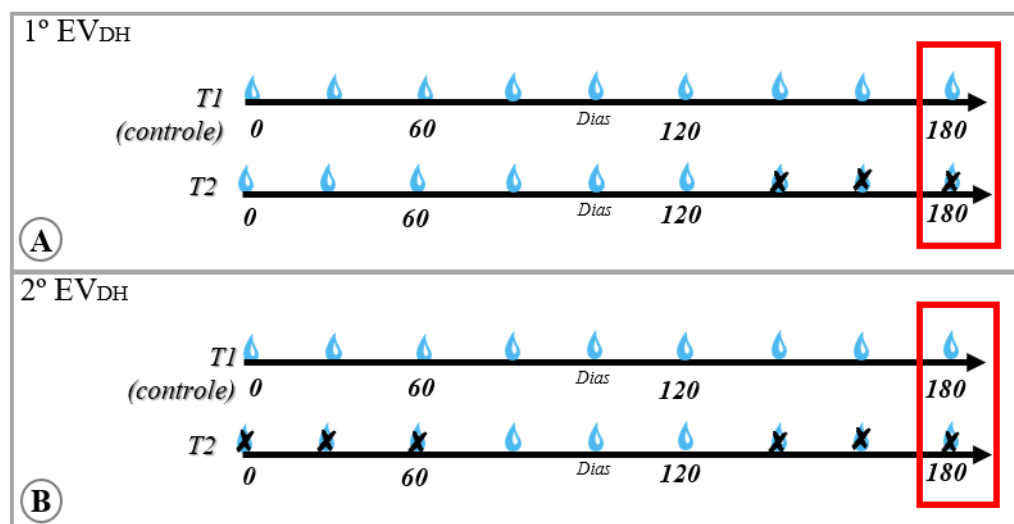


Fig 1 Desenho esquemático de delineamento experimental. (A) Grupo de plantas de 1º Evento de Déficit Hídrico (1º EV_{DH}) com plantas sempre expostas ao fornecimento hídrico ao longo de 180 dias de experimento (T1), e plantas que passaram por restrição hídrica nos 60 dias finais (T2). (B) Grupo 2º Evento de Déficit Hídrico (2º EV_{DH}), composto por plantas expostas 180 ao fornecimento hídrico (T1), e plantas submetidas aos 60 dias iniciais do experimento à restrição hídrica, com posterior período de recuperação com fornecimento hídrico nos 60 dias seguidos, e submetidas à nova restrição hídrica nos 60 dias finais do experimento (T2). Quadro vermelho indica período em que foram realizadas as coletas das relações hídricas, quantificação dos teores de lipoperóxidos foliar e avaliações de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* foliar. 1º EV_{DH} = 1º Evento de Déficit Hídrico; 2º EV_{DH} = 2º Evento de Déficit Hídrico

Relações hídricas

Para obtenção dos dados de relações hídricas foram avaliadas as seguintes variáveis: CRA e Ψ_w em todos os tecidos (folha, pseudobulbo e raiz). Para ambas as metodologias, a coleta de dados foi realizada no predawn (PD - 6:00h) e midday (MD- 12:00h), entretanto, por não haver variações significativas entre os períodos, optou-se por incluir neste trabalho apenas os dados de midday.

Conteúdo Relativo de Água (CRA)

Foram coletados 3 cm de raízes de cada indivíduo, desconsiderando 1 cm do ápice. Para folhas, foram utilizadas amostras de 2 cm² e para pseudobulbos, discos de aproximadamente 1,53 cm². Todas as amostras foram coletadas e imediatamente pesadas para determinar a massa fresca (MF). Logo após, as amostras foram imersas em água deionizada e acondicionadas por 24 horas a 5°C para reidratação de acordo com Elsheery e Cao (2008), e posteriormente determinado a massa túrgida (MT), e então secas a 60°C em estufa para determinação da massa seca (MS) (Barrs e Weatherley 1962). Foi utilizada balança de precisão de 0,0001g para

determinação dos MF, MT e MS. A partir da obtenção das massas, foi calculado com equações descritas por Witkowski e Lamont (1991), o CRA de cada tecido: $CRA \text{ (em \%)} = [(MF - MS)/(MT - MS)] * 100$.

Potencial hídrico (Ψ_w , MPa)

O potencial hídrico (Ψ_w) foi mensurado utilizando-se o Analisador de Potencial de Água com Controlador de Temperatura WP4-T (DECAGON DEVICES, EUA). As análises aconteceram imediatamente após a coleta do material biológico (amostras foliares, de pseudobulbo e radicular), sendo o resultado expresso em MPa.

Quantificação dos teores de lipoperóxidos

A peroxidação de lipídios foi determinada de acordo com a técnica descrita por Heath e Packer (1968), citados por Rama Devi e Prasad (1998). Dessa forma, em torno de 200mg de folhas foram moídas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 5 mL de solução contendo ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,25% e ácido tricloroacético (TCA) 10%. Em seguida foram incubadas em banho-maria a 90°C por 1h, e após o resfriamento os tubos foram centrifugados a 2.000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. Finalmente, o sobrenadante coletado de cada amostra foi submetido a leituras em duplicatas de absorbância em espectrofotômetro UV-visível a 560 e 600 nm.

Para os cálculos, utilizou-se o coeficiente de extinção molar do malondialdeído (155 $\text{mmol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Os resultados foram expressos em nmol de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) por g^{-1} de matéria fresca.

Fluorescência da Clorofila a

A fluorescência da clorofila *a* (Chl *a*) foi avaliada com medidor de amplitude modulado de fluorescência PAM – Junior (Chlorophyll – Fluorometer WALZ/Alemanha). Com o uso deste aparelho, foram obtidas as seguintes características fotoquímicas da fotossíntese nas folhas dos dois tratamentos: rendimento quântico efetivo do fotossistema II ($\Phi \text{ PSII} = \Delta F/\text{FM}'$) (Genty et al., 1989), taxa de transporte de elétrons ($\text{ETR} = \Delta F/\text{FM}' \times \text{DFFFA} \times 0.5 \times 0.84$), dissipação fotoquímica [$\text{qP} = (\text{FM}' - \text{FS}) / (\text{FM}' - \text{F0})$] e dissipação não-fotoquímica [$\text{NPQ} = (\text{FM}' - \text{FM}) / \text{FM}'$] (Maxwell e Johnson, 2000). Para estimar o ETR foi utilizado o valor de 0.5 como fração de energia de excitação distribuída entre os fotossistemas, e 0.84 como fração de

absorção de luz (Baker 2008). Os tecidos foram previamente aclimatados no escuro por 30 minutos antes de dar início às medições.

Medição de trocas gasosas

O medidor aberto portátil de trocas gasosas Infra Red Gas Analyser - “IRGA” (modelo LI-6400 - LI-COR) – foi usado para estimar a taxa de assimilação de CO₂ (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$), a taxa de transpiração (E , $\text{mmol vapor d'água m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e concentração interna de CO₂ (C_i , $\mu\text{molCO}_2 \text{ mol}^{-1}\text{ar}$). Dessa forma, também foram calculadas a eficiência do uso da água (EUA , $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O}^{-1})$) pela relação entre A/E (Berry & Downton, 1982), a eficiência da enzima de carboxilação, dada pela relação entre (A/C_i) . Como relatado por Hew e colaboradores (1998), para *Oncidium goldiana* a ponta da folha é o local de mais alta capacidade fotossintética em relação à lâmina foliar. Portanto, as medições foram realizadas nessa região em folhas jovens e completamente expandidas das duas espécies avaliadas.

Análise de Dados

Após o teste de normalidade Shapiro-Wilk ($P < 0,05$), os dados de cada variável foram submetidos a análise de variância (ANOVA) Two-way para comparar o desempenho das plantas submetidas aos dois tratamentos, dentre os grupos de 1º Evento de Déficit Hídrico e 2º Evento de Déficit Hídrico. As médias foram discriminadas usando o teste de comparação múltipla de Tukey com um nível de significância de 5%, sendo realizado com o programa SigmaPlot versão 12.0. A análise de variância possibilitou uma avaliação mais específica das respostas das plantas sob restrição hídrica aplicada em apenas um evento e em eventos recorrentes.

Para facilitar a interpretação de todo conjunto de características avaliadas e visualização de dados, realizamos a análise de componentes principais (PCA) e análise hierárquica de cluster (AHC) por método de aglomeração com média de grupo de pares não ponderada, em todas variáveis avaliadas. Para isso, foi utilizado o programa XLSTAT (Addinsoft 1995 - 2018). A complementaridade das técnicas AHC e PCA proporcionou a visualização do efeito de memória fisiológica entre as observações e variáveis avaliadas no estudo. O coeficiente cofenético foi calculado a partir dos índices de similaridade da matriz original e os índices reconstituídos com base no dendograma.

RESULTADOS

Relações hídricas

Para *G. flexuosa* o conteúdo relativo de água (CRA) em folhas, pseudobulbos e raízes não apresentaram diferenças significativas entre os grupos de 1º EV_{DH} e 2º EV_{DH}, tendo o tratamento com restrição hídrica (T2) apresentado menor CRA em pseudobulbos e raízes em ambos os grupos. Entretanto, o potencial hídrico foliar ($\Psi_{W \text{ foliar}}$) foi maior em plantas do grupo de 2º EV_{DH}, para ambos os tratamentos (**Tabela 1**). Já para *O. sphacelatum*, o CRA nos pseudobulbos do 2º EV_{DH} diminuiu no T2, ao mesmo tempo em que o CRA foliar foi mantido em 1º EV_{DH} e 2º EV_{DH} e aumentou na raiz. O Ψ_w de folhas, pseudobulbos e raízes não apresentaram alterações entre plantas de 1º e 2º evento de déficit hídrico (**Tabela 1**).

Fluorescência da Clorofila a e quantificação dos teores de lipoperóxidos

Em *G. flexuosa* não houve alterações em nenhuma variável de fluorescência da clorofila *a* quando comparado 1º EV_{DH} e 2º EV_{DH} (**Tabela 2**). Em *O. sphacelatum*, o ETR do T1 diminuiu em plantas do 2º EV_{DH}, assim como o NPQ de ambos os tratamentos diminuíram neste mesmo grupo de plantas (**Tabela 2**).

Não houve alterações da quantificação de lipoperóxidos em nenhum dos grupos de plantas avaliados, sendo que *G. flexuosa* apresentou média de $45,41 \pm 14,63$ nmol g⁻¹ MF no T1 e $29,77 \pm 5,25$ no T2 em plantas submetidas à 1º EV_{DH}; e $39,50 \pm 10,86$ no T1 e $37,17 \pm 4,87$ no T2 em plantas submetidas à 2º EV_{DH}. *Oncidium sphacelatum*, por sua vez, apresentou média de $26,68 \pm 3,09$ nmol g⁻¹ MF no T1 e $26,17 \pm 6,04$ no T2 em plantas submetidas à 1º EV_{DH}; e $29,48 \pm 4,18$ no T1 e $21,10 \pm 5,20$ no T2 em plantas submetidas à 2º EV_{DH}.

Trocas gasosas

G. flexuosa, no T2, apresentou redução em E, A e A/Ci no 2º EV_{DH}, com a quantidade de carbono interno permaneceu sem alterações entre plantas de 1º EV_{DH} e 2º EV_{DH}. No entanto, há aumento da eficiência do uso da água 2º EV_{DH} deste tratamento (**Tabela 3**). *O. sphacelatum* por sua vez, não apresenta diferenças significativas entre plantas de 1º EV_{DH} e 2º EV_{DH}, para nenhuma nas variáveis avaliadas, em ambos os tratamentos (**Tabela 3**).

Tabela 1. Comparação das relações hídricas de *G. flexuosa* e *O. sphacelatum* (midday) aos 180 dias nas duas condições experimentais, em plantas que passaram uma única vez pelo déficit hídrico e em plantas que foram submetidas duas vezes ao déficit hídrico

Variáveis	Espécie							
	<i>G. flexuosa</i>				<i>O. sphacelatum</i>			
	1° EVDH		2° EVDH		1° EVDH		2° EVDH	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
CRA Folha (%)	91,88±3,02Aa	91,39±1,81Aa	95,18±0,24Aa	87,78±5,19Aa	94,96±1,85Aa	96,01±2,02Aa	95,44±1,47Aa	95,45±0,21Aa
CRA Pseudobulbo (%)	69,81±11,90Aa	44,71±9,62Ab	71,35±2,67Aa	49,00±4,06Ab	89,29±13,17Aa	77,00±6,66Aa	92,87±2,40Aa	58,57±5,46Bb
CRA Raiz (%)	23,31±7,40Ba	9,56±1,04Ab	54,52±2,76Aa	8,59±1,36Ab	23,06±1,59Aa	3,15±0,52Bb	27,91±3,79Aa	15,93±4,82Ab
Ψ_W Folha (MPa)	-3,15±2,40Ba	-4,39±1,48Ba	-1,56±0,03Ab	-1,39±0,01Aa	-1,23±0,74Aa	-0,80±0,14Aa	-1,08±0,05Ab	-0,81±0,04Aa
Ψ_W Pseudobulbo (MPa)	-1,00±0,09Ba	-1,16±0,23Aa	-0,72±0,03Aa	-1,16±0,03Ab	-0,70±0,21Aa	-0,54±0,07Aa	-0,84±0,12Ab	-0,59±0,09Aa
Ψ_W Raiz (MPa)	-5,81±2,17Aa	-12,88±2,10Ab	-2,61±0,65Aa	-11,98±1,47Ab	-5,27±2,92Aa	-4,69±2,77Aa	-2,69±0,19Ab	-1,63±0,01Aa

Valores referentes às médias e desvio padrão. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA Two-Way) e posterior teste de Tukey com nível de significância a 5%. Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os períodos, para cada tratamento e letras minúsculas, diferenças significativas entre os tratamentos, em cada período. T1: fornecimento hídrico. T2: restrição hídrica. 1° EVDH = 1°Evento de Déficit Hídrico; 2° EVDH = 2° Evento de Déficit Hídrico.

Tabela 2. Comparação das variáveis de fluorescência da clorofila *a* de *G. flexuosa* e *O. sphacelatum* aos 180 dias nas duas condições experimentais, em plantas que passaram uma única vez pelo déficit hídrico e em plantas que foram submetidas duas vezes ao déficit hídrico

Variáveis	Espécie							
	<i>G. flexuosa</i>				<i>O. sphacelatum</i>			
	1° EV _{DH}		2° EV _{DH}		1° EV _{DH}		2° EV _{DH}	
T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2	
Φ PSII	0,11±0,02Aa	0,14±0,01Aa	0,12±0,01Ab	0,17±0,03Aa	0,13±0,01Aa	0,16±0,01Aa	0,13±0,01Aa	0,16±0,01Aa
ETR	77,45±4,53Aa	87,35±9,15Aa	73,80±3,80Ab	92,27±4,57Aa	84,55±5,05Aa	99,07±9,46Aa	60,90±8,50Bb	102,83±5,52Aa
qP	0,27±0,08Aa	0,41±0,14Aa	0,31±0,06Ab	0,53±0,03Aa	0,25±0,07Ab	0,54±0,08Aa	0,20±0,05Ab	0,61±0,01Aa
NPQ	2,48±0,06Ba	2,31±0,10Aa	2,82±0,07Aa	2,41±0,11Ab	1,57±0,06Aa	1,34±0,10Ab	1,08±0,03Ba	1,04±0,02Ba

Valores referentes às médias e desvio padrão. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA Two-Way) e posterior teste de Tukey com nível de significância a 5%. Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os períodos, para cada tratamento e letras minúsculas, diferenças significativas entre os tratamentos, em cada período. T1: fornecimento hídrico. T2: restrição hídrica. 1° EVDH = 1°Evento de Déficit Hídrico; 2° EVDH = 2° Evento de Déficit Hídrico.

Tabela 3. Comparação das variáveis de Trocas Gasosas de *G. flexuosa* e *O. sphacelatum* aos 180 dias nas duas condições experimentais, em plantas que passaram uma única vez pelo déficit hídrico e em plantas que foram submetidas duas vezes ao déficit hídrico

Variáveis	Espécie							
	<i>G. flexuosa</i>				<i>O. sphacelatum</i>			
	1° EVDH		2° EVDH		1° EVDH		2° EVDH	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
<i>E</i>	0,32±0,10Aa	0,28±0,01Aa	0,17±0,07Aa	0,05±0,02Bb	0,68±0,06A _a	0,22±0,12Ab	0,54±0,02Aa	0,21±0,10Ab
<i>A</i>	0,64±0,06Aa	0,73±0,08Aa	0,27±0,04Ba	0,29±0,08Ba	2,06±0,22A _a	0,10±0,03A _b	1,70±0,10Aa	0,10±0,01Ab
<i>Ci</i>	318,58±25,98Ba	341,29±31,69Aa	369,74±8,67Aa	339,22±31,51Aa	311,34±25,43A _b	366,56±16,95A _a	239,04±18,12Bb	364,31±11,94Aa
<i>A/Ci</i>	0,0020±0,0002Aa	0,0022±0,0004Aa	0,0015±0,0009Aa	0,0007±0,0004Ba	0,0067±0,0011A _a	0,0003±0,0001A _b	0,0071±0,0005Aa	0,0003±0,0001Ab
<i>A/E</i>	2,10±0,57Aa	2,65±0,39Ba	3,97±1,30Aa	4,88±1,67Aa	3,03±0,52A _a	0,42±0,20A _b	3,15±0,28Aa	0,56±0,31Ab

Valores referentes às médias e desvio padrão. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA Two-Way) e posterior teste de Tukey com nível de significância a 5%. Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os períodos, para cada tratamento e letras minúsculas, diferenças significativas entre os tratamentos, em cada período. T1: fornecimento hídrico.T2: restrição hídrica. 1° EVDH = 1°Evento de Déficit Hídrico; 2° EVDH = 2° Evento de Déficit Hídrico.

Conjunto de características avaliadas por Agrupamento Hierárquico Cluster (AHC) e Análise de componentes principais (PCA)

Obtivemos ajuste significativo entre a representação gráfica do dendograma e a matriz original do coeficiente de correlação de Pearson, com coeficiente de correlação cofenética de -0.801, que segue apresentada para as duas espécies.

O dendograma obtido pela análise de agrupamento hierárquico das variáveis de relações hídricas, trocas gasosas, quantificação de lipoperóxido e fluorescência da clorofila *a* referentes ao 1º Evento de Déficit Hídrico (1º EV_{DH}) e 2º Evento de Déficit Hídrico (2º EV_{DH}), para os tratamentos controle (T1) e restrição hídrica (T2), em *G. flexuosa* permitiu a formação de três grupos. O grupo I apresentou plantas do 2º EV_{DH} sob restrição hídrica (T2), enquanto no grupo II agruparam-se plantas com restrição hídrica (T1), ambas em 2º EV_{DH}. Já no grupo III agruparam-se plantas do 1º EV_{DH}, independente do tratamento (**Figura 2**).

