

Giulio Cesare Stancato

ASSIMILAÇÃO E PARTIÇÃO DO CARBONO NA
ORQUÍDEA EPÍFITA (*Cattleya forbesii*
Lindl. X Laelia tenebrosa Rolfe) SOB
INFLUÊNCIA DA LUZ E DO DÉFICIT HÍDRICO

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato (a)
Giulio Cesare Stancato
e aprovada pela Comissão Julgadora.

25/2/99

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas,
UNICAMP, para a obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Mazzafera

co-Orientador: Dr. Marcos Silveira Buckeridge

Campinas, 1999

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	UNICAMP
V.	Ex.
TOMBO BC/	37884
PROD	229/99
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	11/06/99
N.º CPD	

CM-00123997-B

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA-UNICAMP

Stancato, Giulio Cesare

St24a

Assimilação e partição do carbono na orquídea epífita
Cattleya forbesii Lindl. X *Laelia tenebrosa* Rolfe sob influência
da luz e do déficit hídrico/Giulio Cesare Stancato. -- Campinas,
SP[s.n.], 1999.
148 f.: ilus.

Orientador: Paulo Mazzafera

Co-orientador: Marcos S.Buckeridge

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

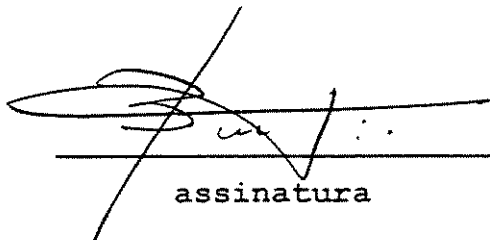
1. Carboidratos. 2. Orquídea. 3. Plantas-efeitos da seca. 4.
Fotossíntese. I. Mazzafera, Paulo. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 25 de fevereiro de 1999

Banca examinadora:

Titulares:

Dr. Marcos Silveira Buckeridge
co-Orientador
(presidente)

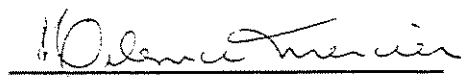


assinatura

Prof. Dr. Carlos Alfredo Joly

assinatura

Profa. Dra. Helenice Mercier



assinatura

Prof. Dr. Ladaslav Sodek



assinatura

Dra. Sonia Machado de Campos Dietrich



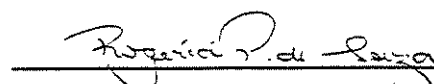
assinatura

Suplentes:

Prof. Dr. Ivany Ferraz Marques Válio

assinatura

Dra. Rogéria Pereira de Souza



assinatura

ÍNDICE

RESUMO.....	v
SUMMARY.....	vii
INTRODUÇÃO.....	1
Distribuição.....	4
Epífitas.....	10
Assimilação do CO ₂ atmosférico.....	15
Relações hídricas.....	17
Requerimento de luz e avaliação da fotossíntese.....	23
Estrutura e metabolismo de carboidratos em orquídeas.....	27
Invertase ácida.....	34
Orquídeas epífitas de matas tropicais e subtropicais.....	37
OBJETIVO....	42
MATERIAL E MÉTODOS	43
Material vegetal.....	43
Fase Experimental.....	44
Experimentos com plantas sob diferentes intensidades luminosas.....	45
Crescimento de plantas sob 22,5% e 90% da radiação fotossinteticamente ativa (RFA).....	48
Metabolismo de carboidratos e do ácido málico, na folha e no pseudobulbo, ao longo do dia.....	50
-açúcares solúveis não estruturais.....	51
-ácidos orgânicos.....	56
-carboidratos solúveis em água.....	58
-invertase ácida.....	61
Desempenho fotossintético e trocas gasosas em plantas sob 22,5% e 90%.....	65
-porômetro de equilíbrio dinâmico.....	67
-analisador da eficiência fotossintética de plantas.....	68
-análise estatística.....	70

MATERIAL E MÉTODOS	Ensaio com plantas submetidas a períodos de déficit hídrico.....	70
	-medições com fluorômetro: obtenção dos parâmetros de fluorescência.....	73
	-análise quali-quantitativa dos carboidratos solúveis : carboidratos da fração etanólica e carboidratos da fração aquosa.....	74
	-invertase ácida.....	75
	-relação massa seca/ massa fresca.....	76
	-conteúdo relativo de água.....	77
	-potencial osmótico.....	77
RESULTADOS.		79
	Crescimento de plantas sob 22,5% e 90% da RFA.....	79
	Metabolismo de carboidratos e do ácido málico ao longo do dia, em plantas mantidas sob 90% da RFA.....	83
	Desempenho fotossintético e trocas gasosas ao longo de 22 horas, em plantas sob 22,5% e 90% da RFA.....	95
	Ensaio com plantas submetidas a períodos de déficit hídrico.....	99
DISCUSSÃO..		113
	Plantas sob diferentes intensidades luminosas.....	117
	Plantas submetidas a períodos de déficit hídrico.....	125
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁF.		133
APÊNDICE 1.		147
APÊNDICE 2.		148

RESUMO

Estudos sobre a interação de plantas com o ambiente são importantes para o entendimento dos processos relacionados ao crescimento e desenvolvimento, estando as orquídeas epífitas brasileiras entre as plantas menos conhecidas nesses aspectos. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi estudar as respostas fisiológicas e metabólicas da orquídea epífita *C. forbesii* X *L. tenebrosa*, quando submetida a diferentes graus de intensidade luminosa e a vários períodos de déficit hídrico. Foram realizados quatro ensaios independentes. No primeiro, folhas e pseudobulbos foram coletados ao longo do dia (0, 2, 5 e 8h de luz) e os carboidratos solúveis em álcool e em água foram analisados quantitativamente por técnicas colorimétricas (açúcares solúveis totais, açúcares redutores e sacarose) e qualitativamente, através da cromatografia descendente em papel e por HPLC dos monossacarídeos. No segundo, plantas cultivadas por 173 dias sob dois níveis de intensidade luminosa (22,5% e 90% da radiação fotossinteticamente ativa, RFA) tiveram a área foliar e o volume dos pseudobulbos monitorados ao longo desse período. No terceiro ensaio foram efetuadas medidas de fluorescência e de trocas gasosas durante uma noite e um dia, em folhas de plantas cultivadas sob 90% da RFA, sob 22,5% e em plantas cultivadas inicialmente sob 22,5% e transferidas para 90% após duas horas de luz. No quarto ensaio, algumas plantas foram submetidas a períodos de déficit hídrico por 25 e 45 dias. Nas folhas, foram avaliados os níveis da eficiência fotossintética e, em amostras de folhas e pseudobulbos, foram

determinados a atividade da invertase ácida e o conteúdo e composição dos carboidratos solúveis em água e em álcool. Neste experimento, alguns componentes das relações hídricas foram acompanhados: potencial osmótico, conteúdo relativo de água (CRA) e relação massa seca/massa fresca. O híbrido estudado exibiu características do metabolismo CAM, apresentando acúmulo de ácido málico durante a noite e sua mobilização durante o dia. Os resultados mostraram que tanto a folha como o pseudobulbo acumulam carboidratos solúveis em água (glucomananos) como composto de reserva mas não foi detectado amido em testes com iodo e ao exame microscópico. Os resultados do primeiro ensaio sugerem que estes glucomananos são formados principalmente no pseudobulbo (pequena quantidade na folha) concomitantemente com a mobilização de ácido málico nas folhas, sugerindo que esta seria uma das formas de armazenar carbono, para ser posteriormente mobilizado. Embora as plantas cultivadas sob 22,5% da RFA tenham apresentado maiores taxas de crescimento, quando comparadas às plantas cultivadas sob 90%, tiveram seu desenvolvimento atrasado em 20 dias. A redução do desempenho fotossintético mostrada pelas plantas transferidas de 22,5% da RFA para 90% indica que sob 90% as plantas estariam sofrendo fotoinibição, talvez induzidas por altas temperaturas, não alterando os níveis de síntese de glucomananos. Provavelmente, a água e os glucomananos armazenados no pseudobulbo foram usados para manter a integridade celular enquanto a atividade fotossintética diminuía; os valores do CRA e da variação no potencial osmótico também indicam desidratação drástica dos tecidos, com consequências na inativação da invertase ácida e no fluxo de substâncias entre os órgãos, principalmente a sacarose.

SUMMARY

Studies on the interaction of plants with their surrounding environment are important for the understanding of processes related to growth and development, the Brazilian orchids being among the less known group of plants in this respect. In this way, the objectives of the present work were to analyse the physiological and metabolic responses of the hibrid orchid *Cattleya forbesii* X *Laelia tenebrosa* under distinct light intensities and drought periods. Four independent essays were performed. In the first, leaves and pseudobulbs were collected along one day (0, 2, 5 and 8h of light) and their alchool and water soluble carbohydrates were analysed quantitatively by colorimetric techniques (total and reducing sugars and sucrose) and qualitatively by paper chromatography and High Performance Liquid Chromatography of monosaccharides. In the second, plants were cultivated during 173 days under different light intensities (22.5 and 90% of the Photosynthetically active radiation, PAR) and their leaf area and pseudobulb volume were evaluated. In the third essay, fluorescence and gas exchange were measured during a night and day period in leaves of plants cultivated under 90% PAR, 22.5% PAR and plants initially growing under 22.5% PAR and subsequently transferred to 90% PAR after 2h. In the fourth essay, some plants were exposed to 25 and 45 days of water stress. The photosynthetic efficiency was evaluated in leaves and the activity of acid invertase and the contents and composition of alchool and water soluble carbohydrates were determinated in the sample of leaves and pseudobulbs. In this experiment, some

parameters of water relations were also measured: osmotic potential, relative content of water and dry/fresh weight ratios. The studied orchid presented characteristics of CAM metabolism, showing accumulation of malic acid during the night and mobilisation during the day. The results showed that both leaves and pseudobulbs accumulate glucomannan as a storage compound but starch was not detectable in the extracts either by iodine or microscopic examinations. The results suggest that glucomannan is formed mainly in the pseudobulb (some in the leaves) concomitantly with the mobilisation of malic acid in the leaves, suggesting that this might be one of the ways to store carbon for further mobilisation. Although plants cultivated under 22.5% PAR had presented higher growth rates when compared to the ones growing under 90% PAR, the first had its development retarded for almost 20 days. This might be related to photoinhibition due to damage induced by high temperatures, without however interfering with glucomannan metabolism. The water and glucomannan stored into the pseudobulbs were probably used to maintain cellular integrity whereas the photosynthetic activity decreased; the relative content of water and osmotic potential changed and a drastic dehydration occurred. All this influenced the inactivation of the acid invertase and the translocation of substances, mainly sucrose, between the plant organs.

INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae é, provavelmente, a maior família botânica entre as Angiospermas, estando descritas até a atualidade mais de 25.000 espécies e produzidos outros tantos híbridos por cruzamento de espécies selvagens e cultivadas. Existem orquídeas com as mais variadas dimensões, desde plantas extremamente pequenas, com flores muito reduzidas, até plantas com mais de três metros de altura, capazes de produzir hastes florais de comprimento superior a quatro metros (Suttleworth et al., 1970).

Formas tão diversas podem ser englobadas numa única família por possuírem uma estrutura floral idêntica (**FIGURA 1**). Numa flor típica de orquídea existem três sépalas e três pétalas, embora algumas destas partes possam aparecer fundidas ou bastante reduzidas. Uma das pétalas, o labelo, é diferente das outras, sendo quase sempre maior e mais vistoso. No centro da flor com ovário ínfero, está um órgão carnoso e claviforme, o ginostêmio ou coluna, como resultado da fusão dos filetes e estiletes; a presença da coluna e a grande diversidade de

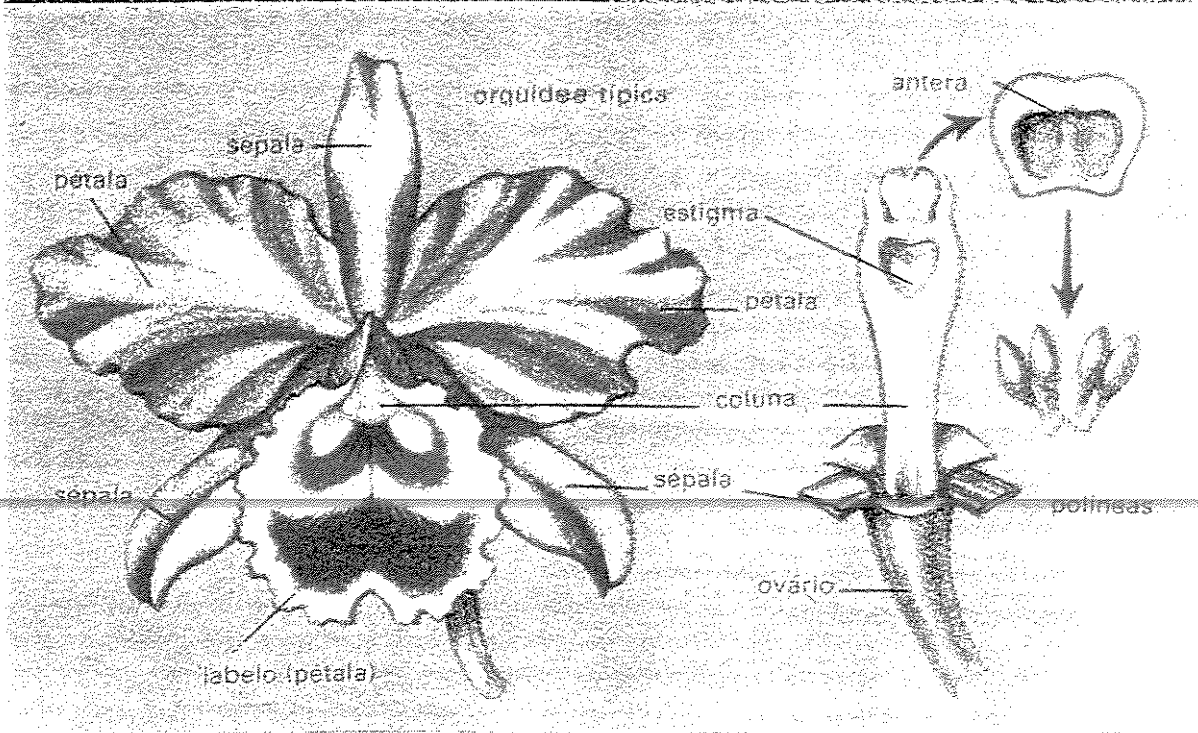
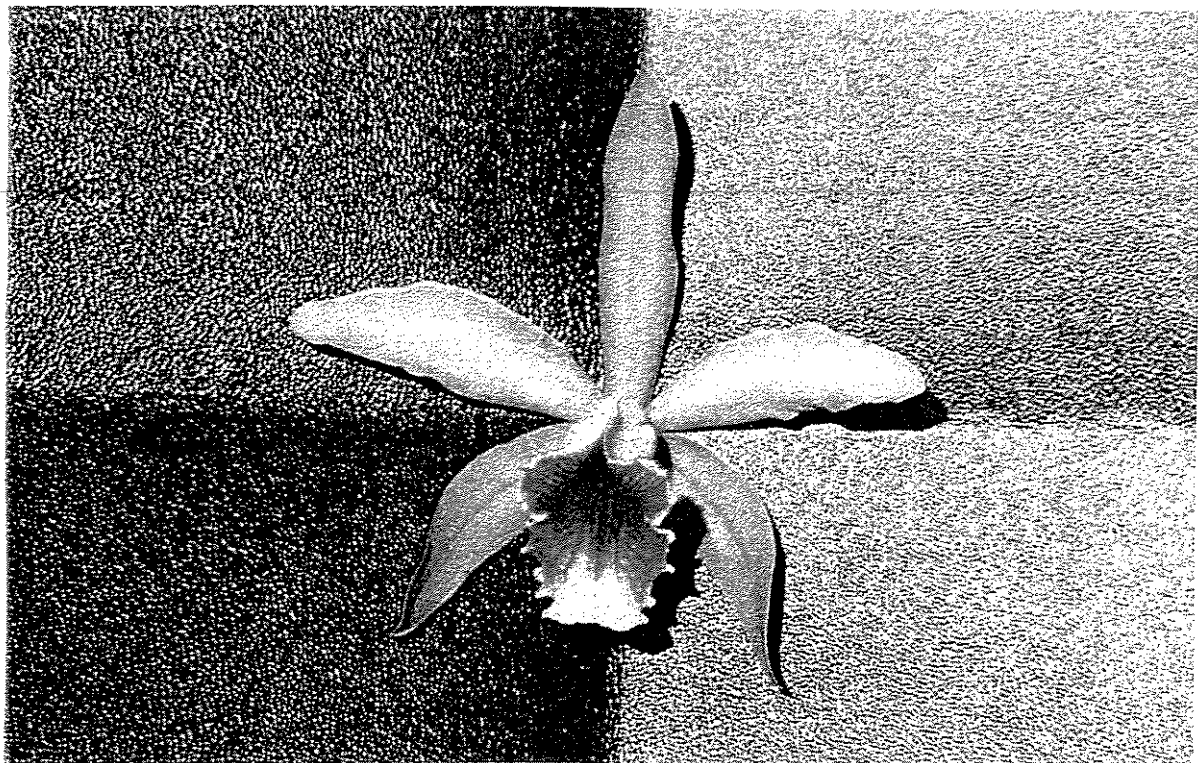


FIGURA 1. Fotografia de uma flor isolada do híbrido *Cattleya forbesii* Lindl. X *Laelia tenebrosa* Rolfe. Ilustração contendo a identificação das peças florais na família Orchidaceae. (FONTE: Suttleworth, 1970)

agentes polinizadores confere às orquídeas uma posição avançada na escala evolutiva das plantas. A antera está localizada na região apical da coluna e contém os grãos de pólen, os quais estão agrupados numa estrutura chamada polínia, variando de duas a oito polínias dependendo do gênero. Imediatamente abaixo da antera está uma pequena depressão de superfície viscosa, o estigma. Este conjunto caracteriza uma flor de orquídea.

A diversidade das espécies, a disposição dos verticilos florais e o grande número de agentes polinizadores, possibilitam a ocorrência de muitos cruzamentos. A hibridação das orquídeas ocorre tanto naturalmente como artificialmente. Até o momento nenhuma outra família de plantas produziu um número tão elevado de híbridos ou cruzamentos. Esta instabilidade genética parece estar associada à sua evolução recente como grupo distinto (Lenz & Wimber, 1959). A maior parte das plantas exploradas comercialmente é constituída por híbridos produzidos pelo homem; no entanto, muitas espécies selvagens são frequentemente cultivadas.

Outra característica importante para a maioria das orquídeas é a presença de uma camada de tecido esponjoso, conhecido como velame, ao redor do cilindro central da raiz. Embora não seja exclusivo desta família de plantas, o velame é bem desenvolvido não só nas orquídeas epífitas, como também nas litofíticas e nas terrestres (Shushan, 1959). O velame facilita

a absorção de água e sais minerais, especialmente entre as epífitas; outra função do velame é a conservação de água no sistema radicular.

Em quase todas as orquídeas as folhas estão arrançadas alternadamente em lados opostos do caule. Nas espécies em que o pseudobulbo está ausente, as folhas ou as raízes se transformam em órgão de reserva de substâncias e de água. As folhas da maioria das orquídeas são coriáceas, porém existem orquídeas com folhas delgadas e membranáceas unidas ao pseudobulbo. Algumas espécies apresentam folhas caducas com zona de abscisão delimitada sobre o pseudobulbo. Os estômatos estão distribuídos por todos os órgãos verdes da planta, mas estão em maior número nas folhas, com distribuição abaxial na maioria das orquídeas (Fanfani & Rossi, 1988).