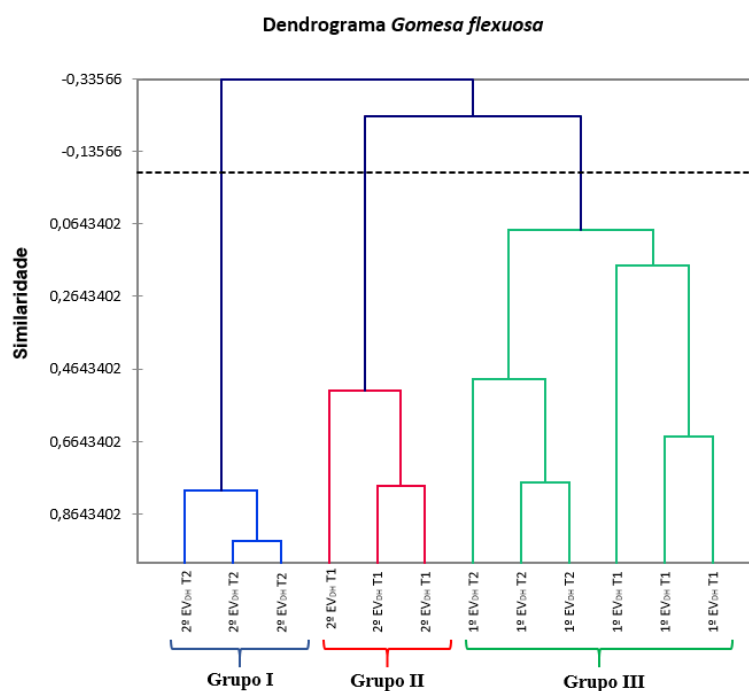


Fig 2 Dendrograma resultante do agrupamento hierárquico cluster (AHC) do 1º Evento de Déficit Hídrico (1º EV_{DH}) e 2º Evento de Déficit Hídrico (2º EV_{DH}), para o controle (T1) e restrição hídrica (T2), em *G. flexuosa*. Utilizamos a medida do coeficiente de correlação de Pearson com coeficiente cofenético (-0.801) para a obtenção da similaridade múltipla

Para essa espécie, a maior distância de conexão (eixo horizontal) verificada entre as observações foi determinada pelo T2 no 2º EV_{DH} e T1 no 1º EV_{DH}, de forma que as variáveis avaliadas nestes indivíduos são divergentes e apresentam as maiores diferenças entre os agrupamentos. Além disso, através das observações do nível de similaridade entre os

agrupamentos formados a partir da distância cofenética, podemos dizer que o grupo I quando comparado ao grupo III apresenta menor grau de similaridade entre as observações devido ao baixo valor no coeficiente de correlação (-0.318).

Dentre as variáveis avaliadas, observamos que os dois primeiros componentes principais (F1 e F2) explicam 69,10% da variação total (satisfatória, uma vez que a PCA é válida quando a soma das variâncias dos componentes principais atinge valores no intervalo de 60 a 95% da variância total (Hair et al. 2009).

A componente principal 1 (F1) está relacionada principalmente com as variáveis de $CRA_{Pseudobulbo}$, CRA_{Raiz} , $\Psi_W_{Pseudobulbo}$, Ψ_W_{Raiz} , ETR e NPQ (Tabela 4). As variáveis com elevados coeficientes de correlação apresentam as maiores contribuições percentuais (valores em negrito). Observamos essa relação nas variáveis $CRA_{Pseudobulbo}$, CRA_{Raiz} , $\Psi_W_{Pseudobulbo}$, Ψ_W_{Raiz} , e NPQ. A relação inversa foi observada no ETR, ou seja, quanto maior a contribuição percentual menor o valor do coeficiente de correlação (valor negativo).

A componente principal 2 (F2) foi representada principalmente pelas variáveis de trocas gasosas E , A , A/Ci , e também pelo Ψ_W_{Folha} . As variáveis de trocas gasosas indicaram relação positiva entre coeficiente de correlação e percentual de contribuição, enquanto o Ψ_W_{Folha} indicaram uma relação negativa (Tabela 4).

Tabela 4. Componentes principais F1 e F2. Cont. (%) são as contribuições percentuais das variáveis e R as correlações entre as variáveis nas componentes principais (F1 e F2). Negrito representa as maiores contribuições percentuais dentre as variáveis

Variáveis	F1		F2	
	R	Cont. (%)	R	Cont. (%)
<i>E</i>	0,350	1,795	0,849	17,092
<i>A</i>	0,094	0,128	0,691	11,320
<i>Ci</i>	0,288	1,214	-0,610	8,827
<i>A/Ci</i>	-0,174	0,441	0,956	21,635
<i>EUA</i>	-0,714	7,464	-0,368	3,209
Φ_{PSII}	-0,773	8,749	-0,468	5,179
<i>ETR</i>	-0,884	11,433	-0,204	0,989
<i>qP</i>	-0,760	8,456	-0,526	6,545
<i>NPQ</i>	0,807	9,529	-0,514	6,259
<i>Peroxidação</i>	0,376	2,067	0,024	0,014
CRA_{Folha}	0,559	4,565	0,033	0,026
$CRA_{Pseudobulbo}$	0,848	10,519	0,019	0,009
CRA_{Raiz}	0,917	12,308	-0,318	2,398
Ψ_W_{Folha}	0,068	0,067	-0,707	11,838
$\Psi_W_{Pseudobulbo}$	0,806	9,505	-0,375	3,330
Ψ_W_{Raiz}	0,897	11,760	-0,237	1,330

Em *O. sphacelatum*, dois grupos foram formados pelo Agrupamento Hierárquico Cluster (AHC). O primeiro foi resultante do agrupamento de plantas sob fornecimento hídrico (T1), independente de passarem por um evento único ou segundo evento de déficit. O segundo grupo, por sua vez, apresentou predomínio de plantas sob restrição hídrica (T2), igualmente independente de passarem por 1º EV_{DH} ou 2º EV_{DH} (**Figura 3**).

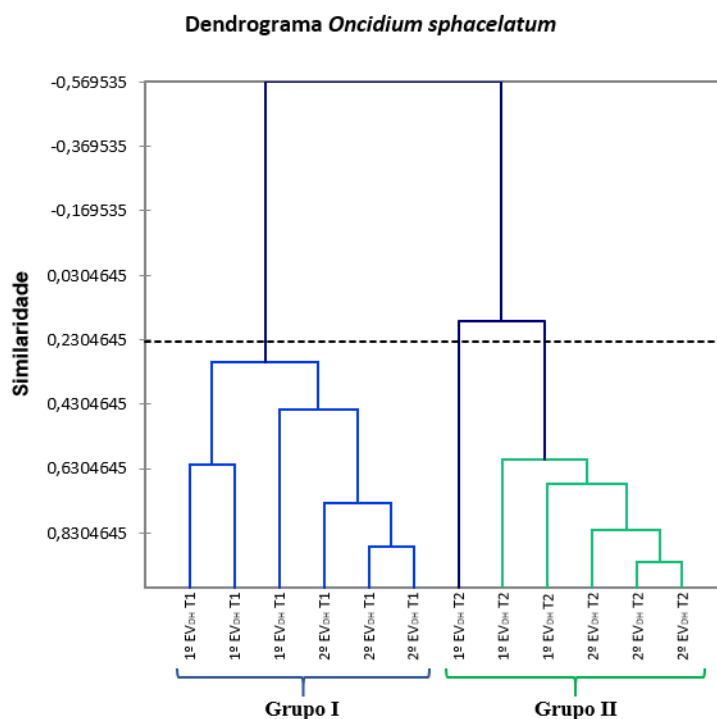


Fig 3 Dendrograma resultante do agrupamento hierárquico cluster (AHC) do 1º Evento de Déficit Hídrico (1º EV_{DH}) e 2º Evento de Déficit Hídrico (2º EV_{DH}), para o controle (T1) e restrição hídrica (T2), em *O. sphacelatum*. Utilizamos a medida do coeficiente de correlação de Pearson com coeficiente cofenético (-0.801) para a obtenção da similaridade múltipla

Assim como em *G. flexuosa*, a maior distância de conexão verificada entre as observações foi determinada pelo T2 no 2º EV_{DH} e T1 no 1º EV_{DH}, de forma que as variáveis avaliadas nestes indivíduos são divergentes e apresentam as maiores diferenças entre os agrupamentos. Contudo, observando o nível de similaridade entre os agrupamentos formados a partir da distância cofenética, podemos dizer que indivíduos de evento único e recorrente sob fornecimento hídrico (ambos pertencentes ao grupo I) apresentam similaridade entre suas variáveis devido ao valor de correlação (0.446) entre elas; assim como indivíduos de evento único e recorrente sob restrição hídrica (ambos pertencentes ao grupo II) apresentam similaridade entre suas variáveis devido ao valor de correlação (0.678) entre elas.

Observamos que os dois primeiros componentes principais (F1 e F2) explicam 73,15% da variação total, de modo que a componente principal 1 (F1) está relacionada principalmente com as variáveis C_i , A/C_i , EUA , $\Phi PSII$, ETR e qP , devido às elevadas contribuições percentuais. Entretanto, apenas A/C_i e EUA apresentam elevados coeficientes de correlação. A componente principal 2 (F2) foi representada principalmente pelas variáveis $\Psi_{W\text{ Raiz}}$, NPQ , CRA_{Folha} e peroxidação. As variáveis de relações hídricas indicaram relação negativa entre coeficiente de correlação e percentual de contribuição, enquanto NPQ e peroxidação indicaram uma relação positiva (**Tabela 5**).

Tabela 5. Componentes principais F1 e F2. Cont. (%) são as contribuições percentuais das variáveis e R as correlações entre as variáveis nas componentes principais (F1 e F2). Negrito representa as maiores contribuições percentuais dentre as variáveis

Variáveis	F1		F2	
	R	Cont. (%)	R	Cont. (%)
<i>E</i>	0,802	7,181	0,184	1,242
<i>A</i>	0,889	8,817	0,333	4,042
<i>C_i</i>	-0,907	9,184	-0,051	0,095
<i>A/C_i</i>	0,934	9,733	0,256	2,390
<i>EUA</i>	0,908	9,205	0,378	5,209
$\Phi PSII$	-0,867	8,384	-0,141	0,724
<i>ETR</i>	-0,898	9,005	-0,015	0,008
<i>qP</i>	-0,963	10,350	-0,186	1,262
<i>NPQ</i>	-0,008	0,001	0,780	22,207
<i>Peroxidação</i>	0,465	2,413	0,557	11,333
<i>CRA_{Folha}</i>	-0,041	0,019	-0,610	13,580
<i>CRA_{Pseudobulbo}</i>	0,820	7,506	0,135	0,669
<i>CRA_{Raiz}</i>	0,833	7,745	-0,100	0,366
$\Psi_{W\text{ Folha}}$	-0,588	3,858	0,202	1,485
$\Psi_{W\text{ Pseudobulbo}}$	-0,769	6,598	0,177	1,143
$\Psi_{W\text{ Raiz}}$	0,005	0,000	-0,968	34,242

A **figura 4** representa o gráfico de pontos do diagrama biplot e os quadrados representam os agrupamentos a partir das análises de agrupamento hierárquico cluster (AHC) para *G. flexuosa*. As componentes principais F1 e F2 descrevem 69,10% da variância nas variáveis, sendo que a primeira componente principal (F1) descreve 42,73% da variação total e a segunda (F2) 26,38% da variância.

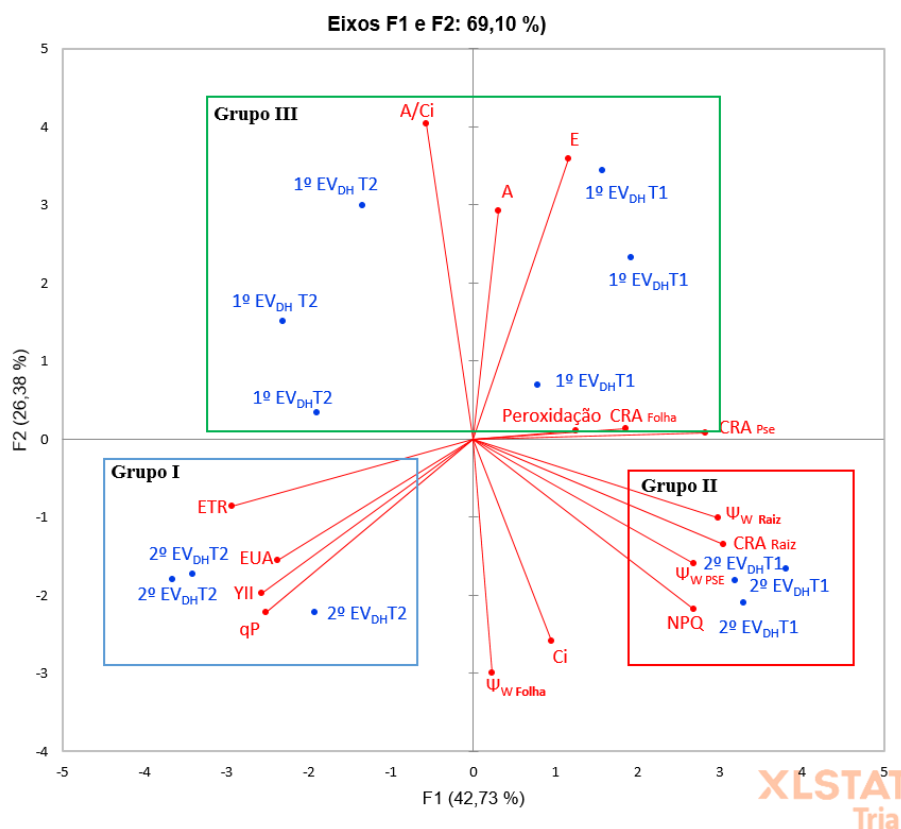


Fig 4 Diagrama biplot de ordenação das variáveis e suas observações nas duas primeiras componentes principais F1 e F2. Análise dos componentes principais (PCA) do 1^o Evento de Déficit Hídrico (1^o EV_{DH}) e 2^o Evento de Déficit Hídrico (2^o EV_{DH}), para o controle (T1) e restrição hídrica (T2), em *G. flexuosa*. Os quadrados representam os agrupamentos anteriores obtidos no agrupamento hierárquico cluster (AHC), sendo: quadrado azul: grupo I; quadrado vermelho: grupo II; quadrado verde: grupo III

A maioria das observações pertencentes ao grupo I apresentaram os menores valores para a componente principal F1. Tais observações foram influenciadas pelas variáveis de eficiência da carboxilação (*A/Ci*), eficiência no uso da água (*EUA*), rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Φ PSII), taxa de transporte de elétrons (*ETR*) e dissipação fotoquímica (*qP*). As observações do grupo II, por sua vez, tiveram os maiores valores na componente principal F1 (direita do eixo horizontal) por influência das variáveis de taxa de dissipação não fotoquímica (*NQ*), potencial hídrico do pseudobulbo (Ψ_W *Pseudobulbo*), potencial hídrico da raiz (Ψ_W *Raiz*), e conteúdo relativo de água da raiz (*CRA Raiz*). Além disso, observamos visualmente a dissimilaridade entre indivíduos do evento recorrente de estresse com e sem restrição hídrica, localizados nos extremos do eixo horizontal, indicando que os tratamentos geram respostas heterogêneas e suas variáveis são dissimilares em relação às demais.

O grupo III apresentou a formação de três subgrupos, sendo um com predomínio de plantas com restrição hídrica (T2), e os outros dois com plantas com fornecimento hídrico (T1), porém ambos oriundos do evento único de estresse. De forma geral, o subgrupo com plantas

sob restrição hídrica apresentou valores positivamente correlacionados de A/Ci, enquanto as plantas sob fornecimento hídrico, apresentou valores positivamente correlacionados de A e E na componente principal F2.

A **figura 5** representa o gráfico de pontos do diagrama biplot e os quadrados representam os agrupamentos a partir das análises de agrupamento hierárquico cluster (AHC) para *O. spachelatum*. As componentes principais F1 e F2 descrevem 73,15% da variância nas variáveis, sendo que a primeira componente principal (F1) descreve 57,99% da variação total e a segunda (F2) 15,16% da variância.

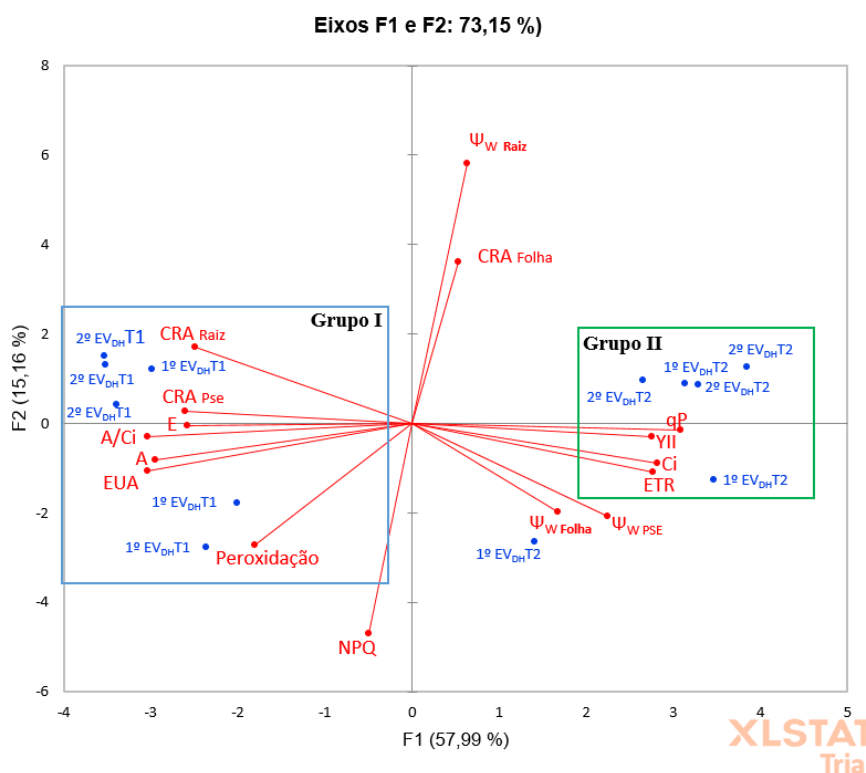


Fig 5 Diagrama biplot de ordenação das variáveis e suas observações nas duas primeiras componentes principais F1 e F2. Análise dos componentes principais (PCA) do 1º Evento de Déficit Hídrico (1º EV_{DH}) e 2º Evento de Déficit Hídrico (2º EV_{DH}), para o controle (T1) e restrição hídrica (T2), em *O. spachelatum*. Os quadrados representam os agrupamentos anteriores obtidos no agrupamento hierárquico cluster (AHC), sendo: quadrado azul: grupo I; quadrado verde: grupo II

A maioria das observações pertencentes ao grupo I apresentaram os menores valores para a componente principal F1. Tais observações foram influenciadas pelas variáveis de peroxidação, A, E, A/Ci, EUA, CRA Pseudobulbo e CRA Raiz. As observações do grupo II, por sua vez, tiveram os maiores valores na componente principal F1 por influência das variáveis de fluorescência da clorofila *a* (Φ PSII, ETR, e qP), além da concentração interna de carbono (Ci). Com isso, há uma grande dissimilaridade entre indivíduos com restrição hídrica e com fornecimento hídrico independente do evento único ou recorrente de estresse.

DISCUSSÃO

Dentre as consequências fisiológicas causadas pela restrição hídrica, a mais expressiva é a inibição da fotossíntese (Chaves 1991), sendo dada principalmente pelo fechamento estomático, cuja limitação aumenta à medida que o estresse se prolonga (Yordanov et al. 2003).

Gomesa flexuosa, sob essa condição, diminuiu a transpiração e assimilação de carbono no segundo evento de estresse, ou seja, coordenou melhor o fechamento estomático em resposta a exposições subsequentes de restrição hídrica (Virouvet e Fromm 2015), embora isso tenha resultado em difusão reduzida de CO₂ atmosférico para o local de carboxilação (Grassi e Magnani 2005; Flexas et al. 2006).

Essa diminuição da assimilação de CO₂ e conseqüentemente da eficiência da rubisco (*A/Ci*) em plantas do segundo evento de estresse, no entanto, não altera quantidade de carbono interno na espécie. Isso revela que pouco carbono pode estar sendo utilizado, uma vez que diversos estudos relatam que o estresse hídrico pode comprometer em específico a atividade da Rubisco, assim como a regeneração da RuBP (Gunasekera e Berkowitz 1993; Lawlor e Cornic 2002; Dias e Brüggemann 2007). Outra hipótese seria a refixação de CO₂ por órgãos não-foliáres, completamente independente das fontes atmosféricas de CO₂. No caso de Orchidaceae, o metabolismo fotossintético nas raízes, por exemplo, pode assumir o papel de ciclagem de CO₂ (Moreira et al. 2009). Assim, a refixação de CO₂ é muito menos afetada por tensões ambientais, e esse processo pode permitir a captura eficiente de CO₂ quando o suprimento efetivo de carbono é limitado, como em condições de calor ou seca (Rangan et al. 2016).

Apesar disso, a eficiência do uso da água aumentou em plantas submetidas ao segundo evento de restrição hídrica, o que indica grande adaptabilidade da planta sob condições limitadas de água, uma vez que a *EUA* é uma característica funcional relacionada ao crescimento, produtividade e desempenho das plantas (Liu et al. 2019). Ademais, maior *EUA* poderia ser promovida pelo grau de refixação do CO₂ respirado como elucidado por Bort e colaboradores (1994). Dessa forma, o aumento da eficiência do uso da água para esta espécie pode ser visto como o principal mecanismo, em condições desfavoráveis, de responder à exposição prévia a um fator de estresse abiótico, tornando a planta mais tolerante ao estresse futuro. Este ajuste se deve ao fato de *Gomesa flexuosa* ser uma espécie CAM facultativa fraca no pseudobulbo enquanto as folhas permanecem com metabolismo fotossintético C₃ (Joca, 2020), cujo metabolismo é acionado ambientalmente e regulado em resposta ao estresse por déficit hídrico (Winter 2019). Pelo fato da quantidade de carbono interno nas folhas permanecer a mesma ao longo dos estresses aplicados, essa conversão metabólica no pseudobulbo funciona essencialmente para a refixação do carbono respiratório produzido pelo parênquima maciço

subjacente (Hew e Yong 1994), garantindo importante economia de água para a espécie a longo prazo (Cornic e Fresneau 2002; Rodrigues et al. 2013).

Essa conversão frente às alterações nas variáveis fotossintéticas pode ser gerada por aspectos que vão desde a mobilização de metabólitos e recrutamento hormonal, até algumas alterações epigenéticas. Em última instância, essas alterações levam a algum tipo de aprendizado e memorização da experiência anterior, a fim de otimizar sua performance, permitindo uma aclimação efetiva às tensões ambientais e pode ser considerada como uma forma específica de inteligência (Grzesiak et al. 2019).

Apesar da espécie não apresentar alteração no conteúdo relativo de água dos órgãos avaliados no 1º e 2º evento de déficit hídrico, principalmente no tratamento sob restrição hídrica, o potencial hídrico foliar aumentou em plantas que passaram pelo 2º EV_{DH}. Com isso, evidenciamos que todo o ajuste que *G. flexuosa* fez nos parâmetros fotossintéticos, não teve maior “custo” nas relações hídricas, principalmente pela baixa de transpiração verificada. Tolerar o estresse hídrico é manter a estabilidade das funções metabólicas, mesmo com baixos potenciais de água nos tecidos, através de ajustes fisiológicos, bioquímicos e moleculares específicos de células e tecidos (Lisar et al. 2012). Neste caso, o fechamento efetivo dos estômatos é consistente com o uso eficiente da água, evitando uma falha hidráulica (Brodrigg e Holbrook 2004).

Para *O. sphacelatum*, não houve alterações nos parâmetros de trocas gasosas entre o 1º e 2º evento, sendo que o tratamento com restrição hídrica apresentou baixos valores em todas as variáveis avaliadas em relação ao controle. Sendo assim, fica claro que essa espécie, não alterando as respostas fisiológicas em decorrência de exposições sucessivas à restrição hídrica, não sugere evidências de que há uma aclimação fisiológica ou ajuste das respostas ao segundo evento de seca, como reportado em diversos trabalhos (Bruce et al. 2007; FletaSoriano e Munné-Bosch 2016; Menezes-Silva et al. 2017). Apesar disso, o conteúdo de água nos pseudobulbos diminui em condições de restrição hídrica, ao mesmo tempo em que o conteúdo de folhas é mantido e o da raiz aumenta neste tratamento. O potencial hídrico por sua vez, é mantido em todos os órgãos durante o 1º e 2º EV_{DH}. Ou seja, o pseudobulbo funciona como órgão de reserva que auxilia na manutenção hídrica dos outros órgãos quando estão sob seca, indicando que a água armazenada neste órgão pode ser transportada para as folhas sob tais condições de estresse, como observado também em Stancato e colaboradores (2001), He e colaboradores (2013) e Yang e colaboradores (2016).

Apesar do valor reconhecido dos pseudobulbos, a maioria dos trabalhos sobre balanço hídrico em epífitas vasculares tem se concentrado principalmente em suas folhas (Sun et al. 2014; Zhang et al. 2015). Mas, apesar de apresentar limitada capacidade fotossintética em

relação às folhas, este órgão está intimamente relacionado com a regulação do balanço hídrico na planta como um todo, sendo determinante para a sobrevivência e capacidade de manutenção da espécie numa condição adversa em ambiente natural.

É sabido que a seca combinada à alta exposição à luz, afetam negativamente a funcionalidade do PSII e reduz o transporte de elétrons através deles, e em última instância, resulta em uma baixa produção de ATP e NADPH, produtos essenciais para a fixação de CO₂ na fase II da fotossíntese (Baker e Rosenqvist 2004). Além disso, em condições de restrição hídrica, assim como sob outros estresses bióticos e abióticos, pode haver o estresse oxidativo gerando injúrias no tecido vegetal e processos oxidativos responsáveis pela geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) (Gaspar et al. 2002; Resende et al. 2003). As ERO, como o oxigênio singlete (¹O₂), peróxidos de hidrogênio (H₂O₂) e os radicais superóxido (O₂⁻), apesar de ocorrerem normalmente no metabolismo celular, quando acumuladas tornam-se tóxicas à célula (Resende et al. 2003), causando prejuízos a nível celular e alterando o metabolismo normal das plantas através de danos oxidativos em lípideos, proteínas, ácidos nucleicos, enzimas e os pigmentos fotossintéticos (Smirnoff 1993). Entretanto, as espécies parecem lidar bem com o comprometimento induzido pelo estresse dos fotossistemas, uma vez que quando comparado com o controle, o aparato fotoquímico está funcionando de maneira mais eficiente nos períodos de estresse, corroborando algumas pesquisas em que é sugerido que as epífitas podem ser muito eficazes na manutenção de sua integridade fotoquímica sob condições de seca (Maxwell et al. 1992).

A complementaridade das técnicas AHC e PCA permitiu relacionar os grupos formados pelo AHC e as componentes principais obtidas na PCA, de forma a obtermos o agrupamento de plantas que passaram pela restrição hídrica por duas vezes (grupo I), plantas que tiveram fornecimento hídrico por todo o experimento (grupo II) e plantas que passaram por apenas um evento de fornecimento e restrição hídrica (grupo III), em *G. flexuosa*. No grupo I, o uso eficiente da água proporcionou um melhor desempenho do fotossistema II e a manutenção no fluxo de elétrons, indicando garantia na eficiência fotossintética mesmo em situação de baixa disponibilidade hídrica (Baker 2008), o que culminou na maior transformação da energia luminosa em química nos fotossistemas (qP). Este grupo, constituído por plantas que passaram pela segunda vez pelo evento de estresse hídrico, demonstra que a espécie possui a capacidade de armazenar informações sobre experiências prévias, de forma a reagir de forma mais eficiente quando comparada às situações passadas (Witzany 2018). O processo de aprendizagem em questão se dá por mudanças substanciais no organismo, detectado por meio de comparações das performances à uma experiência anterior (Kawecki 2010), como no caso do grupo III. Este grupo por sua vez, mais influenciado por variáveis de trocas gasosas, apresentou uma

inconstância em meio aos parâmetros avaliados, com respostas heterogêneas, indicando que no primeiro evento sob restrição hídrica, pode haver uma desregulação metabólica em meio ao reconhecimento daquelas condições vivenciadas pela primeira vez.

A regulação hídrica eficiente e a dissipação não fotoquímica no grupo II desta espécie, demonstra que houve um processo fotoprotetor que remove o excesso de energia de excitação nos complexos contendo clorofila, e evita a probabilidade de formação de radicais livres prejudiciais (Murchie e Lawson 2013). Esse tipo de resfriamento compete com o resfriamento por fluorescência e fotoquímico e atua como um mecanismo “seguro” para dissipar níveis substanciais de energia de excitação por clorofila, ao mesmo tempo em que protege o aparelho fotossintético contra o dano oxidativo, desempenhando um papel fundamental na proteção do PSII (Parida et al. 2007; Demmig-Adams e Adams 2006).

Em *O. sphacelatum*, a recorrência dessas plantas às condições experimentais em 1º e 2º evento de déficit hídrico parece não resultar na distinção das respostas fisiológicas, uma vez que são formados agrupamentos frente ao fornecimento (Grupo I) e restrição hídrica (Grupo II). O grupo I foi formado especialmente por influências de variáveis de trocas gasosas e conteúdo relativo de água. Isso indica que a eficiência das variáveis fotossintéticas é mais efetiva nos tratamentos com disponibilidade hídrica, uma vez que a sensibilidade dos processos fisiológicos é inerente à disponibilidade deste recurso e revela, em grande parte, um reflexo da estratégia da planta em lidar com a faixa de variação na disponibilidade de água que ela experimenta em seu ambiente (Goudriaan et al. 1985; Abbate et al. 2004; Chaves et al. 2004; Taiz e Zeiger 2017). Já o grupo II, enfrenta respostas relacionadas à concentração de carbono interno e parâmetros de fluorescência da clorofila *a*. Uma vez que o maior acúmulo de CO₂ pode refletir a foto-destruição dos pigmentos fotossintetizantes, prejudicando a incorporação e fixação de carbono (Araújo e Deminicis 2009; Minardi et al. 2014), os valores de PSII, ETR e qP em destaque sugerem mais uma vez que o aparato fotquímico não foi prejudicado, em parte pelo mecanismo fotoprotetor pela capacidade de dissipação de ATP e poder redutor, o que estimula a utilização de fótons mesmo em condições limitadas de CO₂ e previne o aparato fotossintético contra danos oxidativos (Sperling et al. 2014; Zhang et al. 2016).

Apesar da compreensão dos fatores que influenciam o crescimento das epífitas estarem sendo aprofundados nos últimos anos, o conhecimento sobre os “tradeoffs” dos ajustes ecofisiológicos envolvendo o agrupamento de variáveis resposta que permitam gerar respostas padrões nestas plantas ainda enfrenta muitas limitações. A memória fisiológica proposta aqui para a espécie *G. flexuosa*, que em um segundo evento de estresse hídrico responde de maneira distinta das plantas submetidas à outras condições, nos fornece ainda mais indícios do que se espera para o cultivo de espécies da subtribo Oncidiinae. Ao ampliarmos as análises a partir do

conhecimento obtido, a fim de gerar um ponto de vista mais sistêmico dos níveis de alterações promovidas nessas situações, é levantada a questão se para *G. flexuosa* poderia haver diminuição da oferta hídrica durante o cultivo, uma vez que passando por essa situação de forma recorrente, haveria uma memória fisiológica que lhe permitisse ajustes a longo prazo. Já para *O. sphacelatum*, por não apresentar grandes alterações em meio aos períodos de restrição hídrica, seria invariavelmente de manejo mais fácil? Em condições naturais, *G. flexuosa* poderia ter maior desempenho com as alterações globais que já ocorrem sob ela, enquanto *O. sphacelatum*, teria um maior custo para se manter de forma eficiente com as possíveis alterações?

Em vista de tais indagações que surgem nesta perspectiva, mesmo sabendo que o ponto crucial para essas orquídeas epífitas é a economia da água, onde a alta evapotranspiração combinada com o escasso suprimento de água desafia o balanço hídrico da planta (Benzing, 1998) é necessário investigar quando sofrem estresse devido à alta irradiância combinada com períodos de baixa pluviosidade prolongada, pois estes fatores afetam significativamente o metabolismo e levam a um crescimento e produtividade reduzidos. A alta irradiância pode gerar problemas drásticos no cultivo e estabelecimento de orquídeas, como redução no rendimento quântico fotossintético, perda de clorofila foliar e uma maior suscetibilidade à fotoinibição (He et al. 1995; Lichtenthale et al. 1981), e será melhor investigada no capítulo a seguir.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbate PE, Dardanelli JL, Cantarero MG et al (2004) Climatic and water availability effects on water-use efficiency in wheat. *Crop Sci* 44(2) :474-483. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.4740>
- Araújo SAC, Deminicis BB (2009) Fotoinibição da fotossíntese. *R. bras. Bioci* 7(4): 463-472
- Avramova Z (2015) Transcriptional “memory” of a stress: transient chromatin and memory (epigenetic) marks at stress-response genes. *Plant J* 83: 149–159. <https://doi.org/10.1111/tpj.12832>
- Baker NR (2008) Chlorophyll fluorescence *a* probe of photosynthesis. In *Vivo Review of Plant Biology, Annu Rev Plant Biol* 59: 89-113. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759>
- Baker NR, Rosenqvist E (2004). Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *J Exp Bot* 55(403): 1607-1621. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh196>

- Baluška F, Mancuso S (2018) Plant Cognition and Behavior: From Environmental Awareness to Synaptic Circuits Navigating Root Apices. In: Baluška, František; Gagliano, Monica; Witzany, Guenther (Eds.). *Memory and Learning in Plants*. 1. ed. Cham: Springer International Publishing.
- Barrs HD, Weatherley PE (1962) A re-examination of relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Aust J Biol Sci* 15: 413-428. <https://doi.org/10.1071/BI9620413>
- Benzing DH (1990) *Vascular Epiphytes*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Benzing D (1998) Vulnerabilities of Tropical Forests to Climate Change: The Significance of Resident Epiphytes. *J Clim* 39, 519-540. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1005312307709>
- Berry JA, Downton WJS (1982) Environmental regulation of photosynthesis. In: Govindjee (Editor), *Photosynthesis: Development, Carbon Metabolism and Plant Productivity*, v. 2. p.263-343, New York: Academic Press.
- Bort J, Febrero A, Amaro T, Araus JL (1994). Role of awns in ear water-use efficiency and grain weight in barley. *Agronomie* 14(2): 133-139.
- Brodribb TJ, Holbrook NM (2004) Stomatal protection against hydraulic failure: a comparison of coexisting ferns and angiosperms. *New Phytol* 162: 663-670. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01060.x>
- Bruce TJA, Matthes MC, Napier JA, Pickett JA (2007) Stressful memories of plants: evidence and possible mechanisms. *Plant Sci.* 173: 603-608. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.09.002>
- Buckley TN (2019) How do stomata respond to water status? *New Phytol* 224(1): 21-36. <https://doi.org/10.1111/nph.15899>
- Chase MW, Cameron KM; Freudenstein JV et al (2015) An updated classification of Orchidaceae. *Bot J Lin Soc* 177: 151-174. <https://doi.org/10.1111/boj.12234>
- Chaves MM (1991) Effects of water deficits on carbon assimilation. *J Exp Bot* 42: 1-16. <https://doi.org/10.1093/jxb/42.1.1>
- Chaves MM, Osorio J, Pereira JS (2004) *Water use efficiency and photosynthesis*. CRC Press: Boca Raton, FL, p. 42-74
- Cornic G, Fresneau C (2002) Photosynthetic carbon reduction and carbon oxidation cycles are the main electron sinks for photosystem II activity during a mild drought. *Ann Bot* 89: 887-894. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf064>
- Crisp PA, Ganguly D, Eichten SR et al (2016) Reconsidering plant memory: Intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. *Sci Adv* 2(2): e1501340 <https://10.1126/sciadv.1501340>