DISTRIBUIÇÃO

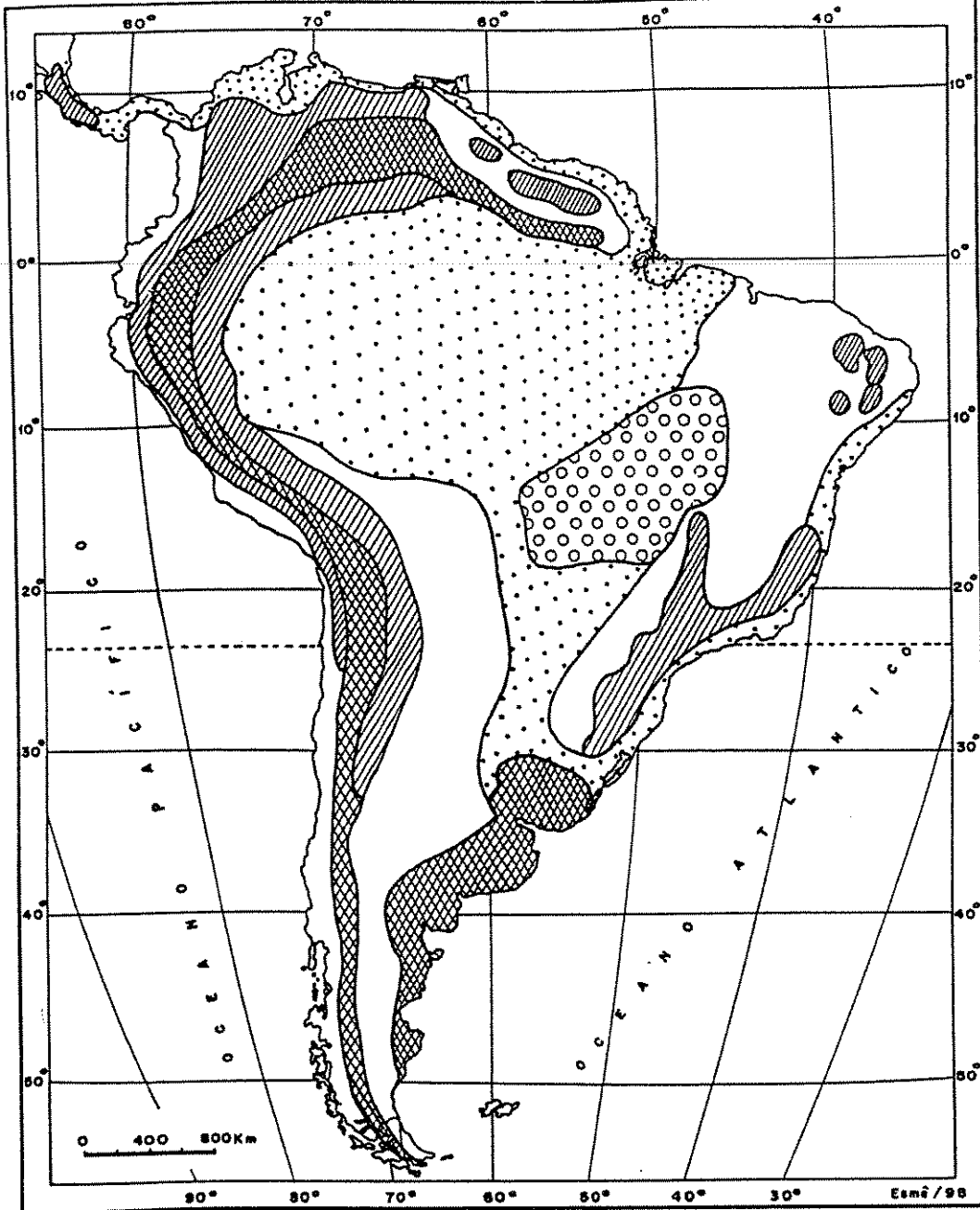
É possível encontrar orquídeas em praticamente todas as regiões do mundo, contudo, é nas regiões mais quentes da Terra que ocorrem em maior abundância, não só em número como em formas variadas (Holtum, 1955). São encontradas em locais desde o nível do mar até a mais de 4.000m, sendo mais freqüentes em altitudes entre 500 e 2.000m.

Embora existam orquídeas nativas em todos os continentes, com exceção da Groenlândia e das regiões árticas e

antárticas, de acordo com Pabst & Dungs (1975) e Rentoul (1987), as condições climáticas que regulam a sua ocorrência são as mesmas no mundo inteiro, permitindo estabelecer quatro províncias ou zonas climáticas e geográficas (**FIGURA 2**).

A província 1 contém em torno de 60% dos gêneros e das espécies existentes. Geograficamente, abrange a Serra do Mar, no Brasil e a faixa média dos Andes. Estas, estão entre as regiões com maior umidade atmosférica, nas quais ocorre precipitação durante todo o ano, em intensidade variável. A grande diversidade em orquídeas nestas regiões não é consequência unicamente da alta umidade atmosférica, mas também da renovação constante do ar atmosférico. O período úmido nesta província ocorre à noite, com formação de neblina, e, sazonalmente, durante o dia com a ocorrência de precipitações. Mesmo na estação menos chuvosa, ocorre intensa formação de neblina durante a noite.

A província 2 abrange as regiões quentes da costa da América do Sul bem como a Bacia Amazônica; também abrange regiões com características semelhantes, caracterizadas pelo clima tropical quente e úmido. A proximidade do mar ou de regiões alagadiças no interior do continente e a floresta tropical, proporcionam alta umidade atmosférica, mas todas as plantas desta província, inclusive as orquídeas, apresentam dispositivos que retardam a transpiração. A rigor, são estas regiões mais a evaporação da água do mar, as responsáveis pelo



Provincia 1 Provincia 2 Provincia 3
 Provincia 4 Não ocorrência de orquídeas

FIGURA 2. Distribuição das orquídeas na América do Sul, em províncias, em função das condições climáticas e geográficas, de acordo com Pabst & Dungs (1975).

suprimento da umidade que abastece a província 1, na forma de chuva ou neblina.

Na época das chuvas, dias quentes e úmidos alternam-se com dias quentes e secos. Tempestades violentas, porém breves, são seguidas por dias de estiagem, com temperaturas noturnas semelhantes às diurnas. Ventos fortes e secos sopram do continente, reduzindo drasticamente a umidade. Nestas regiões, com a atmosfera úmida e estagnada, a mata é pobre em orquídeas. Porém, em qualquer clareira, beira de riachos, pontas de galhos nas altas copas, mesmo em lajes desnudas, é grande a população de orquídeas, mostrando que a ocorrência localizada não é somente função da necessidade de luz mas também da necessidade de renovação do ar atmosférico.

A província 3 localiza-se no Planalto Central, no Brasil, abrangendo áreas no interior do continente, onde a influência dos ventos marítimos não se faz sentir. Estas áreas estão situadas em altitudes de 500 a 1.000m, sendo compostas pelos planaltos de MG, GO e MT. Além das orquídeas litofíticas (que crescem sobre a rocha nua) e saxícolas (que crescem sobre camadas de seixos), as epífitas vivem sobre escassas palmeiras ou nas estreitas faixas de mata ciliar. O solo é geralmente pobre, raso e possui sub-solo com cascalho. Neste solo só permanecem árvores e arbustos que buscam a umidade do lençol freático às vezes a 20 ou 30m de profundidade. As orquídeas adaptaram-se aos longos períodos de seca, sendo que muitas

perdem as folhas depois da floração para rebrotar novamente na época das chuvas, e o orvalho é a única fonte de umidade que lhes permite atravessar o período de seca. Climaticamente, esta região é caracterizada por dias quentes e secos e por noites muito frescas. A oscilação da temperatura entre dia e noite e entre verão e inverno é mais acentuada. Amplitude térmica diária em torno de 35°C ocorre com frequência bastante acentuada, caracterizando uma região onde se alternam fortes extremos. As orquídeas epífitas desta província preferem as estreitas matas ciliares que acompanham os rios, às vezes por centenas de quilômetros, as quais funcionam como vias de migração de orquídeas. Os brejos e alagados abrigam grande número de orquídeas. As árvores presentes nestes alagados acolhem algumas epífitas, entre elas espécies do gênero *Catasetum*.

A província 4 é formada pelas regiões frias do mundo inteiro, principalmente onde o inverno é rigoroso. Na América do Sul abrange a Patagônia e as partes mais altas dos Andes. As orquídeas epífitas nestas regiões são raras. No extremo meridional da América do Sul só ocorrem orquídeas terrestres. No Brasil, existem algumas espécies nos cumes da Serra da Mantiqueira.

Em cada província, a interação dos elementos climáticos como temperatura, umidade, radiação, pressão atmosférica, tipo e quantidade de nuvens, precipitação e

velocidade do vento, entre outros, proporciona a coexistência de grupos de orquídeas com características anatômicas e funcionais semelhantes, permitindo que a diversidade entre grupos na mesma província seja diretamente proporcional às possíveis combinações entre os elementos climáticos (Benzing & Renfrow, 1971). As mudanças não ocorrem na mesma intensidade para todas as espécies, o que possibilita vários níveis de adaptação.

Cada província possui características geográficas e climatológicas distintas, sendo que as orquídeas nativas de uma dada província mostram aspectos que refletem as condições a que estão submetidas. Províncias com características peculiares como grande amplitude térmica ou umidade relativa do ar elevada ou precipitação pluviométrica concentrada em período reduzido do ano, impõem diferentes restrições ao crescimento e desenvolvimento. Orquídeas submetidas a grandes amplitudes térmicas apresentam pequeno porte e taxas reduzidas de crescimento (Miranda, 1989), sugerindo que a redução no acúmulo de matéria orgânica pode estar ligada à utilização de rotas de síntese e de degradação que sejam operantes sob determinadas condições ambientais. Por outro lado, orquídeas nativas de regiões com chuvas em poucos meses do ano, apresentam taxas elevadas de acúmulo de massa seca nesse período, inclusive de flores. Isso indica que a ação dos elementos climáticos pode induzir alterações fisiológicas nas plantas, muitas vezes

provocadas por condições recorrentes de estresse, permitindo o estabelecimento de processos bioquímicos e metabólicos específicos para determinados grupos de orquídeas.

Como esta tese tem por objetivo analisar alguns dos componentes da interação entre as orquídeas epífitas da Mata Atlântica e os elementos climáticos, englobando espécies localizadas nas províncias 1 e 2, as informações aqui contidas são relacionadas, principalmente, às orquídeas deste grupo.

EPÍFITAS

A família Orchidaceae pode ser considerada muito diversificada, incluindo espécies características de vários habitats, no entanto, existe um aspecto que caracteriza grande parte das espécies: 70 a 80% das orquídeas nativas das regiões tropicais e subtropicais têm as copas das árvores como habitat, principalmente as copas mais altas, com as raízes aderentes aos ramos (Suttleworth et al., 1970). Estas orquídeas são chamadas de epífitas e, talvez, possuam o maior grau de especialização entre as plantas superiores, com as espécies desenvolvendo estruturas que conservam água e nutrientes, como reserva para períodos críticos. Elas estão direta ou indiretamente expostas à radiação solar tropical, recebendo chuvas intermitentes e submetidas às correntes de ar. Estas condições produzem um

ambiente um tanto quanto xerofítico, porém bastante adequado para as orquídeas epífitas (Withner, 1959).

De acordo com Benzing (1990), as epífitas não possuem o sistema radicular desenvolvido, não utilizam a água do solo e estão freqüentemente expostas ao estresse. O crescimento e desenvolvimento de uma epífita verdadeira ocorre sem qualquer contato com o solo ou com o sistema vascular da planta suporte ou hospedeira. Estão distribuídas em zonas tropicais, subtropicais e semi-áridas, em habitats caracterizados por déficit hídrico recorrente (Medina et al., 1986; Benzing, 1984), apresentando diferentes níveis de exigência de luz, umidade e temperatura.