- Crisp PA, Ganguly D, Smith AB et al (2017) Rapid recovery gene downregulation during excess-light stress and recovery in Arabidopsis. *Plant Cell* 29:1836–1863. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00828>
- de Guedes FA, Nobres P, Rodrigues Ferreira DC et al (2018) Transcriptional memory contributes to drought tolerance in coffee (*Coffea canephora*) plants. *Environ Exp Bot* 147:220–233. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.12.004>
- de Guedes FA, Menezes-Silva PE, DaMatta FM et al (2019). Using transcriptomics to assess plant stress memory. *Theor Exp Plant Physiol* 31(1): 47-58. <https://doi.org/10.1007/s40626-018-0135-0>
- Demmig-Adams, B, Adams III, William W (2006) Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal energy dissipation. *New Phytol.* 172(1):11-21. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01835.x>
- Dias MC, Brüggemann W (2007). Differential inhibition of photosynthesis under drought stress in Flaveria species with different degrees of development of the C4 syndrome. *Photosynth*, 45(1): 75-84. <https://doi.org/10.1007/s11099-007-0012-6>
- Ding Y, Liu N, Virlovet L et al (2013) Four distinct types of dehydration stress memory genes in Arabidopsis thaliana. *BMC Plant Biol* 13:229. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-229>
- Ding Y, Virlovet L, Liu N et al (2014) Dehydration stress memory genes of *Zea mays*; comparison with *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* 14:1-15. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-141>
- Elsheery NI, Cao EKF (2008) Gas exchange, chlorophyll fluorescence, and osmotic adjustment in two mango cultivars under drought stress. *Acta Physiol Plant* 30:769-777. <https://doi.org/10.1007/s11738-008-0179-x>
- Fleta-Soriano E, Munné-Bosch S (2016) Stress memory and the inevitable effects of drought: a physiological perspective. *Front Plant Sci.* 7: 143. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00143>
- Flexas J, Bota J, Galmés J et al (2006) Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. *Physiol. Plant.* 127: 343-352. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00621.x>
- Gagliano M, Vyazovskiy VV, Borbély A. A et al. (2016) Learning by Association in Plants. *Scientific Reports* 6(1):38427. <https://doi.org/10.1038/srep38427>
- Gaspar T, Franck T, Bisbis B et al (2002) Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regul* 37:263-285. <https://doi.org/10.1023/A:1020835304842>

- Genty B, Briantais JM, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys Acta* 990: 87-92. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(89\)80016-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(89)80016-9)
- Goudriaan J, Van Laar HH, Van Keulen H et al (1985). Photosynthesis, CO₂ and plant production. In *Wheat growth and modelling* (pp. 107-122). Springer, Boston, MA.
- Grassi G, Magnani F (2005) Stomatal, mesophyll conductance and biochemical limitations to photosynthesis as affected by drought and leaf ontogeny in ash and oak trees. *Plant Cell Environ* 28: 834-849. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01333.x>
- Grzesiak S, Hordyńska N, Szczyrek P et al (2019) Variation among wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes in response to the drought stress: I–selection approaches. *Plant Int J*, 14(1): 30-44. <https://doi.org/10.1080/17429145.2018.1550817>
- Guedes AF, Menezes-Silva PE, DaMatta FM et al (2019) Using transcriptomics to assess plant stress memory. *Theor. Exp. Plant Physiol.* 31: 47-58. <https://doi.org/10.1007/s40626-018-0135-0>
- Gunasekera D, Berkowitz GA (1993) Use of transgenic plants with ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase antisense DNA to evaluate the rate limitation of photosynthesis under water-stress. *Plant Physiol* 103: 629-635. <https://doi.org/10.1104/pp.103.2.629>
- He L, Yang X, Wang L et al (2013) Molecular cloning and functional characterization of a novel cotton CBL-interacting protein kinase gene (GhCIPK6) reveals its involvement in multiple abiotic stress tolerance in transgenic plants. *Biochem Biophys Res Commun* 435: 209-215. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.04.080>
- Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetic and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 125:189-98. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- Hew CS, Yong JWH (1994) Growth and photosynthesis of *Oncidium* ‘Goldiana’. *J Horticult Sci* 69:809–819. <https://doi.org/10.1080/14620316.1994.11516517>
- He J, Khoo GH, Hew CS (1998) Susceptibility of CAM *Dendrobium* Leaves and Flowers to High Light and High Temperature under Natural Tropical Conditions. *Environ Exp Bot* 40: 255-264. [http://dx.doi.org/10.1016/S0098-8472\(98\)00042-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0098-8472(98)00042-2)
- Joca, TAC (2020) Respostas fisiológicas envolvidas na tolerância a restrição hídrica e estresse luminoso em *Orchidaceae* epífitas. 114p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas/Botânica) – Instituto de Biociências, UNESP, Universidade Estadual Paulista, Botucatu
- Jones HG (1992). *Plants and microclimate: A quantitative approach to environmental plant physiology*. Cambridge University Press.

- Kawecki TJ (2010) Evolutionary ecology of learning: insights from fruit flies. *Popul Ecol* 52(1):15-25. <https://doi.org/10.1007/s10144-009-0174-0>
- Lawlor DW, Cornic G (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environ* 25: 275-294. <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00814.x>
- Lichtenthaler HK, Buschmann C, Döll M et al (1981) Photosynthetic Activity, Chloroplast Ultrastructure, and Leaf Characteristics of High-Light and Low-Light Plants and of Sun and Shade Leaves. *Photosynth Res*, 2: 115-141. <https://doi.org/10.1007/BF00028752>
- Lisar SYS, Motafakkerazad R, Hossain MM et al (2012) Water stress in plants: Causes, effects and responses. In *Water Stress*; Rahman, M.; Hasegawa, H. Eds. Croatia: InTech, Rijeka.
- Liu B, Liang J, Tang G et al (2019) Drought stress affects on growth, water use efficiency, gas exchange and chlorophyll fluorescence of *Juglans* rootstocks. *Sci Hort*, 250: 230-235. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.02.056>
- Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence: a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51: 659-668. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659>
- Maxwell C, Griffiths H, Borland AM et al (1992) Photoinhibitory responses of the epiphytic bromeliad *Guzmania monostachia* during the dry season in Trinidad maintain photochemical integrity under adverse conditions. *Plant Cell Environ* 15:37- 47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1992.tb01456.x>
- Menezes-Silva PE, Sanglard LMVP, A ´vila RT et al (2017) Photosynthetic and metabolic acclimation to repeated drought events play key roles in drought tolerance in coffee. *J Exp Bot* 68:4309-4322. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx211>
- Minardi BD (2014) The Epiphytic Fern *Elaphoglossum luridum* (Fée) Christ. (Dryopteridaceae) from Central and South America: Morphological and Physiological Responses to Water Stress. *Sci World J*, 2014:1-9. <https://doi.org/10.1155/2014/817892>
- Moreira ASFP, Lemos-Filho JP, Zotz G et al (2009) Anatomy and photosynthetic parameters of roots and leaves of two shade-adapted orchids, *Dichaea cogniauxiana* Shltr. and *Epidendrum secundum* Jacq. *Flora*, 204:604-611. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2008.08.003>
- Murchie EH, Lawson T (2013) Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *J Exp Bot* 64: 3983–3998. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert208>
- Parida AK, Dagaonkar VS, Phalak MS et al. (2007) Alterations in photosynthetic pigments, protein and osmotic components in cotton genotypes subjected to short-term drought

- stress followed by recovery. *Plant Biotechnol Rep* 1:37-48.
<https://doi.org/10.1007/s11816-006-0004-1>
- Qin F, Xu HL, Ci D (2017) Drought stimulation by hypocotyl exposure altered physiological responses to subsequent drought stress in peanut seedlings. *Acta Physiol Plant* 39(7): 152.
<https://doi.org/10.1007/s11738-017-2447-0>
- Rama Devi S, Prasad MNV (1998) Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: response of antioxidant enzymes and antioxidants. *Plant Sci.*, 138: 157-65. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00161-7](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00161-7)
- Rangan P, Furtado A, Henry RJ (2016) New evidence for grain specific C4 photosynthesis in wheat. *Sci Rep* 6: 31721. <https://doi.org/10.1038/srep31721>
- Resende MLV, Salgado SML, Chaves ZM (2003) Espécies Ativas de Oxigênio na Resposta de Defesa de Plantas a Patógenos. *Fitopatol bras* 28(2): 123-130.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582003000200001>
- Rodrigues MA, Matiz A, Cruz AB et al (2013) 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. <https://doi.org/10.1093/aob/mct090>
- Smirnoff N (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol* 125: 27-58.
- Sparks JP, Black RA (1999) Regulation of water loss in populations of *Populus trichocarpa*: the role of stomatal control in preventing xylem cavitation. *Tree Physiol*, 19(7): 453-459.
<https://doi.org/10.1093/treephys/19.7.453>
- Sperling O, Lazarovitch N, Schwartz A et al (2014) 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. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.10.014>
- Stancato GC, Mazzafera P, Buckeridge MS (2001) Effect of a drought period on the mobilisation of non-structural carbohydrates, photosynthetic efficiency and water status in an epiphytic orchid. *Plant Physiol Biochem* 39:1009-1016.
[https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(01\)01321-3](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(01)01321-3)
- Sun M, Yang SJ, Zhang JL et al. (2014) Correlated evolution in traits influencing leaf water balance in *Dendrobium* (Orchidaceae). *Plant Ecol* 215:1255-1267.
<https://doi.org/10.1007/s11258-014-0383-2>
- Taiz L, Zeiger E, Møller IM et al. (2017) *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 888p.

- Wang TS, Frioni T, Poni S et al (2018) Effect of water stress “memory” on plant behavior during subsequent drought stress. *Environ Exp Bot* 150:106-114. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.03.009>
- Virlovet L, Fromm M (2015) Physiological and transcriptional memory in guard cells during repetitive dehydration stress. *New Phytol* 205:596–607. <https://doi.org/10.1111/nph.13080>
- Walter J, Nagy L, Hein R et al (2011) Do plants remember drought? Hints towards a drought-memory in grasses. *Environ Exp Bot* 71:34–40. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.10.020>
- Witkowski ETF, Lamont BB (1991) Leaf specific mass confounds leaf density and thickness. *Oecologia*, 88: 486-493. <https://doi.org/10.1007/BF00317710>
- Witzany G (2018) Memory and Learning as Key Competences of Living Organisms. In: Baluska F, Gagliano M, Witzany G (Eds.). *Memory and Learning in Plants*. 1. ed. Cham: Springer International Publishing, p. 223.
- Yang SJ, Sun M, Yang QY et al. (2016) Two strategies by epiphytic orchids for maintaining water balance: thick cuticles in leaves and water storage in pseudobulbs, *AoB Plants*, 8:1-11. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plw046>
- Yamani EIM, Boussakouran A, Rharrabti Y (2020). Leaf water status, physiological behavior and biochemical mechanism involved in young olive plants under water deficit. *Sci Hort*, 261: 108906. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108906>
- Yordanov I, Velikova V, Tsonev T (2003) Plant responses to drought and stress tolerance. *Bulg. J. Plant Physiol.* 38: 187–206.
- Zhang GQ, Xu Q, Bian C et al (2016) The *Dendrobium catenatum* Lindl. genome sequence provides insights into polysaccharide synthase, floral development and adaptive evolution. *Sci Rep* 6: 1-10. <https://doi.org/10.1038/srep19029>
- Zotz G, Hietz P (2001) The physiological ecology of vascular epiphytes: current knowledge, open questions. *J Exp Bot* 52(364): 2067-2078. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.364.2067>

CAPÍTULO 3

Desempenho de *Gomesa flexuosa* Sims e *Oncidium sphacelatum* Lindley em diferentes regimes luminosos sob influência de fornecimento e restrição hídrica

JOCA, T.A.C.¹; BERTHOLDI, A.A.S.¹; MOREIRA, A. S. F. P.²; ALMEIDA, L. F. R.¹

¹Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) / Departamento de Botânica / Instituto de Biociências - Rubião Junior – 18618970 - Botucatu, SP – Brasil.

² Universidade Federal de Uberlândia/ Campus Umuarama/ Instituto de Biologia - R. Ceará, s/n - 38400902, Uberlândia - Minas Gerais - Brasil

RESUMO

A restrição hídrica já comum ao habitat epifítico frequentemente é acompanhada por altas incidências luminosas. As adaptações existentes permitem aumentar a captação de CO₂, reduzir a perda de água e otimizar o armazenamento deste recurso nas espécies *Gomesa flexuosa* e *Oncidium sphacelatum*. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi investigar se a disponibilidade de água combinada com a influência da luz afeta a capacidade de aclimação fotossintética dessas espécies de orquídeas. Para isso, foi mensurada a performance das trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e relações hídricas em folhas de *G. flexuosa* e *O. sphacelatum* em eventos subsequentes de disponibilidade e restrição hídrica sob influência da alta e baixa irradiância. Para o tratamento dos dados, modelos lineares generalizados (GLM) foram ajustados e calculado o índice de variação normalizada (IVN). Quando sob fornecimento hídrico e alta densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA), *G. flexuosa* apresenta eficiência no controle estomático, melhorando a capacidade de uso e eficiência da água. O processo de ajuste osmótico gera diminuição no potencial hídrico foliar e se intensifica na segunda exposição ao déficit hídrico, sendo que se torna uma estratégia em resposta ao estresse. *O. sphacelatum* sob fornecimento hídrico e alta DFFFA, apresenta o aparato fotoquímico otimizado somente após segunda exposição a essa condição. Sob condições de restrição hídrica e alta DFFFA, ambas as espécies tiveram os efeitos adversos da DFFFA alta exacerbados. Assim, há diferentes estratégias de cultivo para essas espécies. Enquanto *G. flexuosa* pode ter um alto desempenho sendo rustificada na luz, mesmo sob restrição hídrica, *O. sphacelatum* não se rustifica e não apresenta memória fisiológica em cultivo sob fornecimento hídrico e alta DFFFA.

PALAVRAS CHAVE: cultivo, epífitas, Orchidaceae, rustificação

***Gomesa flexuosa* Sims and *Oncidium sphacelatum* Lindley performance in different light regimes under water supply and restriction influence**

ABSTRACT

The water restriction in epiphytic habitat is often accompanied by high luminous incidences. The adaptations allow to increase CO₂ uptake, reduce water loss and optimize the storage of this resource in *Gomesa flexuosa* and *Oncidium sphacelatum* species. Thus, the aim of this study was to investigate whether the water availability combined with the light influence affects the photosynthetic acclimatization ability of these orchids species. For that, we measured the gas exchanges performance, chlorophyll *a* fluorescence and water relations in *G. flexuosa* and *O. sphacelatum* leaves in subsequent events of water availability and water restriction under high and low irradiance influence. For the data treatment a generalized linear models (GLM) were adjusted and the normalized variation index (IVN) was calculated. When under water supply and high photosynthetic photon flux density (PPFD), *G. flexuosa* presented stomatal control efficiency, improving the water use capacity and efficiency. The osmotic adjustment process generated a decrease in leaf water potential, which is intensified during the second exposure to water deficit, becoming a strategy in response to the stress. *O. sphacelatum* under water supply and high PPFD, presented the photochemical apparatus optimized only after a second exposure to this condition. Under conditions of water restriction and high PPFD, both species had the adverse effects of high PPFD exacerbated. Thus, there are different cultivation strategies for these species. While *G. flexuosa* can have a high performance rusted in light, even under water restriction, *O. sphacelatum* does not rust and does not show physiological memory under water supply and high PPFD form cultivation.

KEY WORDS: cultivation, epiphytes, Orchidaceae, rustification

INTRODUÇÃO

Dentre os fatores envolvidos no crescimento das plantas, seu desempenho em diferentes regimes luminosos é de suma importância, pois tanto a intensidade quanto a qualidade da luz influenciam na taxa fotossintética, abertura estomática, síntese de clorofila, dentre outros fatores (KOZLOWSKI et al., 1991). Períodos curtos sem água são comuns mesmo em florestas tropicais sazonais, e quando os forófitos de Orchidaceae epífitas perdem parte de suas folhas durante a estação seca, ou se uma clareira é aberta em meio à floresta, a restrição hídrica frequentemente é acompanhada por altas incidências luminosas (ZOTZ & WINTER, 1994).

Dessa forma, quando sofrem estresse devido à alta irradiância e períodos prolongados de baixa pluviosidade, esses fatores afetam significativamente seu metabolismo e levam ao crescimento e produtividade reduzidos, principalmente por causarem redução no rendimento quântico fotossintético, perda de clorofila foliar e terem maior suscetibilidade à fotoinibição (HE et al., 1998; LICHTENTHALER et al., 1981).

Em outro contexto, em ambientes de cultivo comercial, o sombreamento artificial é uma técnica utilizada para reduzir os efeitos prejudiciais da alta incidência luminosa, principalmente em períodos com alta disponibilidade desse recurso (CARON et al., 2010). No entanto, plantas cultivadas sob baixa irradiância podem sofrer redução na taxa fotossintética, resultando em declínio na taxa de crescimento (HE et al., 1998). Portanto, é necessário encontrar o equilíbrio na maximização da utilização da luminosidade para aumentar a atividade fotossintética e minimizar a fotoinibição (HE & TEO, 2007).

Para este fim, o processo de rustificação caracteriza a adaptação das mudas às oscilações da radiação solar, e é de suma importância para se garantir o maior índice de sobrevivência do plantio. Apesar de estudos focarem nos efeitos da exposição à diferentes condições de luz e sombra (COUTINHO 1978; OLIVEIRA FILHO & RATTER 2002; SUZAKI et al., 2005; JE et al., 2018), a grande maioria é realizado com espécies florestais, testando diferentes condições luminosas.

Para Orchidaceae epífitas, onde o ambiente é bem caracterizado e está sujeito ao estresse hídrico e à perda de folhas de forófitos decíduos que ocorre em formações de florestas semi-decíduais (SMITH et al., 1986), há pouca informação sobre a eficiência na captação e utilização da luz no espectro fotossintético e as relações hídricas, principalmente no que diz respeito às respostas a diferentes condições ambientais e ao estresse subjacente a elas (TAY et al., 2015). Por serem plantas herbáceas perenes, com crescimento lento tanto via propagação vegetativa quanto por meio de sementes, as avaliações por meio de variáveis fisiológicas podem nos dar subsídios para entender a complexa dinâmica que a luz pode trazer à essas plantas em nível

funcional, principalmente quando relacionados ao fator hídrico (PASTENES et al., 2003; LIN & HSU 2004).