As orquídeas epífitas exibem hábito de crescimento simpodial ou monopodial (**FIGURA 3**). Nas orquídeas simpodiais, cada simpódio tem crescimento individualizado, com formação de inflorescência na região apical. O crescimento vegetativo tem continuidade a partir de gemas axilares na base do pseudobulbo. Depois de algum tempo, com repetidos ciclos de crescimento, a orquídea simpodial torna-se um grupo de pseudobulbos unidos entre si, com metabolismo interligado; uma vez separados em grupos menores, cada conjunto originará uma nova planta (Benzing, 1990). A presença do pseudobulbo só ocorre em orquídeas epífitas simpodiais e pode proporcionar algumas vantagens ecológicas, permitindo sua sobrevivência em situações prolongadas de estresse hídrico. Gêneros como *Cattleya*,

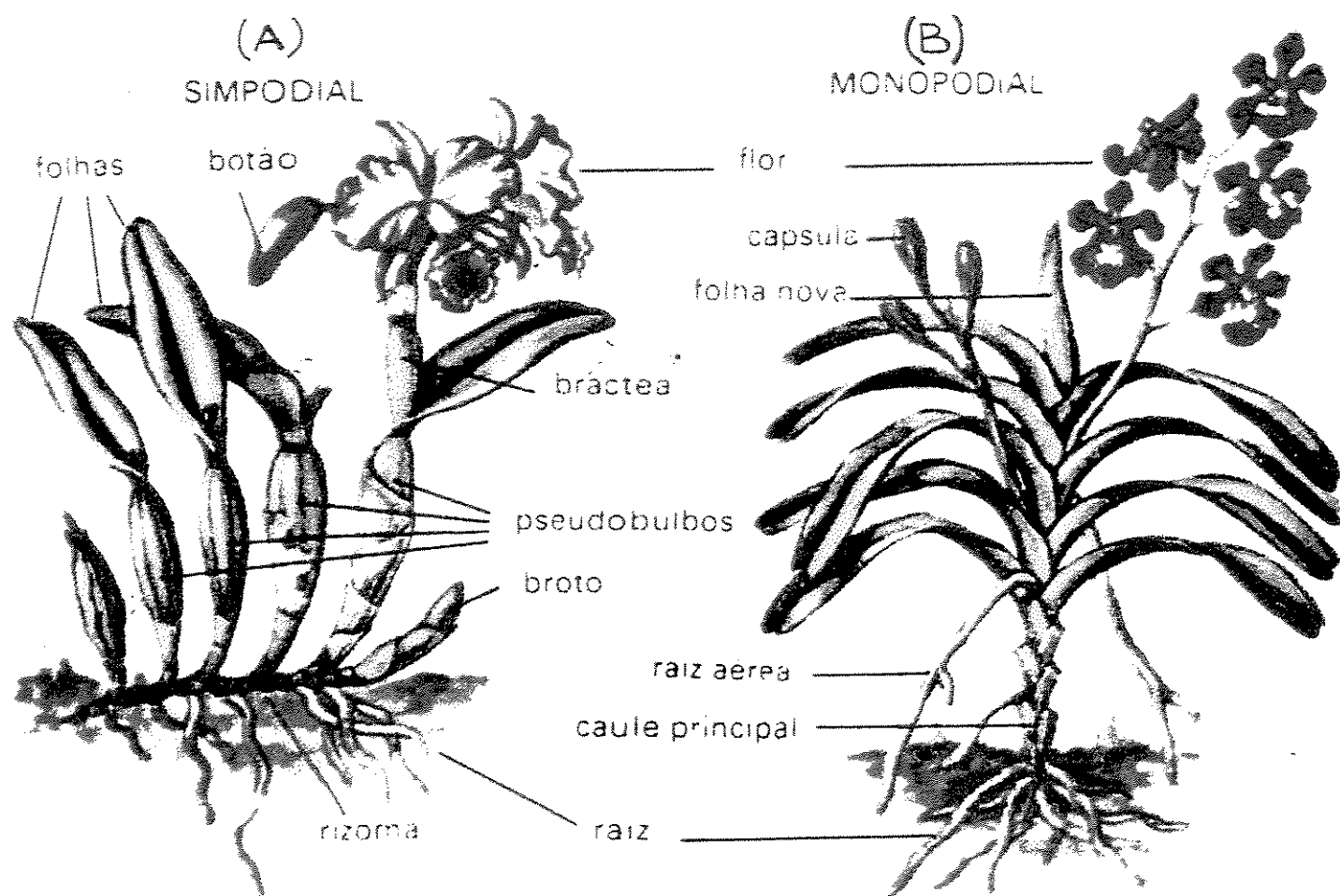


FIGURA 3. Ilustração mostrando os hábitos de crescimento simpodial (A) e monopodial (B), apresentados pelas orquídeas epífitas. (FONTE: Suttleworth, 1970)

Cymbidium, *Dendrobium*, *Laelia* e *Oncidium*, são exemplos de orquídeas simpodiais. Em orquídeas monopodiais, a região apical do monopódio cresce vegetativamente e as inflorescências são produzidas a partir de gemas axilares.

A relação das orquídeas epífitas com os fatores bióticos e abióticos permite classificá-las de diferentes formas. A classificação baseada nas relações hídricas é uma das mais importantes, já que a água é um fator limitante no hábitat epifítico e sua disponibilidade interfere no crescimento e desenvolvimento destas plantas.

Nesta classificação, de acordo com a resposta da planta à disponibilidade de água, as orquídeas epífitas são consideradas plantas que crescem em locais onde a água é escassa na maior parte do tempo, sendo denominadas de xerófitas (Lüttge, 1989). Estas orquídeas xerófitas podem ser divididas em xerófitas tolerantes e xerófitas que escapam ou evitam o déficit hídrico.

As xerófitas que escapam ou evitam o déficit hídrico não são xerófitas verdadeiras, mas comportam-se como mesófitas sazonais, restringindo seu crescimento ao período úmido do ano. Durante o período de seca estas plantas apresentam sintomas de senescência e eliminam partes do seu corpo que possam causar a sua desidratação. O metabolismo do pseudobulbo é reduzido até um estado de baixa atividade metabólica, sendo este órgão da planta menos vulnerável à dessecação durante o período seco

(Benzing, 1990); o pseudobulbo possui reservas em carboidratos e grande quantidade de gemas, necessárias para renovar o crescimento quando as condições favoráveis retornam (Lüttge, 1989).

As xerófitas tolerantes ao déficit hídrico existem em maior número que as xerófitas que escapam, possuindo mecanismos anatômicos e fisiológicos que permitem manter uma economia da água utilizável, recorrendo a uma variedade de recursos dinâmicos e estruturalmente coordenados como uma primeira linha de defesa contra a seca (Goh & Kluge, 1989).

A pressão do meio ambiente, especialmente do estresse hídrico, induz modificações e adaptações morfológicas para permitir o crescimento e desenvolvimento das plantas. Uma característica marcante em orquídeas xerófitas é a presença de tecidos que armazenam água, sendo que a suculência pode ocorrer na folha, no caule e também na raiz, para algumas espécies. Na folha, está relacionada com um tecido homogêneo, a hipoderme, também chamado de mesófilo armazenador de água, que apresenta células fotossinteticamente ativas, clorênquima e cutícula que dificultam ou retardam a transpiração (Lüttge, 1989). No caule, o pseudobulbo é uma parte modificada do rizoma que armazena principalmente água e carboidratos, sendo comparado, em função, aos bulbos verdadeiros.

ASSIMILAÇÃO DO CO₂ ATMOSFÉRICO

O metabolismo tipo CAM consiste na fixação noturna de CO₂ atmosférico por órgãos fotossintéticos de plantas superiores, numa reação catalisada pela enzima fosfoenol piruvato carboxilase (PEP-case). O CO₂ fixado é acumulado no vacúolo da célula na forma de ácido málico; durante o dia seguinte o ácido málico é novamente transportado ao citoplasma, onde é descarboxilado, ocorrendo a incorporação do CO₂ liberado em carboidratos através do ciclo C₃, no interior do cloroplasto (Kluge & Ting, 1978). Osmond (1978) reconhece quatro fases no curso diário do intercâmbio de CO₂ e o metabolismo do ácido málico em plantas tipo CAM, plenamente hidratadas. A fixação noturna do CO₂ corresponde à Fase I, o início do período luminoso à Fase II, a descarboxilação diurna, com os estômatos fechados, do ácido málico acumulado durante a noite abrange a Fase III, e a fixação do CO₂ liberado da descarboxilação, através da enzima Ribulose-Bifosfato Carboxilase/Oxigenase (RUBISCO), tornando menos ácido o tecido fotossintético, constitui a fase IV. O funcionamento deste sistema bioquímico está associado a um ritmo diário de abertura noturna e fechamento diurno dos estômatos e sua ocorrência está associada com células fotossinteticamente ativas de órgãos com grau de suculência variável.

Os trabalhos realizados têm demonstrado que o metabolismo tipo CAM é mais ativo em ambientes com grande oscilação térmica diária (Osmond, 1978; Medina, 1987). As temperaturas noturnas moderadas favorecem o acúmulo de ácido málico, enquanto que altas temperaturas inibem; provavelmente isto ocorre como consequência da competição por substrato entre o ciclo de Krebs e a reação de fixação do CO_2 , catalisada pela PEP-case (Medina, 1984; Winter et al., 1986). Provavelmente, o baixo nível respiratório estaria associado à alta atividade do metabolismo tipo CAM, na mesma célula.

De acordo com Medina et al. (1987), para ser considerada tipo CAM ativa, uma planta deve apresentar intensa acidificação noturna do tecido fotossintético, decorrente da fixação noturna do CO_2 ; esta acidificação representa o incremento noturno de ácido málico ou da acidez titulável do suco vacuolar, expresso em equivalentes de acidez por unidade de massa fresca.

Um dos primeiros estudos sobre a incorporação do CO_2 atmosférico pelas orquídeas foi realizado por Nuernbergk (1963), com um aparelho de medição da fotossíntese, IRGA ("infra-red gas analyser"), e revelou os seguintes pontos: gêneros de orquídeas que apresentam folhas espessas ou suculentas (*Cattleya*, *Epidendrum*, *Laelia*, *Schomburgkia*, *Encyclia* e outros), absorvem o CO_2 atmosférico à noite e esta absorção é acompanhada pelo acúmulo de ácido málico na folha;

no período luminoso subsequente, a acidez da folha diminui. As informações sugerem que estas orquídeas utilizam o mecanismo de absorção do CO_2 atmosférico conhecido como Metabolismo Ácido das Crassuláceas (CAM). Por outro lado, gêneros de orquídeas com folhas mais finas como *Catasetum*, *Cymbidium*, *Paphiopedilum*, *Thunia*, etc, apresentam incorporação de CO_2 durante o dia, com metabolismo tipo C_3 .

Os estudos realizados nos últimos vinte e cinco anos, entre os quais Ando & Ogawa (1987) e Holthe et al. (1992), mostraram que as afirmações de Nuernbergk (1963) mantêm-se corretas.

Dos três tipos de metabolismos fotossintéticos conhecidos em plantas, ou seja, o ciclo de Calvin (C_3), a via de Kortschak/Hatch & Slack (C_4) e o Metabolismo Ácido das Crassuláceas (CAM), somente os metabolismos tipo C_3 e CAM estão presentes em epífitas de regiões tropicais e subtropicais. Nestas regiões são encontradas plantas tipo CAM praticamente em todos os ambientes (Medina, 1987).