As adaptações existentes que permitem aumentar a captação de CO₂, reduzir a perda de água e otimizar o armazenamento deste recurso (vide capítulos 1 e 2) tanto a curto quanto à longo prazo nas espécies *Gomesa flexuosa* e *Oncidium sphacelatum*, são importantes para gerar ferramentas que possam medir o estresse ambiental e determinar condições ideais de crescimento. Além disso, é importante definir padrões de aclimação relacionada à luz em um contexto ecológico, para que as informações geradas colaborem para melhorar a abordagem da conservação de espécies de orquídeas em seus ambientes naturais e nas técnicas de manejo em orquidários. Dessa forma, este estudo teve como objetivo testar a capacidade de aclimação fotossintética sob influência da luz em tratamentos com fornecimento e restrição hídrica, a fim de sugerir o manejo necessário para o crescimento e estabelecimento de ambas as espécies de orquídeas, fornecendo suporte para outros programas de conservação e reintrodução de orquídeas em habitats naturais.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e delineamento experimental

Indivíduos de *Gomesa flexuosa* Sims e *Oncidium sphacelatum* Lindley foram obtidos do orquidário ZDZ, em Botucatu/SP, transferidos para vasos padronizados com substrato de casca de pinus/ carvão vegetal, e aclimatados por um ano em casa de vegetação da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, com duas regas semanais (vasos irrigados até a ocorrência de percolação). A casa de vegetação está localizada no Instituto de Biociências (22° 53' S, 48° 26' O), e possui sistema controlado com umidade relativa do ar em torno de 60% e temperatura de 25° a 29°C. No seu interior, a densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) pode atingir até 800 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, durante o dia.

Após o período de aclimação, os indivíduos foram separados aleatoriamente em quatro tratamentos, levando em consideração:

- *Duas condições hídricas:* 1) irrigação constante por todo o experimento, com vasos irrigados até a ocorrência de percolação, duas vezes por semana; e 2) suspensão total de irrigação por todo o experimento.
- *Duas intensidades luminosas:* 1) alta densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) - até 800 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$; e 2) baixa DFFFA, de aproximadamente 200 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ (ambiente coberto com tela de sombreamento preta 70% - sombrite ®). As

intensidades luminosas de DFFFA foram verificadas com auxílio do medidor de radiação acoplado no fluorômetro PAM – Junior (Chlorophyll – Fluorometer WALZ/Alemanha).

As duas condições de luminosidade incluíram os dois tratamentos de disponibilidade hídrica, sendo: luz e seca (**T1**), que permaneceu em condições de DFFFA de aproximadamente 800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ por 60 dias e restrição hídrica; luz e irrigação (**T2**), com a mesma DFFFA e fornecimento hídrico por um período de 60 dias; sombra e seca (**T3**), com DFFFA de aproximadamente 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ e com restrição hídrica por 60 dias; e sombra e irrigação (**T4**) DFFFA idem ao T3 e fornecimento hídrico durante todo o experimento. É importante ressaltar que durante o período de 60 dias dos tratamentos, a umidade relativa (UR) da casa de vegetação foi reduzida para 30%, a fim de minimizar a obtenção de água pelas raízes através da umidade disponível no ar.

Ao final do período de 60 dias em cada um dos tratamentos descritos acima, todas as plantas migraram para as condições do T4, com disponibilidade hídrica e DFFFA de condição considerada controle por Rodrigues et al. (2013), mantendo-as assim por mais 60 dias, em um período considerado de recuperação.

Ao término deste período, as plantas foram novamente dispostas nos tratamentos T1, T2, T3 e T4 por um novo período de 60 dias, caracterizando o segundo evento nestas condições e 180 dias de experimento. Aos 60 dias da primeira fase do experimento, e aos 60 dias da segunda fase do experimento, foram realizadas medições: (1) de relações hídricas: conteúdo relativo de água (CRA) e potencial químico da água (Ψ_w) de folhas, pseudobulbos e raízes; (2) trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* foliar.

Relações hídricas

Para obtenção dos dados de relações hídricas foram avaliadas as seguintes variáveis: CRA e Ψ_w em todos os tecidos (folha, pseudobulbo e raiz). Para ambas as variáveis, a coleta de dados foi realizada no *predawn* (PD - 6:00h) e *midday* (MD- 12:00h), entretanto, por não haver variações significativas entre os períodos, optou-se por incluir neste trabalho apenas os dados de *midday*.

Conteúdo Relativo de Água (CRA)

Foram coletados 3 cm de raízes de cada indivíduo, desconsiderando 1 cm do ápice. Para folhas, foram utilizadas amostras de 2 cm^2 e para pseudobulbos, fragmentos com 1,5 cm de comprimento e 1,53 cm^2 de diâmetro. Todas as amostras foram coletadas e imediatamente

pesadas para determinar a massa fresca (MF). Logo após, as amostras foram imersas em água deionizada e acondicionadas por 24 horas a 5°C para reidratação de acordo com Elsheery & Cao (2008), e posteriormente determinada a massa túrgida (MT), e então secas a 60°C em estufa para determinação da massa seca (MS) (BARRS & WEATHERLEY, 1962). Foi utilizada balança de precisão de 0,0001 g para determinação dos PF, PT e PS. A partir da obtenção dos pesos, foi calculado com equações descritas por Witkowski e Lamont (1991), o CRA de cada tecido: $CRA \text{ (em \%)} = [(MF - MS)/(MT - MS)] * 100$.

Potencial químico da água (Ψ_w , MPa)

O potencial hídrico (Ψ_w) foi mensurado utilizando-se o Analisador de Potencial de Água com Controlador de Temperatura WP4-T (DECAGON DEVICES, EUA). As análises aconteceram imediatamente após a coleta do material biológico (amostras foliares, de pseudobulbo e radicular), sendo o resultado expresso em MPa.

Fluorescência da Clorofila a

A fluorescência da clorofila *a* (Chl *a*) foi avaliada com medidor modulado de fluorescência PAM – Junior (Chlorophyll – Fluorometer WALZ/Alemanha). Com o uso deste aparelho, foram obtidas as seguintes características fotoquímicas da fotossíntese nas folhas dos diferentes tratamentos: rendimento quântico efetivo do fotossistema II ($\Phi_{PSII} = \Delta F/F_M'$) (Genty *et al.*, 1989), taxa de transporte de elétrons ($ETR = \Delta F/F_M' \times DFFFA \times 0.5 \times 0.84$), dissipação fotoquímica [$qP = (F_M' - F_S)/(F_M' - F_0')$] e dissipação não-fotoquímica [$NPQ = (F_M - F_M')/F_M'$] (MAXWELL & JOHNSON, 2000). Para estimar o ETR foi utilizado o valor de 0.5 como fração de energia de excitação distribuída entre os fotossistemas, e 0.84 como fração de absorção de luz (BAKER, 2008). Os tecidos foram previamente aclimatados no escuro por 30 minutos antes de dar início às medições.

Medição de trocas gasosas

O medidor aberto portátil de trocas gasosas Infra Red Gas Analyser - “IRGA” (modelo LI-6400 - LI-COR) – foi usado para estimar a taxa de assimilação de CO₂ (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$), a taxa de transpiração (E , $\text{mmol vapor d'água m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e concentração interna de CO₂ (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}\text{ar}$). Dessa forma, também foram calculadas a eficiência do uso da água (EUA , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ (mmol H}_2\text{O}^{-1})$) pela relação entre A/E (BERRY & DOWNTON, 1982), a eficiência

da enzima de carboxilação, dada pela relação entre (A/C_i). Como relatado por Hew e colaboradores (1998), para *Oncidium 'Goldiana'* a ponta da folha é o local de mais alta capacidade fotossintética em relação à lâmina foliar. Portanto, as medições foram realizadas nessa região em folhas jovens e completamente expandidas das duas espécies avaliadas.

Análise de Dados

Para o tratamento dos dados foram ajustados modelos lineares generalizados (MLG) com distribuição Gamma e função de ligação logarítmica para as variáveis resposta CRA, Ψ_w , Φ PSII, ETR, qP, NPQ, A, E, C_i , EUA, A/E e A/C_i , considerando como fatores os efeitos principais água, luz e o tempo (dias). Também foram considerados os indivíduos no modelo, para acomodar as medidas repetidas ao longo do tempo (NELDER & WEDDERBURN, 1972). Foi testado a interação tripla entre esses fatores ($p < 0,05$). A qualidade dos ajustes dos modelos lineares generalizados ajustados foi feita através da análise de desvios (*deviance*) e do gráfico dos resíduos de Pearson padronizados. Para comparações entre tratamentos, foi utilizado o teste de Tukey-Kramer (Westfall, et al., 1999) do procedimento *genmod* do programa estatístico SAS – Free Statistical Software, SAS University Edition (**Anexos**).

À posteriori, foi calculado o índice de variação normalizada (IVN), por permitir avaliar o efeito real do tratamento nos parâmetros analisados em relação ao tratamento controle, obtendo-se valores menores (valores negativos) e maiores (valores positivos) nessa relação (TATTINI et al., 2006). O IVN foi calculado então, a partir dos resultados das interações encontradas pelo MLG, para as variáveis de fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas e relações hídricas nas diferentes condições hídricas e luminosas, de acordo com a seguinte fórmula:

$$IVN = (X \text{ tratamento} - X \text{ controle}) / (X \text{ tratamento} + X \text{ controle})$$

Para cada espécie, foram realizados dois IVNs a fim de interpretar (1) a influência da luz em tratamentos com disponibilidade hídrica; e (2) a influência da luz em tratamentos com restrição hídrica. Dessa forma, na primeira situação, os valores de X tratamento foi representado pelos dados obtidos das plantas sob **fornecimento hídrico e DFFFA de aproximadamente 800 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$** (T2) durante o primeiro evento de exposição à luz (1º EV_{Luz}) – aos 60 dias de experimento; e durante o segundo evento de exposição à luz (2º EV_{Luz}) – aos 180 dias de experimento. O X controle foi representado pelos dados obtidos de plantas sob fornecimento hídrico e **DFFFA de aproximadamente 200 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$** (T4) nos mesmos períodos.

Na segunda situação, os valores de X tratamento foi representado pelos dados obtidos das plantas sob **restrição hídrica e DFFFA de aproximadamente 800 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$** (T1) durante

o 1º EV_{Luz} e 2º EV_{Luz}. O X controle foi representado pelos dados obtidos de plantas sob **restrição hídrica e DFFFA de aproximadamente 200 µmol/m²s** (T3) nos mesmos períodos. Em ambas as situações, o DFFFA de 200 µmol/m²s foi escolhido como controle por ser o regime luminoso em que *Gomesa flexuosa* apresentou melhor performance e memória fisiológica (dados apresentados no capítulo 2).

RESULTADOS

Influência da luz em tratamentos com disponibilidade hídrica

Para *G. flexuosa* sob fornecimento hídrico, o IVN das variáveis de fluorescência da clorofila *a* apresentou diferenças entre o 1º EV_{Luz} e 2º EV_{Luz}. A variação em ambos os eventos para os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* foi elevada em relação ao controle em praticamente todas as variáveis, apresentado maior aumento no 1º EV_{Luz} para Φ PSII e NPQ, enquanto ETR e qP foram superiores no 2º EV_{Luz} (**Figura 1 e Tabela 1**).

Em relação aos parâmetros de trocas gasosas, a condutância estomática, assimilação, eficiência da carboxilação e eficiência no uso da água diminuíram no 1º EV_{Luz}, enquanto a concentração de carbono interno aumentou em relação ao controle. No 2º EV_{Luz}, o inverso é observado, de forma que g_s , A , A/C_i e principalmente EUA se elevam em relação ao controle, com diminuição do C_i . (**Figura 1 e Tabela 1**).

Quanto às relações hídricas, o CRA e potencial hídrico de todos os órgãos em ambos os eventos de fornecimento luminoso apresentaram menores valores, exceto o Ψ_w foliar, que aumentou no 2º EV_{Luz} (**Figura 1 e Tabela 1**).

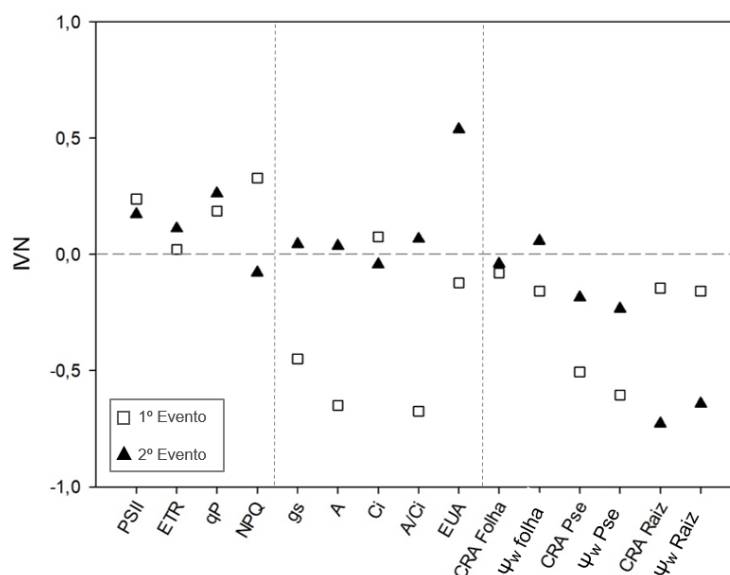


Figura 1. Índice de variação normalizada (IVN) das variáveis de fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas e relações hídricas para *Gomesa flexuosa*, relacionando o tratamento com água e luz comparado ao controle (água e sombra, representado na linha pontilhada horizontal) no primeiro e segundo evento de exposição à alta luminosidade.

Tabela 1. Índice de variação normalizada (IVN) das variáveis de fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas e relações hídricas para *Gomesa flexuosa* no tratamento com disponibilidade hídrica e 800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA comparado ao controle (disponibilidade hídrica e 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA) no primeiro e segundo evento de exposição à alta luminosidade.

Variáveis	Disponibilidade hídrica e 800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA	
	1º EV	2º EV
Φ PSII	0,238	0,172
ETR	0,021	0,111
qP	0,186	0,262
NPQ	0,328	-0,078
g_s	-0,450	0,044
A	-0,649	0,036
Ci	0,075	-0,043
A/Ci	-0,676	0,067
EUA	-0,123	0,537
CRA Folha	-0,080	-0,040
Ψ_W Folha	-0,159	0,058
CRA Pseudobulbo	-0,506	-0,186
Ψ_W Pseudobulbo	-0,605	-0,234
CRA Raiz	-0,146	-0,728
Ψ_W Raiz	-0,159	-0,642

Oncidium sphacelatum por sua vez, apresentou queda nos valores de todas as variáveis de fluorescência da clorofila *a* em plantas submetidas ao 1º EV_{Luz} (com exceção do NPQ), e aumento nos valores de todas as variáveis em plantas submetidas ao 2º EV_{Luz}, com NPQ se igualando ao controle. Os menores valores se repetiram para as variáveis trocas gasosas, que decaíram igualmente independente do 1º ou 2º evento de exposição à luz, exceto para a concentração de carbono interno, que foi elevada em ambos os eventos (**Figura 2 e Tabela 2**).

Para as relações hídricas, o CRA foliar permaneceu inalterado em relação ao controle, e o potencial hídrico foi elevado neste órgão, em ambos os momentos avaliados. O CRA do pseudobulbo reduziu no 1º e 2º EV_{Luz}, enquanto o potencial hídrico deste órgão diminuiu no primeiro evento e aumentou no segundo. O CRA radicular, assim como do pseudobulbo, foi reduzido em ambos os eventos, e o potencial hídrico deste órgão, embora permaneça igual ao do controle no 1º EV_{Luz}, aumenta no 2º EV_{Luz} (**Figura 2 e Tabela 2**).

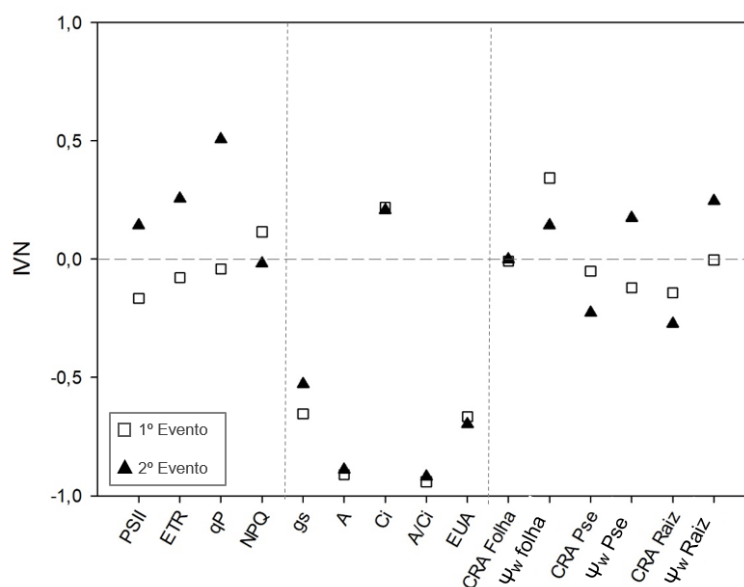


Figura 2. Índice de variação normalizada (IVN) das variáveis de fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas e relações hídricas para *Oncidium sphacelatum*, relacionando o tratamento com água e luz comparado ao controle (água e sombra, representado na linha pontilhada horizontal) no primeiro e segundo evento de exposição à alta luminosidade.

Tabela 2. Índice de variação normalizada (IVN) das variáveis de fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas e relações hídricas para *Oncidium sphacelatum* no tratamento com disponibilidade hídrica e 800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA comparado ao controle (disponibilidade hídrica e 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA) no primeiro e segundo evento de exposição à alta disponibilidade.

Variáveis	Disponibilidade hídrica e 800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA	
	1° EV	2° EV
Φ PSII	-0,167	0,143
ETR	-0,078	0,256
qP	-0,041	0,506
NPQ	0,115	-0,019
g_s	-0,654	-0,528
<i>A</i>	-0,911	-0,889
<i>Ci</i>	0,219	0,208
<i>A/Ci</i>	-0,940	-0,919
<i>EUA</i>	-0,666	-0,697
CRA _{Folha}	-0,008	0,001
Ψ_W _{Folha}	0,343	0,143
CRA _{Pseudobulbo}	-0,051	-0,226
Ψ_W _{Pseudobulbo}	-0,122	0,175
CRA _{Raiz}	-0,143	-0,273
Ψ_W _{Raiz}	-0,003	0,245

Influência da luz em tratamentos com restrição hídrica

Em plantas de *G. flexuosa* sob restrição hídrica, o IVN das variáveis de fluorescência da clorofila *a* apresentaram diferenças entre o 1° Evento de exposição luminosa (1° EV_{Luz}) e o 2° Evento de exposição luminosa (2° EV_{Luz}). Maiores valores de Φ PSII, ETR e qP foram verificados no 1° EV_{Luz}, enquanto no 2° EV_{Luz}, os IVN's de todas as variáveis foram menores em relação ao controle (**Figura 3 e Tabela 3**).

Em relação aos parâmetros de trocas gasosas, a condutância foi fortemente elevada no 1° EV_{Luz}, assim como *Ci*. No entanto, a assimilação de carbono, eficiência da carboxilação e eficiência no uso da água diminuíram. No 2° EV_{Luz}, o mesmo padrão é observado, embora a condutância decline (**Figura 3 e Tabela 3**).

Quanto às relações hídricas, o CRA e Ψ_W de todos os órgãos diminuíram no 1 e 2° EV_{Luz}, embora o CRA de folha e pseudobulbo no 2° EV_{Luz} se mantenha próximo aos valores encontrados no controle (**Figura 3 e Tabela 3**).

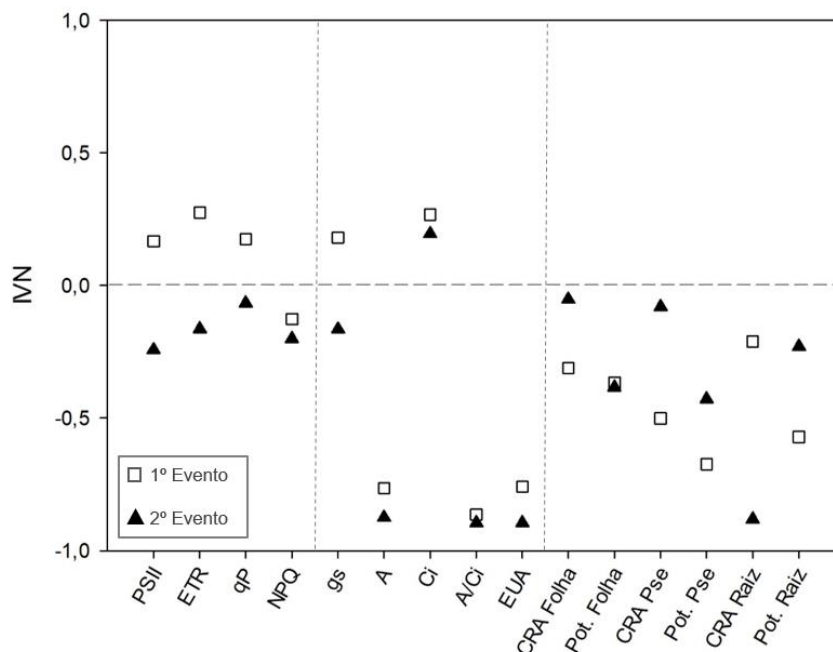


Figura 3. Índice de variação normalizada (IVN) das variáveis de fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas e relações hídricas para *Gomesa flexuosa*, relacionando o tratamento com restrição hídrica e luz comparado ao controle (restrição hídrica e sombra, representado na linha pontilhada horizontal) no primeiro e segundo evento de exposição à alta luminosidade.

Tabela 3. Índice de variação normalizada (IVN) das variáveis de fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas e relações hídricas para *Gomesa flexuosa* no tratamento com restrição hídrica e 800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA comparado ao controle (restrição hídrica e 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA) no primeiro e segundo evento exposição à alta luminosidade.

Variáveis	Restrição hídrica e 800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA	
	1º EV	2º EV
Φ PSII	0,166667	-0,24324
ETR	0,274581	-0,1641
qP	0,175	-0,06667
NPQ	-0,12727	-0,20101
g_s	0,180823	-0,16563
A	-0,76471	-0,875
Ci	0,267081	0,195005
A/Ci	-0,86441	-0,89474
EUA	-0,75869	-0,89529
CRA Folha	-0,31176	-0,05201
Ψ_W Folha	-0,367089	-0,384615
CRA Pseudobulbo	-0,50163	-0,08086
Ψ_W Pseudobulbo	-0,674847	-0,428571
CRA Raiz	-0,21214	-0,88492
Ψ_W Raiz	-0,571429	-0,230372

Oncidium sphacelatum, em relação às variáveis de clorofila *a*, apresentou declínio em todas as variáveis, independente do evento de exposição à alta luminosidade, embora o 1º EV_{Luz} tenha IVN's próximos ao controle. (Figura 4 e Tabela 4). Para as trocas gasosas, em ambos os eventos de exposição à alta luminosidade, praticamente todas as variáveis diminuíram, exceto *Ci* que foi elevado minimamente no 1º e 2º EV_{Luz} (Figura 4 e Tabela 4). Nas relações hídricas, o CRA e Ψ_w de todos os órgãos diminuíram no 1º e 2º EV_{Luz} (Figura 4 e Tabela 4).

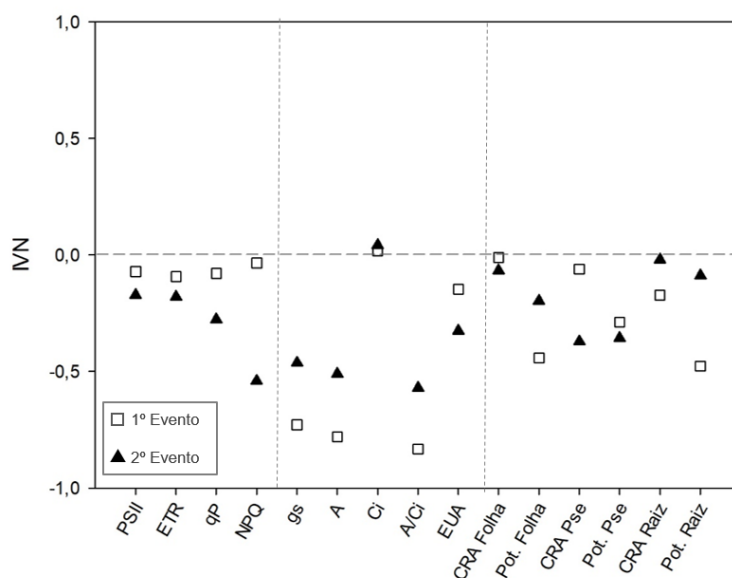


Figura 4. Índice de variação normalizada (IVN) das variáveis de fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas e relações hídricas para *Oncidium sphacelatum*, relacionando o tratamento com restrição hídrica e luz comparado ao controle (restrição hídrica e sombra, representado na linha pontilhada horizontal) no primeiro e segundo evento de exposição à alta luminosidade.

Tabela 4. Índice de variação normalizada (IVN) das variáveis de fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas e relações hídricas para *Oncidium sphacelatum* no tratamento com restrição hídrica e 800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA comparado ao controle (restrição hídrica e 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA) no primeiro e segundo evento de exposição à alta aluminosidade.

Variáveis	Restrição hídrica e 800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA	
	1º EV	2º EV
Φ PSII	-0,07143	-0,17241
ETR	-0,09309	-0,18028
qP	-0,07895	-0,27711
NPQ	-0,03419	-0,54067
<i>E</i>	-0,73333	-0,2093
<i>g_s</i>	-0,72854	-0,46261
<i>A</i>	-0,78049	-0,51111
<i>C_i</i>	0,01702	0,041516
<i>A/C_i</i>	-0,83333	-0,57143
<i>EUA</i>	-0,14815	-0,32494
CRA Folha	-0,01114	-0,066
Ψ_W Folha	-0,442623	-0,197861
CRA Pseudobulbo	-0,0607	-0,37162
Ψ_W Pseudobulbo	-0,288591	-0,356322
CRA Raiz	-0,17269	-0,17269
Ψ_W Raiz	-0,477165	-0,088296

DISCUSSÃO

Gomesa flexuosa é uma espécie que pode ser cultivada na sombra ou rustificada na luz, desde que tenha fornecimento hídrico, uma vez que apresenta desempenho correspondente e até melhor em relação ao cultivo na sombra. Quando observados os parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, que apresentam melhor desempenho para todas as variáveis, independente do primeiro ou segundo evento de exposição luminosa, a dissipação não-fotoquímica se destaca. Isso porque, após uma segunda exposição à luz há uma queda na dissipação do excesso de energia luminosa como calor nos centros de reações dos fotossistemas, revelando uma alta capacidade de utilização da luz, o que também proporciona grau de fotoproteção (DEMMIGADAMS & ADAMS, 1992; CHOW et al., 1981).

Essa melhor utilização da energia luminosa é condizente com o aumento da dissipação fotoquímica, o que também se verifica no aumento da assimilação de carbono, eficiência do uso da água e eficiência da enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenasse, em uma segunda exposição à alta DFFFA. Isso porque, mesmo sob efeito de alta incidência luminosa, que acaba por influenciar em maior demanda evaporativa, *G. flexuosa* consegue apresentar

eficiência no controle estomático, diminuindo drasticamente um primeiro evento de exposição à luz, e mantendo valores próximos a quando são expostas à sombra em um segundo evento, para permitir uma boa fixação de carbono, melhorando assim a capacidade de uso e eficiência da água (ZHANG et al., 2016). A regulação estomática então, mantém a diferença entre o potencial da planta e o meio externo constante (KUMAGAI et al., 2012), e embora seja mais eficiente no primeiro evento de exposição à luz, possivelmente o decréscimo no segundo momento pode ocorrer devido a desidratação dos tecidos, pela hidrólise de compostos de reserva, e/ou pelo aumento de teores de solutos osmoticamente ativos como açúcares e ácido málico, uma vez evidenciada a conversão metabólica para o metabolismo CAM (vide capítulo 1). Dessa forma, o processo de ajuste osmótico gera diminuição no potencial hídrico foliar no primeiro evento, e se eleva na segunda exposição à luz, sem que haja decréscimo na turgescência ou do volume celular, sendo que se torna uma estratégia em resposta ao estresse (DAMATTA & RAMALHO, 2006). Isso torna possível a manutenção da pressão de turgescência na célula, em especial das células guarda (HARE et al., 1998), permitindo a abertura parcial dos estômatos e, conseqüentemente, explicando a manutenção dos processos fisiológicos tais como a assimilação de carbono, que de outra forma é inibida (SPARKS & BLACK, 1999; ALVES & SETTER, 2004; BUCKLEY, 2019; YAMANI et al., 2020).

Oncidium sphacelatum, por sua vez, apresenta o aparato fotoquímico otimizado em condições de excesso luminoso somente após segunda exposição, apresentando altos valores de Φ PSII, ETR, qP e reduzido NPQ, o que evidencia que a espécie pode ser muito eficaz na manutenção de sua integridade fotoquímica sob tais condições (MAXWELL et al., 1992). Essa relação com elevados Φ PSII, ETR e qP intuitivamente nos leva a assumir que a espécie apresentaria bons parâmetros relacionados às trocas gasosas, vez que os produtos de transporte linear de elétrons, ATP e NADPH, são usados diretamente na assimilação de carbono fotossintético em proporções conhecidas (MURCHIE & LAWSON, 2013). Entretanto, isso não reflete na melhoria das trocas gasosas na espécie, uma vez que a queda em todas as variáveis relacionadas ao uso eficiente e fixação do carbono, demonstra que a espécie não se rustifica com a luz e apresenta um desempenho inferior nessa condição. Uma explicação plausível para isso seria a relação do requisito de elétrons para assimilação de uma molécula de CO₂ em espécies C₃ (como é o caso de *O. sphacelatum*). Quando a fotorrespiração experimentalmente consegue ser inibida, sabe-se que essa relação é igual a quatro. No entanto, esse número aumenta à medida que a proporção do fluxo de carbono pela via fotorrespiratória sobe, por exemplo, como ocorre durante o fechamento estomático (WINGLER et al., 1999; FLEXAS & MEDRANO, 2002). Portanto o fechamento estomático altera, além da assimilação de CO₂, a

relação de utilização de elétrons, de forma que estresse abiótico em questão, tenha grande efeito sobre a espécie (CHEESMAN, 1991).

Aliado a isso, pôde ser observado o aumento do potencial hídrico foliar em ambos os eventos de exposição à luz. Embora exista controvérsia sobre o papel efetivo dos solutos, que possivelmente foi acumulado nessa espécie, neste caso, o efeito da sua acumulação pode estar relacionado à distúrbios no metabolismo de aminoácidos e proteínas (LUTTS et al., 1996; SILVEIRA et al., 2004), provocando prejuízos nos processos fisiológicos da planta. Os potenciais nos demais órgãos não foliares também apresentam aumento no segundo evento de exposição, corroborando que, além das raízes que cumprem o papel de absorção retirando água da atmosfera, principalmente com o auxílio das estruturas do velame e da exoderme (BENZING, 1990; MOREIRA & ISAIAS, 2009; ZOTZ & WINKLER, 2013; JOCA et al., 2017), o pseudobulbo é o principal órgão que libera a água armazenada para atender às demandas transpiracionais das folhas (YANG et al., 2016).

Apesar dos padrões observados quando há exposição à alta irradiação na condição de fornecimento hídrico, quando observados a performance sob restrição deste recurso, temos um novo quadro, agora comum para ambas as espécies. *Gomesa flexuosa* em um primeiro momento consegue elevar os valores de Φ PSII, ETR e qP, contribuindo para a manutenção do aparato fotoquímico, mas, no 2º evento, o desempenho é prejudicado. Isso pode ocorrer justamente para preservar o aparato fotoquímico, uma vez que o dreno alternativo de elétrons ocorre neste cenário. *Oncidium sphacelatum*, desde o primeiro evento de exposição à luz na condição de restrição hídrica tem queda nos parâmetros fotoquímicos, embora estejam próximos aos valores do controle. Nesta espécie, no segundo evento há a diminuição drástica do NPQ, e sabe-se que, em condições de excesso de luz, o mais potente oxidante na natureza, pode haver danos expressivos no centro de reação do PSII, com conseqüente diminuição da eficiência fotossintética (OSMOND, 1981; HORTON & RUBAN 1992; BARBER, 1995). No entanto, um dos mecanismos para minimizar esse efeito, dissipando com segurança o excesso de energia prejudicial como calor é a elevação do NPQ, importante indicador da dissipação de energia de excitação não-radiativa nas antenas (KRAUSE & WEIS 1991), o que nesta espécie não foi eficiente, uma vez que houve grande declínio neste parâmetro, estando mais susceptível às conseqüências do excesso luminoso em questão.

Quanto aos parâmetros de trocas gasosas, ambas as espécies apresentam baixa performance, evidenciando que a intensa irradiância combinada à escassez de água, faz com que as plantas apresentem decréscimos mais fortes na fotossíntese líquida (HOLMGREN, 2000). Enquanto *O. sphacelatum* tem a condutância estomática diminuída em ambos os eventos, o que implica em menor perda de água e a manutenção do Ψ_w mesmo em condições

de seca (PIMENTEL, 2004), *G. flexuosa*, tem a condutância estomática elevada em um primeiro evento de exposição à luz, mas logo apresenta decaimento no segundo evento e também consequente diminuição do potencial hídrico foliar e balanço hídrico da planta como um todo.

Embora o fechamento estomático imediato de *O. sphacelatum* e maior controle do fechamento estomático no segundo evento para *G. flexuosa* pudesse contribuir de alguma forma para manter o balanço hídrico das espécies com restrição deste recurso, isso não foi verificado neste estudo. O fechamento estomático neste caso, parece não ser responsável pelo declínio nas taxas fotossintéticas observadas, corroborando estudos que evidenciam que fatores não estomáticos são mais limitantes em plantas submetidas gradualmente ao estresse hídrico por períodos mais longos (ACKERSON et al., 1977; RADIN & ACKERSON, 1981;). Até porque, a quantidade de carbono interno aumentou em ambos os períodos de exposição à luz, demonstrando que a inibição do processo fotossintético pode ter sido causada por uma restrição do transporte difusivo de CO₂ aos locais de fixação de CO₂ (BJÖRKMAN & POWLES, 1984).

Em suma, sob condições de plena luz solar quando bem irrigadas, há predominantemente melhores resultados para *G. flexuosa*. Mas com imposição de estresse hídrico, ambas as espécies tiveram os efeitos adversos da alta DFFFA exacerbados. Isso porque várias enzimas responsáveis pela regulação de CO₂ são reguladas pela luz (TAIZ et al., 2017; DOUBNEROVÁ & RYŠLAVÁ, 2011), de modo que a intensidade da luz e sua duração, juntamente com intensidade do estresse hídrico, desempenham papel significativo para esta resposta, com início e gravidade da inibição maior em plantas submetidas à falta do recurso hídrico.

Os impactos combinados de alta disponibilidade luminosa e seca no crescimento e desenvolvimento das plantas são variados, e em um cenário onde há incidência luminosa controlada e recursos hídricos limitados, há menos impactos no desempenho da planta (CANHAM et al., 1996). Neste caso, algumas espécies podem ter os efeitos da seca reduzidos, uma vez que a limitação luminosa poderia ser compensada com menores déficits de pressão de vapor, e, consequente, manutenção do estado hídrico foliar (HOLMGREN, 2000). Em outro cenário, sob intensa irradiação combinada à escassez de água, as plantas apresentam decréscimos mais fortes nos parâmetros fotossintéticos, embora não apresentem fotoinibição (HOLMGREN, 2000).

Apesar da similaridade floral de *Gomesa* e *Oncidium*, provavelmente devida a reflexos evolucionários de mudança de polinizadores (CHASE et al., 2009, NEUBIG et al., 2012), as diferenças morfológicas entre os gêneros são tênues e não óbvias à primeira vista. Apesar de compartilharem ocorrência em domínios fitogeográficos semelhantes, *Oncidium sphacelatum*

é encontrada em fragmentos remanescentes de florestas tropicais e semidecíduas (DAMON & CRUZ-LÓPEZ, 2006), enquanto *Gomesa flexuosa* é uma epífita comum em fragmentos remanescentes de Mata Atlântica em alguns estados do Brasil, Paraguai e Argentina (GASPI et al., 2011). Essa caracterização juntamente com os dados apresentados, leva a estratégias de cultivo para ambas as espécies: enquanto *G. flexuosa* pode ter um elevado desempenho rustificada na luz, mesmo sob restrição hídrica, *O. sphacelatum* não se rustifica e não apresenta memória fisiológica frente às diferentes formas de cultivo, de forma que o produtor deve estar atento tanto às questões hídricas quando luminosas ao pensar em manejos no cultivo. Apesar disso, para essa espécie, nenhuma das estratégias traz danos irreversíveis, permitindo possíveis “equivocos” durante o cultivo, uma vez que se mantém, mesmo com baixa performance.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERSON, R.; KRIEG, D.; HARING, C.; CHANG, N. Effects of plant water status on stomatal activity, photosynthesis, and nitrate reductase activity of field grown cotton. **Crop Science**, v. 17, p. 81–84, 1977.
- ALVES, A. A. C.; SETTER, T. L. Response of cassava leaf area expansion to water deficit: cell proliferation, cell expansion and delayed development. **Annals of Botany**, v. 94, p. 605-613, 2004.
- BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence a probe of photosynthesis. In Vivo Review of Plant Biology, **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 89-113, 2008.
- BARBER, S. A. **Soil nutrient bioavailability: a mechanistic approach**. John Wiley & Sons, 1995.
- BARRS, H. D.; WEATHERLEY, P. E. A re-examination of relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 15, p. 413-428, 1962.
- BENZING, D. H. **Vascular Epiphytes**. Cambridge: Cambridge University Press, 1990.
- BERRY, J. A.; DOWNTON, W. J. S. **Environmental regulation of photosynthesis**. In: Govindjee (Editor), *Photosynthesis: Development, Carbon Metabolism and Plant Productivity*, New York: Academic Press, v. 2, p.263-343, 1982.
- BJÖRKMAN, O.; POWLES, S. B. Inhibition of photosynthetic reactions under water stress: interaction with light level. **Planta**, v. 161, n. 6, p. 490-504, 1984.
- BRODRIBB, T. J.; HOLBROOK, N. M. Stomatal protection against hydraulic failure: a comparison of coexisting ferns and angiosperms. **New Phytologist**, v. 162, p. 663-670, 2004.