RELAÇÕES HÍDRICAS

As plantas vasculares devem despender água para produzir biomassa, sendo que a manutenção do turgor é necessária para o crescimento. A perda do turgor afeta a taxa de crescimento da célula, a expansão da folha e a abertura

estomática (Hale & Orcutt, 1987). Quando o estômato abre para o influxo de CO_2 , o vapor d'água sai da planta numa taxa muito alta. Se a perda de água por transpiração excede a absorção, a água nos tecidos condutores fica submetida à tensão.

Em relação às orquídeas epífitas, ocorre a manutenção de um balanço hídrico favorável, ou seja, aquele que possibilita o crescimento e o florescimento num ambiente sujeito às oscilações diárias de umidade e temperatura. Isto indica que estas plantas dispõem de mecanismos ecofisiológicos que modulam constantemente a disponibilidade de água e a incorporação de massa seca, dentro de certos limites, promovendo um ajuste mais rápido frente às variações ambientais.

Dentre os muitos fatores abióticos que interferem na sobrevivência das epífitas, a umidade é provavelmente o principal fator limitante a curtíssimo prazo, sendo que a tolerância ao déficit hídrico torna-se decisiva para a sobrevivência da planta. Cada vez que a umidade se reduz, o que algumas vezes requer somente uma ou duas horas, rapidamente diminui a disponibilidade de água para a planta; esta situação ocorre ao longo de todos os dias e exige medidas eficazes para evitar que a desidratação seja um processo irreversível (Benzing, 1990).

Quando o déficit se desenvolve, uma competição por água ocorre entre as diversas partes da planta, sendo que um

dos fatores que controlam a distribuição de água é o estágio de crescimento e desenvolvimento. As regiões meristemáticas e os órgãos em formação, principalmente, podem competir por água (Hale & Orcutt, 1987).

Aspectos da morfologia e do metabolismo revelam que o déficit hídrico é uma poderosa força seletiva que age sobre as plantas epífitas. Uma das mudanças fisiológicas que ocorre é o ajuste osmótico, sendo que pequenas mudanças na turgidez podem provocar alterações no metabolismo. Enquanto o déficit se desenvolve, há uma redução gradual no potencial osmótico, com aumento da concentração de solutos devido à perda de água.

Turner (1979) classifica dois tipos de tolerância ao déficit hídrico. No primeiro tipo, a tolerância é devida à manutenção de altos níveis do potencial de água do tecido, procurando reduzir a perda ou atuando na manutenção da absorção de água. No segundo, a tolerância é consequência da redução do potencial de água em função do ajuste osmótico ocorrido, contribuindo para a alta turgidez do tecido. Nas xerófitas que toleram a perda de grande quantidade de água o protoplasma está submetido a potenciais muito baixos.

Uma importante adaptação em muitas plantas submetidas ao déficit hídrico é o acúmulo de certos compostos químicos tais como sacarose, aminoácidos (prolina) e vários outros que abaixam o potencial osmótico e, assim, o potencial de água. Em

plantas do tipo CAM, o ácido málico acumulado torna o potencial da célula mais negativo, facilitando a absorção de água.

Para Hsiao (1973), quando ocorre uma redução no potencial de água da ordem de décimos de Mpa (megapascal) e o conteúdo relativo de água (CRA) diminui em torno de 8 a 10%, o déficit hídrico é considerado suave. Sob déficit moderado, o potencial de água atinge a faixa de -1,2 a -1,5MPa e o abaixamento no CRA permanece entre 10 e 20%. Plantas sob déficit severo têm o potencial de água inferior a -1,5MPa e o CRA sofre uma redução superior a 20%. O CRA expressa a água na amostra original como uma porcentagem da água no tecido completamente hidratado sendo uma medida direta da quantidade de água presente num tecido.

A razão massa seca/massa fresca também é um indicador da quantidade de água no tecido, sendo que o acúmulo e a distribuição da massa seca em plantas variam nas diferentes fases do crescimento e em diferentes níveis de hidratação. A massa seca mostra o acúmulo de substâncias, sendo basicamente composta por polissacarídeos da parede celular, lignina e componentes protoplasmáticos, incluindo proteínas, lipídeos, aminoácidos, ácidos orgânicos e minerais (Salisbury & Ross, 1991).

As características anatômicas da folha, a via fotossintética de incorporação do CO₂ atmosférico e a taxa de transpiração, auxiliam as plantas contra a perda excessiva de

água. Entre os três fatores mais importantes que ajudam a planta a evitar a dessecação e maximizar o uso da capacidade fotossintética, estão: o ajuste da condutância estomática, a regulação osmótica e a fixação de CO₂ via β -carboxilação, sendo o primeiro o mais efetivo (Benzing, 1990). Sob déficit hídrico, o controle hidrostático da abertura estomática é superior aos outros controles, sendo que, nas epífitas, os estômatos são delicados sensores de umidade (Lange & Medina, 1979). A alta temperatura e a baixa umidade relativa, que aumentam a transpiração sem promover fotossíntese adicional, induzem à diminuição da condutância estomática e da taxa de transpiração.

Poucos estudos têm examinado o papel dos estômatos como o de um sensor de umidade nas epífitas tipo C₃ ou CAM (Benzing et al., 1982). Alguns trabalhos realizados com orquídeas epífitas que possuem folhas suculentas, mostram que elas perdem água lentamente quando submetidas ao déficit hídrico. Sinclair (1983a e b, 1984) obteve dados quantitativos sobre a variação nos parâmetros hídricos em algumas orquídeas epífitas tipo CAM *Eria velutina*, *Dendrobium tortile* e *D. crumenatum* sob déficit hídrico. Esse autor verificou que mesmo após um período relativamente longo, em torno de 25 dias, o CRA apresentou valor elevado. Em *E. velutina*, atingiu 65% após 25 dias de déficit, permanecendo em torno de 90% em folhas de *D. tortile* e *D. crumenatum*, no mesmo período; paralelamente, foi observado um declínio no potencial de água na folha. Sinclair

(1983b) argumenta que a seiva de orquídeas epífitas tipo CAM é mais diluída, o que permite associar uma grande redução no CRA a uma pequena redução no potencial de água. Nas três orquídeas estudadas, a atividade estomática foi ligeiramente alterada sob déficit hídrico, ocorrendo a abertura noturna dos estômatos. As espécies *E. velutina* e *D. tortile* mostraram quase o mesmo valor de amplitude no ritmo CAM de acidez, em plantas hidratadas e em plantas sob déficit hídrico, sendo que as plantas de *D. crumenatum* sob déficit hídrico apresentaram redução acentuada neste valor.

Os dados obtidos por Sinclair (1983a e b) não refletem o comportamento de todas as orquídeas epífitas sob déficit hídrico, uma vez que outros trabalhos (Kenyon et al., 1981; Fu & Hew, 1982; Lüttge, 1987; Griffiths et al., 1989) mostraram a redução no valor da amplitude do ritmo CAM de acidez, indicando um declínio da atividade CAM em outras orquídeas epífitas.

O pseudobulbo pode ser importante para explicar a redução mais lenta do conteúdo de água na folha e também do potencial de água, que ocorre em orquídeas epífitas durante um período de déficit hídrico (Ertelt, 1992; Zheng et al., 1992). Provavelmente, a água perdida por transpiração na folha pode ser prontamente repostada pela água previamente armazenada no pseudobulbo. Este mecanismo pode ser comparado com o rápido transporte de água que ocorre entre tecidos, em outras plantas

suculentas (Schäfer & Lüttge, 1987), porém, o possível papel do pseudobulbo como fonte de água para as folhas ainda necessita de confirmação (Zimmerman, 1990).

REQUERIMENTO DE LUZ E AVALIAÇÃO DA FOTOSSÍNTESE

A partir da comparação de curvas de saturação de luz, dentro da faixa do espectro solar fotossinteticamente ativo, pode-se concluir que as orquídeas epífitas apresentam características de plantas de sol, ou de plantas intermediárias entre sol e sombra (Lüttge, 1989). Porém, deve-se distinguir entre o requerimento de luz para a fotossíntese propriamente dita e o requerimento de luz para os processos relacionados à via tipo CAM, entre outros a degradação de ácidos orgânicos que ocorre durante o dia. Existem vários trabalhos mostrando que a formação do ácido málico durante a noite e o seu desaparecimento durante o dia seguinte, necessitam de alta intensidade luminosa (Osmond, 1978; Barrow & Cockburn, 1982), ou seja, a variação diurna no nível do ácido málico depende da intensidade luminosa.

Estudos realizados por Goh et al. (1977) em três orquídeas epífitas, com folhas suculentas e metabolismo tipo CAM, mostraram que somente nas plantas do gênero *Cattleya* ocorreu diminuição na concentração dos ácidos orgânicos, sob baixa intensidade luminosa, permitindo a abertura dos estômatos

e a síntese de ácido málico na noite seguinte. Mesmo que a maioria das epífitas tipo CAM seja encontrada em locais com alta intensidade luminosa, também existem plantas tipo CAM em ambientes sombreados (Winter et al., 1983).

Em geral, as epífitas CAM apresentam melhor desempenho sob alta intensidade luminosa quando comparadas às epífitas com metabolismo C_3 (Winter et al., 1983). Porém, somente algumas espécies de orquídeas resistem a longos períodos de exposição direta à luz solar, uma vez que pode ocorrer a fotoinibição da fotossíntese (Osmond, 1978; Winter et al., 1983).

Na prática, a avaliação do desempenho fotossintético de plantas tipo CAM é feita através de medidas de fluorescência, já que os aparelhos empregados utilizam medidas de trocas de gases entre a folha, via estômato, e o ambiente. Parte do "quanta" de energia absorvido pela clorofila é emitido como fluorescência na faixa de luz monocromática do vermelho. As características espectrais da fluorescência podem ser usadas para estudar o transporte fotossintético de elétrons no esquema Z, e os processos fisiológicos associados (Bjorkman & Demmig, 1987).

Quando uma folha é iluminada numa intensidade constante, ela emite fluorescência normalmente. Contudo, se a folha é mantida no escuro por vários minutos e então é iluminada intensamente, a fluorescência rapidamente aumenta de

um nível baixo (F_0) para um nível máximo (F_m) e em seguida diminui gradualmente até um nível próximo ao nível original. A cinética desta resposta foi primeiro observada por Kautsky (1931, citado por Hall & Rao, 1995) e é conhecida como efeito Kautsky. No nível zero, todos os centros de reação da clorofila *a* estão abertos para aceitar fótons, ou seja, F_0 mede a fluorescência dos centros de reação livres. Sendo a iluminação contínua, todos os centros de reação vão se tornando reduzidos, até que não mais aceitem fótons, ou seja, os centros de reação estão ocupados; a fluorescência medida neste ponto é a F_m . A queda subsequente de fluorescência resulta da oxidação de compostos no fotossistema II. A diferença entre os níveis máximo (F_m) e o mínimo (F_0) é o componente variável da fluorescência (F_v).