- CANHAM C.D. et al. Biomass allocation and multiple resource limitation in tree seedlings. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 26, p. 1521-1530, 1996.
- CARON, B. O.; DE SOUZA, V. Q.; CANTARELLI, E. B.; MANFRON, P. A.; BEHLING, A.; ELOY, E. Crescimento em viveiro de mudas de *Schizolobium parahyba* (Vell.) SF Blake. submetidas a níveis de sombreamento. **Ciência Florestal**, v. 20, n. 4, p. 683-689, 2010.
- CHASE, M. W.; WILLIAMS, N. H.; FARIA, A. D.; NEUBIG, K. M.; AMARAL, M. C. E. & WHITTEN, W. M. Floral convergence in Oncidiinae (Cymbidieae; Orchidaceae): an expanded concept of Gomesa and a new genus Nohawilliamsia. **Annals of Botany**, v. 104, p. 387–401, 2009.
- CHEESMAN, J. M. Effects of salinity on stomatal conductance, photosynthetic capacity and carbon isotope discrimination of salt tolerant (*Gossypium hirsutum* L.) and salt sensitive (*Phaseolus vulgaris* L.) C3 nonhalophytes. **Plant Physiology**, v. 95, p. 628-635, 1991.
- CHOW, W. S.; TELFER, A. CHAPMAN, D. J.; BARBER, J. State 1-state 2 transition in leaves and its association with ATP-induced chlorophyll fluorescence quenching. **Biochim Biophys Acta**, v. 638, n. 1, p. 60-68, 1981.
- COUTINHO, L.M. O conceito de cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 1, p. 17–23, 1978.
- DAMATTA, F. M.; RAMALHO, J. D. C. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, p. 55-81, 2006.
- DAMON, A. A.; CRUZ-LÓPEZ, L. Fragrance in Relation to Pollination of *Oncidium sphacelatum* and *Trichocentrum oerstedii* (Orchidaceae) in the Soconusco Region of Chiapas, Mexico. **Selbyana**, v. 27, n. 2, p. 186–194, 2006.
- DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS, W.W. Photoprotection and other responses to high light stress. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, v. 43, p. 599-626, 1992.
- DOUBNEROVÁ, V.; RYŠLAVÁ, H. What can enzymes of C4 photosynthesis do for C3 plants under stress? **Plant Science**, v. 180, p. 575-583, 2011.
- FLEXAS, J., MEDRANO, H. Drought-inhibition of Photosynthesis in C3 Plants: Stomatal and Non-stomatal Limitations Revisited. **Annals of Botany**, v. 89, p. 183–189, 2002.
- GARAY, L. A.; STACY, J. E. Synopsis of the genus *Oncidium*. **Bradea**, v. 1, p. 393-428, 1974.
- GASPI, F. O. D. G. DE et al. Effects of the topical application of hydroalcoholic leaf extract of *Oncidium flexuosum* Sims. (Orchidaceae) and microcurrent on the healing of wounds

- surgically induced in Wistar rats. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.
- HARE, P. D.; CRESS, W. A.; VAN STADEN, J. Dissecting the role of osmolyte accumulation during stress. **Plant, Cell & Environment**, v. 21, p. 535-553, 1998.
- HE, J.; TEO, L. C. D. Susceptibility of green leaves and green flower petals of CAM *Dendrobium* cv. *Burana Jade* to high irradiance under tropical natural conditions. **Photosynthetica**, v. 45, p. 214-221, 2007.
- HE, J.; KHOO, G. H.; HEW, C.S. Susceptibility of CAM *Dendrobium* Leaves and Flowers to High Light and High Temperature under Natural Tropical Conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 40, p. 255-264, 1998.
- HEW, C. S.; SOH, W. P.; NG, C. K. Y. Variation in photosynthetic characteristics along the leaf blade of *Oncidium Goldiana*, a C3 tropical epiphytic orchid hybrid. **International Journal of Plant Sciences**, v. 159, p. 116-120, 1998.
- HOLMGREN, M. Combined effects of shade and drought on tulip poplar seedlings: trade-off in tolerance or facilitation? **Oikos**, v. 90, p. 67-78, 2000.
- HORTON, P.; RUBAN, A.V. Regulation of photosystem II. **Photosynthesis Research**, v. 34, p. 375-385, 1992.
- JE, S. M.; SUN, H. K.; SOO, Y. W. Responses of the photosynthetic apparatus of *Abies koreana* to drought under different light conditions. **Ecological research**, v. 33, n. 2, p. 413-423, 2018.
- JOCA, T.A.C. et al. The velamen of epiphytic orchids: variation in structure and correlations with nutrient absorption. **Flora**, v. 230, p. 66-74, 2017.
- KOZLOWSKI, T. T.; KRAMER, P. J.; PALTARDY, S. G. **The physiological ecology of woody plants**. San Diego: Academic Press, p. 657, 1991.
- KRAUSE, G. H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis—the basics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 313–349, 1991.
- KUMAGAI, T.O.; PORPORATO, A. Strategies of a Bornean tropical rainforest water use as a function of rainfall regime: isohydric or anisohydric?. **Plant, cell & environment**, v. 35, n. 1, p. 61-71, 2012.
- LICHTENTHALER, H. K. et al. Photosynthetic Activity, Chloroplast Ultrastructure, and Leaf Characteristics of High-Light and Low-Light Plants and of Sun and Shade Leaves. **Photosynthesis Research**, v. 2, p. 115-141, 1981.
- LIN, M. J.; HSU, B. D. Photosynthetic plasticity of *Phalaenopsis* in response to different light environments. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, p. 1259-1268, 2004.

- LISAR, S. Y. S. et al. **Water stress in plants: Causes, effects and responses**. In Water Stress; Rahman, M.; Hasegawa, H. Eds. Croatia: InTech, Rijeka, p. 1-14, 2012.
- LUTTS, S.; KINET, J. M.; BOUHARMONT, J. **Effects of salt stress on growth, mineral nutrition and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing**, 1996.
- MAXWELL, K.; JOHNSON G. N. Chlorophyll fluorescence: a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 659-668, 2000.
- MAXWELL, C.; GRIFFITHS, H.; BORLAND, A. M.; BROADMEADOW, M. S.J; MCDAVID, C. R. Photoinhibitory responses of the epiphytic bromeliad *Guzmania monostachia* during the dry season in Trinidad maintain photochemical integrity under adverse conditions. **Plant, Cell & Environment**, v. 15, p. 37- 47, 1992.
- MOREIRA, A. S. F. P.; LEMOS-FILHO, J. P.; ZOTZ, G.; ISAIAS, R. M. S. Anatomy and photosynthetic parameters of roots and leaves of two shade-adapted orchids, *Dichaea cogniauxiana* Shltr. and *Epidendrum secundum* Jacq. **Flora**, v. 204, p. 604–611, 2009.
- MURCHIE, E. H.; LAWSON, T. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, p. 3983-3998, 2013.
- NELDER, J. A.; WEDDERBURN, R. W. Generalized linear models. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 135, n. 3, p. 370-384, 1972.
- NEUBIG, K. M. et al. Generic recircumscriptions of Oncidiinae (Orchidaceae: Cymbidieae) based on maximum likelihood analysis of combined DNA datasets. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 168, p. 117-146, 2012.
- OLIVEIRA FILHO, A.; RATTER, J. **Vegetation physiognomies and woody flora of the Cerrado Biome**. In: Oliveira P, Marquis R (eds) *The Cerrados of Brazil*. Columbia University Press, New York, p. 91-120, 2002.
- OSMOND, C. B. Photorespiration and photoinhibition: some implications for the energetics of photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 639, n. 2, p. 77-98, 1981.
- PASTENES, C.; SANTA-MARIA, E.; INFANTE, R.; FRANCK, N. Domestication of the *Chilean guava* (*Ugni molinae* Turcz.), a forest understorey shrub, must consider light intensity. **Scientia Horticulturae**, v. 98, p. 71-84, 2003.
- PIMENTEL, C. **A relação da planta com a água**. Soropédica, RJ: Edur, p. 191, 2004.
- RADIN, J. W.; ACKERSON, R. C. Water relations of cotton plants under nitrogen deficiency: III. Stomatal conductance, photosynthesis, and abscisic acid accumulation during drought. **Plant Physiology**, v. 67, n. 1, p. 115-119, 1981.

- SILVEIRA, V.; FLOH, E. I. S.; HANDRO, W.; GUERRA, M. P., Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 76, p. 53-60, 2004.
- SMITH, J. A. C.; GRIFFITHS, H.; LÜTTGE, U. Comparative ecophysiology of CAM and C3 bromeliads. I. The ecology of the Bromeliaceae in Trinidad. **Plant, Cell and Environment**, v. 9, p. 359-376, 1986.
- SUZAKI, T.; KUME, A.; INO, Y. Effects of slope and canopy trees on light conditions and biomass of dwarf bamboo under a coppice canopy. **Journal of Plant Research**, v. 10, p. 151-156, 2005.
- TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, p. 888, 2017.
- TATTINI M.; REMORINI D.; PINELLI P.; AGATI G.; SARACINI E.; TRAVERSI M. L.; MASSAI R. Morpho-anatomical, physiological and biochemical adjustments in response to root zone salinity stress and high solar radiation in two Mediterranean evergreen shrubs, *Myrtus communis* and *Pistacia lentiscus*. **New Phytologist**, v. 170, p. 779-794, 2006.
- WESTFALL, P. H.; TOBIAS, R. D.; ROM, D.; WOLFINGER, R. D.; HOCHBERG, Y. **Multiple Comparisons and Multiple Tests Using the SAS System**, Cary, NC: SAS Institute Inc, 1999.
- WINGLER, A.; QUICK, W. P.; BUNGARD, R.A.; BAILEY, K. J.; LEA, P. J.; LEEGOOD, R.C. The role of photorespiration during drought stress: an analysis utilizing barley mutants with reduced activities of photorespiratory enzymes. **Plant, Cell and Environment**, v. 22, p. 361-373, 1999.
- YANG, S-J. et al. Two strategies by epiphytic orchids for maintaining water balance: thick cuticles in leaves and water storage in pseudobulbs, **AOB Plants**, v.8, p. 1-11. 2016.
- ZHANG, G.Q. et al. The *Dendrobium catenatum* Lindl. genome sequence provides insights into polysaccharide synthase, floral development and adaptive evolution. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-10, 2016.
- ZOTZ, G.; WINTER, K. A one-year study on carbon, water and nutrient relationships in a tropical C3-CAM hemiepiphyte, *Clusia uvitana*. **New Phytologist**, v. 127, p. 45-60, 1994.
- ZOTZ, G.; WINKLER, U. Aerial roots of epiphytic orchids: the velamen radicum and its role in water and nutrient uptake. **OECOLOGIA**, v.171, p.733-741, 2013.

ANEXOS

Anexo 1. Comparação das variáveis de fluorescência da clorofila *a* entre **fornecimento hídrico** e diferentes disponibilidades luminosas aos 60 e 180 dias de experimento (1º e 2º evento de exposição à essas condições luminosas, respectivamente), para *Gomesa flexuosa*.

Variáveis	Disponibilidade Luminosa			
	800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA (T3)		200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA (T4)	
	1º Evento	2º Evento	1º Evento	2º Evento
Φ PSII	0,10±0,01 Ba	0,23±0,03 Aa	0,08±0,01 Ba	0,12±0,01 Ab
ETR	61,20±0,35 Ba	128,08±5,46 Aa	50,23±1,47 Bb	73,80±2,19 Ab
qP	0,33±0,04 Ba	0,64±0,04 Aa	0,24±0,01 ABb	0,31±0,04 Ab
NPQ	1,86±0,01 Ba	2,39±0,05 Ab	1,20±0,01 Cb	2,82±0,04 Aa

Valores referentes às médias e desvio padrão. Os dados foram ajustados por modelos lineares generalizados (MLG) e posterior teste de Tukey-Kramer com nível de significância a 5%. Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os eventos, para cada tratamento e letras minúsculas, diferenças significativas entre os tratamentos, em cada evento. T3: fornecimento hídrico e 800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA. T4: fornecimento hídrico e 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA.

Anexo 2. Comparação das variáveis de trocas gasosas entre **fornecimento hídrico** e diferentes disponibilidades luminosas aos 60 e 180 dias de experimento (1º e 2º evento de exposição à essas condições luminosas, respectivamente), para *Gomesa flexuosa*.

Variáveis	Disponibilidade Luminosa			
	800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA (T3)		200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA (T4)	
	1º Evento	2º Evento	1º Evento	2º Evento
<i>gs</i>	10,85±2,41 Ba	37,51±2,20 Aa	12,08±0,80 Ba	18,81±1,62 Ab
<i>A</i>	1,20±0,04 Aa	0,45±0,03 Ca	0,80±0,05 Bb	0,27±0,03 Cb
<i>Ci</i>	224,90±23,07 Ba	249,81±17,48 Bb	264,68±20,39 Ba	369,74±5,00 Aa
<i>A/Ci</i>	0,0055±,0005 Aa	0,0018±0,0001 Ca	0,0031±0,0004 Bb	0,0007±,0001 Cb
<i>EUA</i>	8,60±0,42 Aa	1,81±0,28 Ba	3,37±0,36 Bb	1,82±0,62 Ba

Valores referentes às médias e desvio padrão. Os dados foram ajustados por modelos lineares generalizados (MLG) e posterior teste de Tukey-Kramer com nível de significância a 5%. Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os eventos, para cada tratamento e letras minúsculas, diferenças significativas entre os tratamentos, em cada evento. T3: fornecimento hídrico e 800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA. T4: fornecimento hídrico e 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA.

Anexo 3. Comparação das variáveis de relações hídricas (*midday*) entre **fornecimento hídrico** e diferentes disponibilidades luminosas em folhas, pseudobulbos e raízes, aos 60 e 180 dias de experimento (1º e 2º evento de exposição à essas condições luminosas, respectivamente), para *Gomesa flexuosa*.

Variáveis	Disponibilidade Luminosa			
	800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA (T3)		200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA (T4)	
	1º Evento	2º Evento	1º Evento	2º Evento
CRA Folha (%)	95,28±0,45 Aa	95,77±0,29 Aa	92,71±0,39 Bb	95,18±0,14 Aa
CRA Pseudobulbo (%)	82,83±0,84 Ab	51,80±3,03 Bb	59,13±1,62 Ca	71,35±1,54 Ba
CRA Raiz (%)	42,14±0,54 Ba	52,13±0,23 Aa	46,98±2,59 Aa	54,52±1,59 Aa
Ψ_W Folha (MPa)	-1,00±0,18 ABa	-1,36±0,11 Ba	-1,14±0,09 Aa	-1,56±0,02 Ba
Ψ_W Pseudobulbo (MPa)	-0,53±0,02 Ca	-0,44±0,02 Bb	-0,47±0,15 Aa	-0,72±0,02 Aa
Ψ_W Raiz (MPa)	-0,90±0,12 Aa	-7,45±0,63 Cb	-1,51±0,23 Ab	-2,61±0,38 Ba

Valores referentes às médias e desvio padrão. Os dados foram ajustados por modelos lineares generalizados (MLG) e posterior teste de Tukey-Kramer com nível de significância a 5%. Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os eventos, para cada tratamento e letras minúsculas, diferenças significativas entre os tratamentos, em cada evento. T3: fornecimento hídrico e 800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA. T4: fornecimento hídrico e 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA.

Anexo 4. Comparação das variáveis de fluorescência da clorofila *a* entre **fornecimento hídrico** e diferentes disponibilidades luminosas aos 60 e 180 dias de experimento (1º e 2º evento de exposição à essas condições luminosas, respectivamente), para *Oncidium sphacelatum*.

Variáveis	Disponibilidade Luminosa			
	800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA (T3)		200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA (T4)	
	1º Evento	2º Evento	1º Evento	2º Evento
Φ PSII	0,15±0,01 Aa	0,17±0,01 Aa	0,14±0,02 Aa	0,12±0,01 Ab
ETR	98,05±5,28 Aa	110,15±1,64 Aa	72,23±2,73 Ab	60,90±4,91 Ab
qP	0,41±0,02 Ba	0,53±0,01 Aa	0,38±0,08 Aa	0,20±0,03 Bb
NPQ	2,42±0,17 Aa	1,61±0,01 Ba	1,38±0,08 Ba	1,08±0,02 Cb

Valores referentes às médias e desvio padrão. Os dados foram ajustados por modelos lineares generalizados (MLG) e posterior teste de Tukey-Kramer com nível de significância a 5%. Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os eventos, para cada tratamento e letras minúsculas, diferenças significativas entre os tratamentos, em cada evento. T3: fornecimento hídrico e 800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA. T4: fornecimento hídrico e 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA.

Anexo 5. Comparação das variáveis de trocas gasosas entre **fornecimento hídrico** e diferentes disponibilidades luminosas aos 60 e 180 dias de experimento (1º e 2º evento de exposição à essas condições luminosas, respectivamente), para *Oncidium sphacelatum*.