Foi mostrado que o coeficiente de extinção da fluorescência, que indica a proporção de fótons absorvidos pelo fotossistema II, apresenta valor bem próximo da razão F_v/F_m (Butler & Kitajima, 1975), tendo sido demonstrado experimentalmente que esta relação é proporcional à taxa de fotossíntese líquida de folhas intactas (Bjorkman & Demmig, 1987), medida como assimilação de CO_2 ou liberação de O_2 .

A razão F_v/F_m é afetada por fatores de estresse, particularmente pela fotoinibição, a qual diminui a capacidade fotossintética da folha induzida pela exposição aos altos fluxos de radiação fotossinteticamente ativa. A fotoinibição é

causada por uma transferência do excesso de "quanta" produzido durante a reação luminosa, para os centros de reação, ao invés de eliminá-lo como calor ou fluorescência. A fotoinibição é seguida pela fotoxidação e na maioria dos casos é reversível (Hall & Rao, 1995).

A fotoinibição em plantas tem sido observada sob três condições: **1ª)** quando as plantas são expostas a um nível de irradiância maior do que aquele sob crescimento; **2ª)** quando as plantas estão submetidas temporariamente a um baixo nível de CO_2 ; **3ª)** quando as plantas são mantidas a temperaturas abaixo de 10°C , mesmo sob nível regular de irradiância (Bjorkman & Demmig, 1987). A extensão da fotoinibição pode prontamente ser determinada pela medida do transporte fotossintético de elétrons, pela troca de O_2 ou através dos níveis de fluorescência (Winter & Gademann, 1991; Keiller et al., 1994).

Os parâmetros de fluorescência F_0 , F_m , F_v , e a relação F_v/F_m , são afetados por vários tipos de estresse, principalmente aqueles relacionados à intensidade luminosa, à temperatura e à disponibilidade hídrica (Park et al., 1997). F_0 é afetado por qualquer estresse ambiental que provoque alterações estruturais nos pigmentos do fotossistema II; um dano térmico ao fotossistema II causa aumento significativo no F_0 , sendo que a fotoinibição proporciona um aumento insignificante em F_0 . O F_v normalmente diminui por estresse ambiental (calor, congelamento e fotoinibição), causando danos

27

aos tilacóides. O F_m diminui após a exposição das folhas à alta temperatura, sem injúria. O tratamento de calor mais severo resulta no aumento de F_0 e na diminuição de F_m , acompanhados pela inibição da atividade do fotossistema II (Schreiber et al., 1986).

Em geral, a razão F_m/F_0 depende do potencial de água na folha e apresenta um valor próximo de 1,0 quando a planta está sob déficit hídrico; após a reidratação ou em condições não estressantes este valor aumenta para próximo de 3,0 (Butler & Kitajima, 1975).

ESTRUTURA E METABOLISMO DE CARBOIDRATOS EM ORQUÍDEAS

Sendo um dos maiores grupos de compostos orgânicos, os carboidratos estão diretamente envolvidos no crescimento e no desenvolvimento das plantas, atuando na produção de energia para atividade celular, na estrutura e proteção, nas relações hídricas, na síntese de proteínas e lípideos, entre outras atividades.

As três maiores classes de carboidratos são os monossacarídeos, os oligossacarídeos e os polissacarídeos. Os monossacarídeos são açúcares simples, constituídos por uma unidade de poli-hidroxi acetona ou aldeído (Conn & Stumpf, 1976). Os monossacarídeos mais abundantes em plantas são: frutose, glucose, manose, galactose, entre outros; são solúveis

em água e em outros solventes polares. Todos os monossacarídeos, como por exemplo a glucose, podem reduzir agentes oxidantes e são chamados de açúcares redutores. Esta característica é empregada na análise quantitativa destes açúcares.

Os oligossacarídeos são constituídos por cadeias curtas de monossacarídeos e unidos através de ligações glucosídicas características (Lehninger et al., 1993). Os mais abundantes são os dissacarídeos, constituídos por duas unidades de monossacarídeos. A sacarose é um dissacarídeo composto por uma unidade de D-glucose e D-frutose, sendo o principal produto da fixação fotossintética do CO_2 . É um açúcar não redutor, altamente solúvel em água, sendo a forma na qual os açúcares são translocados. A sacarose é o substrato utilizado para a obtenção de energia, na síntese de material celular e em compostos de armazenamento (Avigad & Dey, 1997). Em plantas, a síntese e a hidrólise da sacarose ocorrem através de reações enzimáticas, sendo que as enzimas envolvidas nestas reações estão sob controle genético e metabólico, em diferentes níveis (Quick & Schaffer, 1996). A visão clássica da sacarose como metabólito para a síntese de matéria orgânica na planta deve ser complementada com o seu papel sinalizador para a expressão gênica, sendo que este efeito está associado com as enzimas envolvidas diretamente no seu metabolismo. (Williams et al., 1992).

Os polissacarídeos presentes nas plantas são constituídos por longas cadeias de monossacarídeos, possuindo centenas ou milhares de unidades. Dentre os vários grupos, destaca-se o dos polissacarídeos de reserva, que além do amido e dos polímeros de frutose, abrange outros polissacarídeos que são classificados como carboidratos de reserva (Lehninger et al., 1993). Estes compostos são acumulados durante o crescimento e desenvolvimento, sendo armazenados por um período de tempo e, posteriormente, degradados em seus monossacarídeos constituintes, fornecendo matéria orgânica para um novo ciclo de crescimento.

Muitas vezes é difícil a separação entre os polissacarídeos estruturais e os de reserva, já que ambos possuem estruturas moleculares semelhantes. A maioria dos polissacarídeos da parede celular é submetida a processos de despolimerização e extensiva hidrólise, associados com o crescimento do tecido e a produção de monossacarídeos através deste processo (Dey, 1978; Reid, 1985; Matheson, 1990), os quais retornam ao metabolismo celular.

A maioria das informações disponíveis sobre os polissacarídeos de reserva em orquídeas está relacionada à estrutura química e ao papel de indicador quimiotaxonômico (Lüning, 1974; Slaytor, 1977; Arditti & Fisch, 1977). Os aspectos bioquímicos investigados destes polímeros estão relacionados aos processos enzimáticos de biossíntese e de

despolimerização, sendo o grupo dos galactomananos, o mais estudado (Meier & Reid, 1982).

Os polissacarídeos de reserva da parede celular podem ser divididos basicamente em mananos, xiloglucanos e arabinogalactanos.

Os mananos são compostos por polissacarídeos que podem ser divididos em quatro sub-grupos, em função da estrutura e composição molecular. **a)** os mananos puros podem constituir cadeias lineares de 100 a 2.000 resíduos de $[\beta(1\rightarrow4)\text{-D-manopiranosil}]$, que é a estrutura básica deste sub-grupo. Os mananos puros representam o principal tipo de reserva em sementes de espécies de Palmae, Umbelliferae e Rubiaceae (Avigad & Dey, 1997). Os mananos presentes nestas sementes são despolimerizados pela ação de endo- e exo- β -mananases. A manose liberada é metabolizada, resultando em frutose e glucose, as quais são utilizadas na síntese de sacarose. **b)** os glucomananos são similares estruturalmente aos mananos, porém contêm uma proporção variável (6-50%) de β -glucosil, no lugar de alguns radicais β -manosil ao longo da cadeia. Estes polímeros estão presentes como material de reserva em muitas monocotiledôneas, especialmente em órgãos subterrâneos de reserva nas famílias Liliaceae, Amaryllidaceae e Iridaceae (Goldberg & Roland, 1971). Têm sido descritos alguns modelos de síntese e despolimerização em espécies das famílias Liliaceae e

Orchidaceae (Nonogaki *et al.*, 1995), envolvendo a ação de endo- e exo-manosidases e β -glucosidase. Os glucomananos estão presentes em bulbos de lírio, estando relacionados com o potencial de água e no processo de brotação (Matsuo & Mizuno, 1974). **c)** O sub-grupo dos galactomananos é o maior e o mais estudado entre os polissacarídeos de reserva, estando presente no endosperma de sementes de leguminosas, e nas famílias Annonaceae e Convolvulaceae (Meier & Reid, 1982). A hidrólise deste polímero é realizada pela ação de três enzimas: α -galactosidase, β -endo-mananase e β -manosidase (McCleary, 1980). Acredita-se que além do papel de reserva, os galactomananos atuam na regulação do balanço hídrico em sementes, durante a germinação (Reid & Bewley, 1980). **d)** Os galactoglucomananos são cadeias com β -glucomananos com quantidade variável de radicais $\alpha(1\rightarrow6)$ galactosil.

Os estudos dos carboidratos na família Orchidaceae têm recebido pouca atenção, principalmente aqueles relacionados ao metabolismo destes compostos na planta. A maioria dos trabalhos está voltada para a identificação e caracterização de carboidratos em órgãos de reserva subterrâneo de orquídeas terrestres européias, devido à importância comercial destes compostos como fontes de alimento (Daloul *et al.*, 1963 citados por Ernst & Rodriguez, 1984; Tomoda & Kimura, 1976). Um desses carboidratos é conhecido como "salep", sendo formado

basicamente por mucilagem e em menor quantidade por oligossacarídeos, monossacarídeos e minerais (Ernst & Rodrigues, 1984). A qualidade do "salep" depende do conteúdo de mucilagem, sendo rico em glucomananos e é fonte de manose. Outros trabalhos revelaram sua composição em várias espécies, sendo que Franz (1973) mostrou que os polissacarídeos que compõem a mucilagem contém grupos acetil, que aumentam suas propriedades hidrofílicas. Estudos sobre a composição e a estrutura da mucilagem do órgão de reserva subterrâneo de *Bletilla striata* revelaram que também havia um glucomanano em sua composição (Tomoda et al., 1973).

A partir do desenvolvimento de técnicas analíticas para os carboidratos, muitas informações foram obtidas sobre os oligossacarídeos que formam a mucilagem. Petek et al. (1963 citados por Ernst & Rodriguez, 1984), obtiveram três frações de oligossacarídeos apresentando ligação β -(1 $\rightarrow$ 4) após hidrólise ácida parcial, enquanto Juers et al. (1967) estabeleceram a configuração e propriedades hidrodinâmicas do derivado triacetil de um glucomanano da mucilagem do "salep".

As características químicas dos glucomananos presentes na mucilagem permitiram estudar sua variação, ao longo do ano, em rizomas de orquídeas terrestres, sendo possível sugerir que os glucomananos são compostos de reserva no rizoma, sendo usados durante a sua formação e no desenvolvimento de novos rizomas (Ernst & Rodriguez, 1984).