Variáveis	Disponibilidade Luminosa			
	800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA (T3)		200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA (T4)	
	1º Evento	2º Evento	1º Evento	2º Evento
<i>gs</i>	18,02±3,81 Ba	17,31±3,92 Ba	11,62±2,44 Ba	25,98±1,81 Aa
<i>A</i>	0,73±0,02 Ba	0,68±0,02 Bb	1,50±0,06 ABb	1,70±0,06 Aa
<i>Ci</i>	337,87±8,57 Aa	315,72±17,69 Aba	233,52±16,17 Bb	239,04±10,46 Bb
<i>A/Ci</i>	0,0022±0,0001 Bb	0,0022±0,0002 Bb	0,0065±0,0005 Aa	0,0071±0,0003 Aa
<i>EUA</i>	3,10±0,72 ABb	2,63±0,09 Bb	7,83±2,32 Aa	3,14±0,16 Ba

Valores referentes às médias e desvio padrão. Os dados foram ajustados por modelos lineares generalizados (MLG) e posterior teste de Tukey-Kramer com nível de significância a 5%. Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os eventos, para cada tratamento e letras minúsculas, diferenças significativas entre os tratamentos, em cada evento. T3: fornecimento hídrico e 800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA. T4: fornecimento hídrico e 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA.

Anexo 6. Comparação das variáveis de relações hídricas (*midday*) entre **fornecimento hídrico** e diferentes disponibilidades luminosas em folhas, pseudobulbos e raízes, aos 60 e 180 dias de experimento (1º e 2º evento de exposição à essas condições luminosas, respectivamente), para *Oncidium sphacelatum*.

Variáveis	Disponibilidade Luminosa			
	800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA (T3)		200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA (T4)	
	1º Evento	2º Evento	1º Evento	2º Evento
CRA Folha (%)	93,02±0,87 Aa	94,81±1,34 Aa	94,92±0,76 Aa	95,44±0,85 Aa
CRA Pseudobulbo (%)	88,51±3,39 Aa	91,24±2,41 Aa	89,72±2,24 Aa	92,87±1,39 Aa
CRA Raiz (%)	31,95±0,94 ABa	26,29±2,62 Ba	36,80±1,87 Ba	27,91±2,19 Ca
Ψ_W Folha (MPa)	-0,68±0,06 Ab	-0,75±0,03 Ab	-0,47±0,04 Aa	-1,08±0,03 Ca
Ψ_W Pseudobulbo (MPa)	-0,53±0,05 Bb	-0,56±0,01 Ba	-0,36±0,04 Aa	-0,84±0,07 Bb
Ψ_W Raiz (MPa)	-1,66±0,07 Aa	-2,22±0,06 Ba	-1,82±0,02 Ba	-2,69±0,11 Cb

Valores referentes às médias e desvio padrão. Os dados foram ajustados por modelos lineares generalizados (MLG) e posterior teste de Tukey-Kramer com nível de significância a 5%. Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os eventos, para cada tratamento e letras minúsculas, diferenças significativas entre os tratamentos, em cada evento. T3: fornecimento hídrico e 800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA. T4: fornecimento hídrico e 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA.

Anexo 7. Comparação das variáveis de fluorescência da clorofila *a* entre **restrição hídrica** e diferentes disponibilidades luminosas em folhas, pseudobulbos e raízes, aos 60 e 180 dias de experimento (1º e 2º evento de exposição à essas condições luminosas, respectivamente), para *Gomesa flexuosa*.

Variáveis	Disponibilidade Luminosa			
	800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA (T1)		200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA (T2)	
	1º Evento	2º Evento	1º Evento	2º Evento
Φ PSII	0,14±0,02 Aa	0,14±0,01 Aa	0,13±0,01 Aa	0,17±0,02 Aa
ETR	107,53±3,10 Aa	91,97±3,21 Aa	52,42±2,96 Bb	92,27±2,64 Aa
qP	0,47±0,05 Aa	0,56±0,03 Aa	0,35±0,02 Ba	0,53±0,02 Aa
NPQ	1,44±0,03 Cb	1,59±0,01 Bb	2,37±0,06 Ba	2,41±0,06 Ba

Valores referentes às médias e desvio padrão. Os dados foram ajustados por modelos lineares generalizados (MLG) e posterior teste de Tukey-Kramer com nível de significância a 5%. Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os eventos, para cada tratamento e letras minúsculas, diferenças significativas entre os tratamentos, em cada evento. T1: restrição hídrica e 800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA. T2: restrição hídrica e 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA.

Anexo 8. Comparação das variáveis de trocas gasosas entre **restrição hídrica** e diferentes disponibilidades luminosas aos 60 e 180 dias de experimento (1º e 2º evento de exposição à essas condições luminosas, respectivamente), para *Gomesa flexuosa*.

Variáveis	Disponibilidade Luminosa			
	800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA (T1)		200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA (T2)	
	1º Evento	2º Evento	1º Evento	2º Evento
<i>gs</i>	15,64±1,43 Ba	26,85±1,90 Aa	4,58±1,88 Bb	20,56±3,79 Aa
<i>A</i>	0,16±0,03 Ba	0,03±0,01 Cb	0,17±0,03 Ca	0,29±0,05 Ba
<i>Ci</i>	388,81±12,51 Aa	370,84±14,10 Aba	307,70±18,00 Ab	339,22±18,19 Aa
<i>A/Ci</i>	0,0004±0,0001 Ba	0,0001±0,0001 Cb	0,0006±0,0001 Ba	0,0008±0,0002 Ba
<i>EUA</i>	1,18±0,27 Ab	0,10±0,02 Bb	2,63±0,62 Ba	6,05±1,44 Aa

Valores referentes às médias e desvio padrão. Os dados foram ajustados por modelos lineares generalizados (MLG) e posterior teste de Tukey-Kramer com nível de significância a 5%. Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os eventos, para cada tratamento e letras minúsculas, diferenças significativas entre os tratamentos, em cada evento. T1: restrição hídrica e 800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA. T2: restrição hídrica e 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA.

Anexo 9. Comparação das variáveis de relações hídricas (*midday*) entre **restrição hídrica** e diferentes disponibilidades luminosas em folhas, pseudobulbos e raízes, aos 60 e 180 dias de experimento (1º e 2º evento de exposição à essas condições luminosas, respectivamente), para *Gomesa flexuosa*.

Variáveis	Disponibilidade Luminosa			
	800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA (T1)		200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA (T2)	
	1º Evento	2º Evento	1º Evento	2º Evento
CRA Folha (%)	49,99±1,54 Bb	86,30±4,37 Aa	78,91±0,70 Ca	87,78±3,00 Ba
CRA Pseudobulbo (%)	27,49±0,39 Ca	44,05±0,53 Ba	19,39±0,03 Cb	49,00±2,35 Ba
CRA Raiz (%)	27,39±0,48 Bb	3,30±1,09 Cb	34,98±2,38 Ba	8,59±0,79 Ca
Ψ_W Folha (MPa)	-2,16±0,14 Bb	-3,06±0,10 Cb	-1,57±0,06 Aa	-1,39±0,01 Aa
Ψ_W Pseudobulbo (MPa)	-2,73±0,33 Cb	-1,10±0,11 Ba	-1,91±0,17 Ca	-1,16±0,02 Ba
Ψ_W Raiz (MPa)	-3,30±0,16 Bb	-11,91±0,69 Ca	-2,08±0,150 Aa	-11,98±0,85 Ca

Valores referentes às médias e desvio padrão. Os dados foram ajustados por modelos lineares generalizados (MLG) e posterior teste de Tukey-Kramer com nível de significância a 5%. Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os eventos, para cada tratamento e letras minúsculas, diferenças significativas entre os tratamentos, em cada evento. T1: restrição hídrica e 800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA. T2: restrição hídrica e 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA.

Anexo 10. Comparação das variáveis de fluorescência da clorofila *a* entre **restrição hídrica** e diferentes disponibilidades luminosas em folhas, pseudobulbos e raízes, aos 60 e 180 dias de experimento (1º e 2º evento de exposição à essas condições luminosas, respectivamente), para *Oncidium sphacelatum*.

Variáveis	Disponibilidade Luminosa			
	800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA (T1)		200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA (T2)	
	1º Evento	2º Evento	1º Evento	2º Evento
Φ PSII	0,13±0,01 Aa	0,12±0,01 Ab	0,10±0,01 Bb	0,16±0,01 Aa
ETR	81,35±2,91 Aa	76,50±2,18 Ab	61,80±3,29 Bb	102,83±3,18 Aa
qP	0,35±0,03 Aa	0,30±0,01 Ab	0,35±0,06 Ba	0,61±0,01 Aa
NPQ	2,26±0,09 Aa	0,48±0,03 Cb	1,74±0,10 Ab	1,04±0,01 Ca

Valores referentes às médias e desvio padrão. Os dados foram ajustados por modelos lineares generalizados (MLG) e posterior teste de Tukey-Kramer com nível de significância a 5%. Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os eventos, para cada tratamento e letras minúsculas, diferenças significativas entre os tratamentos, em cada evento. T1: restrição hídrica e 800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA. T2: restrição hídrica e 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA.

Anexo 11. Comparação das variáveis de trocas gasosas entre **restrição hídrica** e diferentes disponibilidades luminosas aos 60 e 180 dias de experimento (1º e 2º evento de exposição à essas condições luminosas, respectivamente), para *Oncidium sphacelatum*.

Variáveis	Disponibilidade Luminosa			
	800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA (T1)		200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA (T2)	
	1º Evento	2º Evento	1º Evento	2º Evento
<i>gs</i>	2,83±0,70 Ca	6,36±0,85 Ba	2,43±0,46 Ca	8,03±2,75 Ba
<i>A</i>	0,09±0,01 Ca	0,22±0,01 Ba	0,07±0,01 Ba	0,10±0,01 Bb
<i>Ci</i>	349,57±19,54 Aa	343,07±16,06 Aa	364,78±11,45 Aa	364,31±6,89 Aa
<i>A/Ci</i>	0,0002±0,0001 Ca	0,0006±0,0001 Ba	0,0002±0,0001 Ba	0,0003±0,0001 Ba
<i>EUA</i>	2,30±0,40 Ba	1,34±0,21 Ca	1,57±0,22 Bb	0,56±0,18 Cb

Valores referentes às médias e desvio padrão. Os dados foram ajustados por modelos lineares generalizados (MLG) e posterior teste de Tukey-Kramer com nível de significância a 5%. Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os eventos, para cada tratamento e letras minúsculas, diferenças significativas entre os tratamentos, em cada evento. T1: restrição hídrica e 800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA. T2: restrição hídrica e 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA.

Anexo 12. Comparação das variáveis de relações hídricas (*midday*) entre **restrição hídrica** e diferentes disponibilidades luminosas em folhas, pseudobulbos e raízes, aos 60 e 180 dias de experimento (1º e 2º evento de exposição à essas condições luminosas, respectivamente), para *Oncidium sphacelatum*.

Variáveis	Disponibilidade Luminosa			
	800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA (T1)		200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA (T2)	
	1º Evento	2º Evento	1º Evento	2º Evento
CRA Folha (%)	90,97±1,11 Ba	83,07±0,79 Cb	93,47±1,07 Aa	95,45±0,12 Aa
CRA Pseudobulbo (%)	78,38±1,42 Ba	41,80±1,52 Cb	80,98±2,65 Ba	58,57±3,15 Ca
CRA Raiz (%)	22,54±3,46 Aa	25,26±0,90 Aa	27,60±1,83 Aa	15,93±2,78 Bb
Ψ_W Folha (MPa)	-1,76±0,09 Bb	-1,12±0,02 Cb	-0,23±0,05 Aa	-0,81±0,03 Ca
Ψ_W Pseudobulbo (MPa)	-0,96±0,09 Bb	-1,18±0,03 Bb	-0,46±0,01 Aa	-0,59±0,05 Ba
Ψ_W Raiz (MPa)	-4,69±0,10 Cb	-2,65±0,17 Bb	-1,83±0,026 Ca	-1,63±0,01 Ba

Valores referentes às médias e desvio padrão. Os dados foram ajustados por modelos lineares generalizados (MLG) e posterior teste de Tukey-Kramer com nível de significância a 5%. Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os eventos, para cada tratamento e letras minúsculas, diferenças significativas entre os tratamentos, em cada evento. T1: restrição hídrica e 800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA. T2: restrição hídrica e 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ DFFFA.

CAPÍTULO 4

“O cultivo de orquídeas e as exigências de luz e água”

“O cultivo de orquídeas e as exigências de luz e água”

Thais Arruda

Luiz Fernando Rolim

Ana Sílvia Moreira



Gomesa flexuosa



Oncidium sphacelatum



Hora de cultivar! Principais cuidados:

Esqueceu de irrigar, vai viajar por um longo período, ou o sol incide forte no local onde ficam por todo o dia? Saiba o que fazer!

Gomesa flexuosa Sims é uma espécie de interesse ornamental e medicinal, comum em fragmentos remanescentes de Mata Atlântica em alguns estados do Brasil, Paraguai e Argentina.

Oncidium sphacelatum Lindley é nativa do México, encontrada em fragmentos remanescentes de florestas tropicais e semi-Decíduas.

Regue pelo menos duas vezes por semana. Você saberá quando molhá-la verificando se o substrato contém alguma umidade ou se está totalmente seco.

Irrigação



Água

As plantas devem ficar em locais onde possam receber a luz solar na manhã ou no final da tarde. A luz é um importante fator para seu desenvolvimento, sem ela a orquídea não florescerá.

Luminosidade



Luminosidade

Faltou água e recebeu alta irradiação → Por até 60 dias ela aproveita de maneira eficiente a pouca água disponível. Além disso, tem “memória”, podendo guardar as informações do que sofreu para se ajustar melhor da próxima vez!

Mas se tiver água disponível, pode cultivar sob alta luminosidade (ela até prefere!).

Apesar de sobreviver por longo período sem água, não possui “memória” e isso lhe custa muito para manter-se nessas condições.

Se a luminosidade for alta e tiver água, a espécie tolera e se mantém, mesmo com baixo desempenho.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta Tese foram analisados diversos aspectos metabólicos de Orchidaceae relacionados ao rendimento fotossintético e às estratégias de balanço hídrico, que permitiram gerar importantes conclusões a respeito da aclimação das espécies *Gomesa flexuosa* e *Oncidium sphacelatum*.

No capítulo 1, objetivando avaliar qual das espécies teria maior contribuição no metabolismo fotossintético de *Oncidium* 'aloha', verificou-se que *G. flexuosa*, quando induzida à seca, apresentou modelo de compartimentalização fotossintética. Houve expressão da via CAM nos pseudobulbos e C₃ das folhas delgadas, cujos aerênquimas associados aos feixes vasculares conectando os dois órgãos, poderiam conduzir o CO₂ descarboxilado após a produção de ácidos orgânicos, originada pela respiração noturna das células do mesófilo foliar. Os dados sugerem que o cultivo e a produção de plantas devem levar em consideração a capacidade de conversão metabólica de *G. flexuosa* sob restrição hídrica e alta irradiação, uma vez que pode trazer uma implicação direta no melhor uso e aproveitamento da água, além de indicar melhores requisitos para proteção fotoquímica em condições extremas.

O capítulo 2 foi dedicado a aprofundar os conhecimentos acerca dos ajustes metabólicos observados nas duas espécies em questão, agora frente a vertente de memória fisiológica. Desse modo, foi feito o delineamento experimental para entender como informações previamente armazenadas após um evento de estresse podem auxiliar frente a um novo desafio às plantas, otimizando as respostas no evento estressante seguinte. Esse esforço se fez para gerar a melhor compreensão dos fatores que influenciam o crescimento das epífitas, relacionando o agrupamento de variáveis resposta que permitam avaliar padrões nestas plantas, cuja área ainda enfrenta muitas limitações. Para a espécie *G. flexuosa*, no segundo evento de estresse hídrico, há respostas que indicam o reconhecimento da adversidade hídrica enfrentada, cujos padrões metabólicos se ajustam em melhor *trade off* para a planta, trazendo implicações práticas para seu cultivo. *Oncidium sphacelatum* por sua vez, desde o primeiro evento de estresse enfrenta maior dificuldade em se manter de forma eficiente com as possíveis alterações ambientais, de forma que períodos de baixa pluviosidade prolongada afetam significativamente seu desempenho, e pode gerar problemas em seu cultivo e estabelecimento, com redução no rendimento fotossintético e maior suscetibilidade à fotoinibição.

O terceiro capítulo partiu da problematização relacionada à influência da alta irradiância somada à restrição hídrica, que ocorre comumente quando as árvores hospedeiras de Orchidaceae epífitas perdem parte de suas folhas durante a estação seca, ou se uma clareira é aberta em meio à floresta. Enquanto *G. flexuosa* apresentou um elevado desempenho quando

rustificada na luz, desde que haja fornecimento hídrico, *O. sphacelatum* não se rustifica e não apresenta memória fisiológica frente às diferentes formas de cultivo, revelando a necessidade de um olhar mais atento às condições de cultivo em orquidários.

Por fim, o capítulo 4 que traz a cartilha educativa, surge de um desejo profundo em colocar em prática a popularização da ciência, tão almejada na pós-graduação e tão necessária para estimular o contato cada vez mais íntimo com a sociedade. O objetivo principal é, sem dúvidas, fazer uma difusão do conhecimento científico para públicos não especializados, mas que contribuem para que os programas e as pesquisas científicas se mantenham ativos nas universidades públicas, buscando a emancipação intelectual e força do pensamento crítico operante do país.

Não menos importante, no decorrer da execução deste trabalho deparamo-nos com diversas situações interessantes e que por vezes, mudaram o direcionamento do projeto inicial, como a quantidade de material vegetal que se mostrou insuficiente para análises enzimáticas; dificuldade na padronização do protocolo para enzima málica, que apesar de todos os esforços aplicados, inviabilizou sua realização metodológica; o tempo necessário para as avaliações de trocas gasosas e relações hídricas que nos permitiram avaliar apenas um pequeno número amostral dentro do prazo de padronização, para não haver interferência na interpretação dos resultados. Por outro lado, questões importantes foram abordadas de forma sólida através de discussões profundas de fisiologia vegetal, visando principalmente difundir informações de cunho científico para aplicações de cultivo (que mais tarde podem contribuir com a obtenção de ganhos consideráveis em termos de estratégias de manejo e otimização de recursos, principalmente hídrico).

Novos estudos podem ser direcionados a partir dos dados gerados nesta tese, em meio à gama de informações levantadas das representantes da subtribo Oncidiinae, *G. flexuosa* e *O. sphacelatum*, orquídeas de interesse ornamental e medicinal, nativas de vegetações tropicais e semidecíduas da América Latina, até o momento com raros estudos de embasamento fisiológico. Os dados gerados então, poderão contribuir para programas de conservação de espécies nativas, além de gerar cada vez mais estratégias de cultivo, contribuindo com a sociedade orquidófila e ampliando as melhorias na exploração de recursos de forma consciente para fins comerciais.