Franz & Meier (1971) acompanharam a mobilização de açúcares em rizomas de *Orchis morio*, seguindo a degradação de polissacarídeos na mucilagem no rizoma mais velho e a formação de compostos de reserva no rizoma mais novo. Os autores determinaram que os níveis de frutose, glucose e rafinose no rizoma mais velho são similares àqueles no rizoma mais novo. O aparecimento em rizomas mais velhos da manose, manobiose, manotriose e maltose livres, indicaria que estes açúcares são produtos da degradação de glucomananos e amido, respectivamente. Uma conversão similar de mananos em oligossacarídeos foi observada nas sementes em germinação (Keusch, 1968).

Quando foi injetada a ^{14}C -sacarose no rizoma mais velho, observou-se que esta apareceu parcialmente hidrolizada em glucose e frutose, sendo que pequena quantidade de rafinose também foi formada. A ^{14}C -sacarose foi rapidamente detectada no rizoma mais novo, indicando um transporte direto a partir do mais velho (Franz & Meier, 1971). Seguindo incubação prolongada, a radioatividade foi detectada na mucilagem no rizoma mais novo.

O estudo realizado por Franz (1979) mostrou que durante a mobilização e o metabolismo dos glucomananos e amido, presentes em rizomas de *Orchis morio* na fase vegetativa, a mobilização dos polissacarídeos de reserva é mediada pelas enzimas β -mananase, amilase, β -manosidase, β -glucosidase e α -

glucosidase. Destas enzimas, β -mananase é a primeira enzima ativa, coincidindo com a mobilização dos glucomananos. De acordo com Franz (1973), um sistema enzimático isolado a partir do rizoma mais novo em *O. morio* catalisa a formação de manose a partir de ^{14}C -manose-GDP e sua incorporação em mananos insolúveis em álcali, com o mesmo tipo de ligação [$\beta(1\rightarrow4)$ -D-manopiranosil] que ocorre no polissacarídeo de reserva, sintetizado naturalmente.

As informações sobre o metabolismo de carboidratos em orquídeas epífitas estão relacionadas à incorporação e fixação noturna do CO_2 atmosférico, à formação de ácido málico e à posterior síntese de açúcares durante o dia, em células fotossintetizantes (Fahrendorf et al., 1987).

Estudos conduzidos *in vitro* também mostraram a participação dos carboidratos na germinação de sementes de orquídeas epífitas e na formação de calos, compondo grande parte da massa seca acumulada (Harrison & Arditti, 1978; Arditti & Ernst, 1984; Lee et al., 1987; Hew et al., 1988).

INVERTASES ÁCIDAS

Existem duas enzimas que catalisam a quebra da molécula de sacarose, fornecendo intermediários (glucose e frutose) para as rotas metabólicas da célula e energia para sustentar o crescimento. Uma delas é a invertase. A glucose e a

frutose produzidas podem, temporariamente, acumular-se ou são fosforiladas em hexoses-fosfato por hexoquinases ou frutoquinases, dependentes de ATP (Avigad & Dey, 1997). UDP-glucose é o substrato que pode ser usado diretamente ou após modificação e ser transportado para outra organela celular para a síntese de celulose, calose, pectina, amido e muitos outros glucosídeos; também pode fornecer glucose-1-P para a respiração (Hawker, 1985).

A invertase, β -D-frutofuranosídeo frutohidrolase, EC 3.2.1.25, hidrolisa a sacarose em seus monossacarídeos constituintes e também pode remover, a uma taxa muito lenta, os resíduos β -frutossil de cadeias curtas de oligossacarídeos, tais como rafinose e cestose (Hawker, 1985). Existem duas classes de invertases, que se diferenciam pelo pH ótimo de catálise. Uma classe, com máxima atividade enzimática em torno de pH 7,0 e localizada no citoplasma, é a invertase alcalina (INV-A). A outra classe é composta por isoformas da invertase ácida com características de glicoproteína, possuindo estrutura com três cadeias de oligossacarídeos unidas por um átomo de nitrogênio. As isoformas da invertase ácida exibem máxima atividade em torno do pH 5,0, sendo inibidas por altos níveis de glucose e frutose. Apresentam-se em, pelo menos, dois compartimentos celulares, sendo que uma invertase ácida está localizada no apoplasto, onde há uma quantidade significativa da enzima junto

à parede celular e a outra, está localizada no vacúolo (Quick & Schaffer, 1996).

Altos níveis de invertase ácida são característicos em diversos tecidos vegetais, como por exemplo nos caules em crescimento, nas folhas de plântulas e em outros tipos de órgãos em desenvolvimento, pois a atividade da invertase ácida tende a diminuir em órgãos maduros. As isoenzimas de invertase estão, potencialmente, em todos os compartimentos celulares que contenham sacarose como metabólito transitório ou de armazenamento (Avigad, 1982). Uma avaliação do papel da invertase ácida em folhas (Huber, 1989), mostrou que a alta atividade da isoforma vacuolar evitou o acúmulo de sacarose no vacúolo, sendo que as hexoses produzidas foram reaproveitadas metabolicamente no citoplasma. Em contraste, outras espécies apresentaram baixo nível da invertase ácida e conseqüentemente, o acúmulo de sacarose nas folhas foi significativo.

Os estudos envolvendo atividades de invertases ácidas em orquídeas, *in vivo*, são muito poucos. De acordo com os ensaios desenvolvidos *in vitro* por Hew & Mah (1989), com fragmentos do meristema apical de *Dendrobium*, a sacarose presente no meio de cultura não foi utilizada imediatamente como fonte de carbono por tecidos diferenciados, como foi relatado para tecidos indiferenciados (Hew *et al.*, 1988). Sacarose foi primeiramente hidrolisada em glucose e frutose, antes de ser utilizada em processos metabólicos (Thorpe &

Meier, 1973; Kanabus et al., 1986). A atividade foi maior nos tecidos cultivados em meio com sacarose e aumentou com o tempo de cultivo; baixa atividade da invertase foi detectada em meio com frutose. Estes estudos mostraram que a invertase também estava presente na parede celular.

ORQUÍDEAS EPIFITAS DE MATAS TROPICAIS E SUBTROPICAIS

Embora muitas orquídeas epífitas de florestas tropicais e subtropicais exibam metabolismo tipo CAM e apresentem características xeromórficas, estas constituem uma classe especial de plantas que vivem sob déficit hídrico, podendo apresentar comportamento diferenciado das plantas com metabolismo tipo CAM encontradas em outros ambientes. Em adição, a literatura mostra que apesar do interesse de cientistas, cultivadores, entusiastas e colecionadores do mundo inteiro, as orquídeas epífitas brasileiras são pouco conhecidas em seus aspectos metabólicos e bioquímicos, existindo vários fatores que interferem na realização desses estudos (Sternberg, 1986; Medina et al. 1986; Lüttge, 1989; Benzing, 1990).

A orquídea escolhida como material vegetal nesta tese foi originada de um cruzamento artificial entre espécies dos gêneros *Cattleya* e *Laelia*, representativos na flora da Mata Atlântica Brasileira, sendo cultivada sob diversos regimes hídricos e sob vários níveis de luminosidade. Entre outras

características, estas orquídeas apresentam pseudobulbo, o qual ocorre somente nas orquídeas epífitas simpodiais (**FIGURA 3**) e pode proporcionar algumas vantagens ecológicas.

O gênero *Cattleya* possui em torno de sessenta espécies, sendo a maioria amplamente cultivada. Este gênero ocorre nas três Américas, em regiões com clima tipicamente tropical. Basicamente está dividido em dois grupos, o das *Cattleyas* unifoliadas e o das *Cattleyas* bifoliadas (Withner, 1988). As espécies de *Cattleya* são plantas epífitas originárias de diferentes habitats, numa área de distribuição muito grande.

O gênero *Laelia* é constituído por mais de cinquenta espécies, englobando plantas nativas do México e de países limítrofes na América Central. Na América do Sul ocorre exclusivamente no Brasil, nas regiões Sul e Sudeste, sendo as espécies subdivididas em 4 seções: *Cattleyoides*, *Parviflorae*, *Microlaelia* e *Hadrolaelia* (Miranda, 1989). O gênero *Laelia* também é composto, na maioria, por orquídeas epífitas.

Muitas orquídeas brasileiras que são cultivadas por possuírem flores de elevado valor econômico ou por serem utilizadas em programas de cruzamentos artificiais, encontram-se em vias de extinção, de acordo com uma relação emitida periodicamente pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente, IBAMA. Entre essas orquídeas encontram-se *Cattleya forbesii* Lindl. e *Laelia tenebrosa* Rolfe, ambas com elevado valor horticultural.

C. forbesii é uma orquídea epífita nativa da segunda província, com distribuição nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina (Withner, 1988). Na área de distribuição desta espécie é possível a ocorrência de períodos superiores a 25 e 45 dias sem precipitação pluviométrica. Cresce sobre árvores, rochas ou arbustos sob árvores próximas ao mar, em florestas de planície e encosta, nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro, especialmente em ambientes quentes e úmidos, com presença da brisa marinha. Nos estados do Paraná e Santa Catarina a espécie cresce em regiões de manguezal ou restinga arbórea, também próximas ao mar, onde predominam elevada umidade relativa e alto índice pluviométrico, praticamente o ano todo (Braem, 1984). É uma orquídea de porte médio, apresentando pseudobulbo sub-clavado com altura entre 30 e 40cm e duas folhas elípticas e coriáceas articuladas com o ápice do pseudobulbo. Esta espécie exibe floração semestral, apresentando flores exuberantes em rácemo com duas a cinco flores (Withner, 1988). Algumas cultivares naturais são usadas para a produção comercial, com destaque para *C. forbesii* cv. Shanghai Jade, e *C. forbesii* cv. Green Tea. Esta espécie também é utilizada como parental, na produção de híbridos (Braem, 1984).

L. tenebrosa é uma orquídea epífita nativa da primeira província, com distribuição no Espírito Santo e sul da Bahia. Na área de distribuição desta espécie também é possível

a ocorrência de períodos superiores a 25 dias sem precipitação pluviométrica, sendo que períodos superiores a 45 dias são efetivamente raros. Esta espécie é nativa da floresta tropical úmida, porém seu hábitat é de difícil descrição, estando completamente descaracterizado e praticamente extinto (Withner, 1990). Ocorre sobre árvores e em fendas de lajes rochosas (Pabst & Dungs, 1975; Rentoul, 1987; Withner, 1990). A planta apresenta grande porte, com pseudobulbos clavados de até 50cm de altura e uma folha lanceolada e coriácea, articulada com o ápice do pseudobulbo. Apresenta floração no período de novembro a janeiro, com flores grandes e vistosas, em ráceros com três a cinco flores (Rentoul, 1987; Withner, 1990). As cultivares Rayon D'Or', Maria Fumaça e Fujita foram selecionadas por melhoristas e são amplamente cultivadas.

Apesar do híbrido *C. forbesii* X *L. tenebrosa* não ocorrer na natureza, em função das áreas de distribuição e das épocas de florescimento serem distintas, é normal na família Orchidaceae indivíduos F₁ aparecerem com relativa freqüência e apresentarem características bastantes semelhantes em relação aos parentais.

Os híbridos obtidos de cruzamentos entre as espécies *C. forbesii* e *L. tenebrosa* são utilizados no plantio comercial, como o híbrido *C. forbesii* X *L. tenebrosa*, que apresenta floração semestral. Estes híbridos são geralmente cultivados sob sombrite 50% e sob regime hídrico com duas regas semanais.

A disponibilidade de um lote com aproximadamente trezentos espécimes deste híbrido, pertencentes à Seção de Orquidário, IBt e que pode ser utilizado na realização deste estudo, possibilitou identificar e quantificar os carboidratos de reserva desta orquídea epífita e inferir sobre o seu metabolismo na folha e no pseudobulbo. As informações obtidas do crescimento, das trocas gasosas, da eficiência fotossintética, do metabolismo dos carboidratos, da atividade de enzimas e outras, foram utilizadas como parâmetros de comparação, para caracterizar o metabolismo dos carboidratos armazenados no pseudobulbo como indicador dos efeitos provocados pelos níveis de luminosidade ou períodos de déficit hídrico impostos experimentalmente às orquídeas epífitas.

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi de investigar as respostas fisiológicas e metabólicas desta orquídea epífita brasileira, quando submetida a diferentes graus de intensidade luminosa e a vários períodos de déficit hídrico.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

Todos os ensaios foram conduzidos com plantas do híbrido (F_1) de *Cattleya forbesii* Lindl. X *Laelia tenebrosa* Rolfe (Orchidaceae). Este híbrido simpodial foi produzido a partir de polinização artificial e sementeira assimbiótica *in vitro* (Knudson, 1946). As plantas apresentam porte médio e pseudobulbo do tipo clavado com 15-25cm de comprimento; as folhas são coriáceas, oblongas, com 10-25cm de comprimento, existindo uma ou duas folhas articuladas com o ápice do pseudobulbo. As plantas produzem o primeiro pseudobulbo entre agosto e setembro com florescimento em outubro-novembro, e o segundo pseudobulbo de novembro a dezembro, com florescimento em fevereiro ou março. A inflorescência é do tipo rácemo, produzindo de três a cinco flores de grande valor ornamental e semelhança parental com *L. tenebrosa* (**FIGURA 1, pg. 2**).

Aproximadamente cem espécimes deste híbrido foram obtidos da Seção de Orquidário, do Instituto de Botânica (IBt),

SP e transferidos para uma casa de vegetação do Departamento de Fisiologia Vegetal (DFV) do Instituto de Biologia (IB) da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, em Campinas, SP, (LAT. 22°53' (S) e LONG. 47°05' (W)).

FASE EXPERIMENTAL

A fase experimental está descrita separadamente, uma vez que os ensaios envolvendo plantas sob diferentes intensidades luminosas foram conduzidos independentemente dos ensaios com plantas submetidas a períodos de déficit hídrico. Este procedimento procurou evitar possíveis interações e efeitos sinérgicos dos fatores ambientais com o metabolismo de carboidratos desta orquídea, simultaneamente. Os estudos foram conduzidos desta maneira para permitir a avaliação do efeito isolado da luz e da água sobre o comportamento em cultivo desta orquídea epífita, sendo que as plantas foram avaliadas e analisadas nos seus constituintes físicos, bioquímicos e metabólicos.

EXPERIMENTOS COM PLANTAS SOB DIFERENTES INTENSIDADES LUMINOSAS

As plantas utilizadas apresentavam entre sete e oito pseudobulbos, correspondendo a quatro anos de idade e estavam sendo cultivadas em vasos de barro, tendo xaxim picado como substrato. Foi mantida uma planta por vaso, cujo cultivo e monitoramento permitiam identificar cada unidade do simpódio (folha mais o pseudobulbo) e a sua posição em relação ao pseudobulbo mais novo (broto). Desta forma, o pseudobulbo imediatamente anterior ao broto em formação foi denominado pseudobulbo 1 (PS1) e a respectiva folha articulada com o ápice do PS1 foi chamada de folha 1 (FL1), e assim sucessivamente até o pseudobulbo e a folha mais velhos (**FIGURA 4**).

Uma estrutura metálica em forma de latada, montada sobre a bancada de cimento no interior da casa de vegetação, permitiu que as plantas permanecessem suspensas, presas por fios de arame.

O monitoramento da radiação solar incidente, realizado com o auxílio de um radiômetro, mostrou que do total da radiação fotossinteticamente ativa (**RFA**), 90% estava incidindo dentro dessa casa de vegetação, com as paredes e o teto em vidro.

Em média, a irrigação das plantas foi feita em dias alternados nos meses mais quentes (de agosto a março), e a cada dois ou três dias nos meses mais frios (de abril a julho), uma

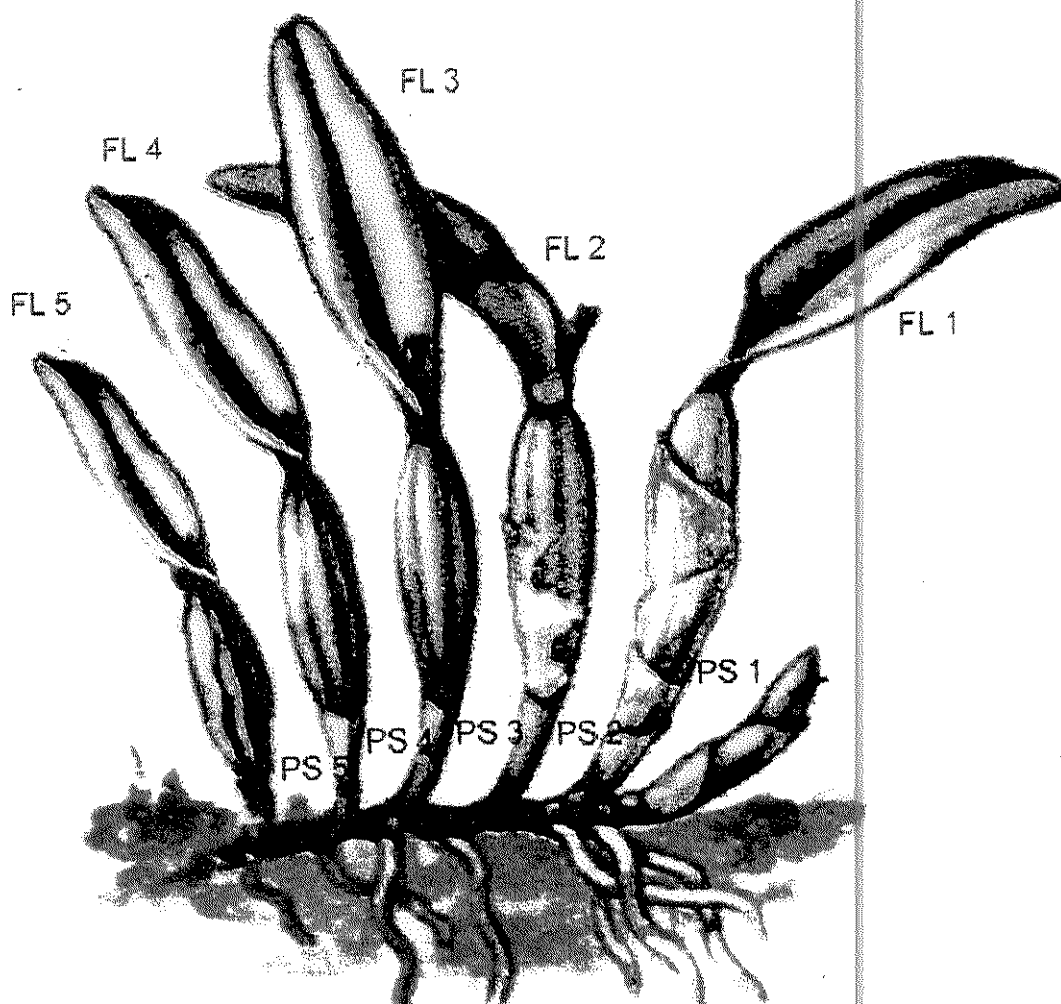


FIGURA 4. Esquema de uma orquídea simpodial com a numeração sequencial das folhas e dos respectivos pseudobulbos, a partir do broto. (FONTE: modificado de Suttleworth, 1970)

vez que em ensaios preliminares as plantas apresentavam-se visivelmente hidratadas quando irrigadas dentro dessas frequências.

Mensalmente, cada planta recebeu 200ml da solução normal de Hoagland & Arnon (1950) logo após a rega. Como as plantas se encontravam suspensas, o excesso de solução nutritiva foi drenado.

Durante o experimento, a temperatura e umidade relativa eram monitoradas nas vinte e quatro horas do dia, com o emprego de um termohigrógrafo.

Para a realização dos experimentos que estudaram o comportamento desta orquídea quando cultivada sob diferentes intensidades luminosas, o lote original de cem plantas foi dividido em dois grupos iguais de cinquenta plantas os quais foram dispostos lado a lado em bancadas, sendo que um dos grupos recebeu uma cobertura em sombrite 75%, permanecendo sob 22,5% da radiação fotossinteticamente ativa (RFA) e o outro grupo não recebeu cobertura, sendo as plantas cultivadas sob 90% da RFA.

Como já mencionado anteriormente, estes níveis de luminosidade utilizados foram escolhidos na pretensão de induzir condições extremas no metabolismo dos carboidratos de reserva, na folha e no pseudobulbo.

CRESCIMENTO DE PLANTAS SOB 90% E 22,5% DA RFA

Para avaliar o efeito da intensidade luminosa no crescimento das folhas FL1, FL2, FL3 e FL4 (**FIGURA 4**), e na variação de volume dos respectivos pseudobulbos (PS1, PS2, PS3 e PS4), cinco plantas ao acaso foram identificadas em cada grupo (90 e 22,5% da RFA), já que os resultados da análise estatística mostraram que cinco plantas representam um número confiável de repetições. As plantas selecionadas vinham sendo cultivadas a pelo menos um ano sob estas intensidades luminosas. Este experimento teve a duração de 173 dias, ao longo dos quais nove baterias de medições foram realizadas.

Para a determinação do volume (mm^3) dos pseudobulbos em cada amostragem, foram medidos os diâmetros ortogonais na sua porção superior, mediana e inferior, com o auxílio de um paquímetro, e a altura do pseudobulbo. Estas medições permitiram estabelecer o volume do pseudobulbo correlacionando-o com o volume de uma composição de figuras geométricas. A figura geométrica escolhida foi o tronco de cone, sendo que o volume do pseudobulbo é a soma de dois troncos de cone justapostos pela base. O volume para o tronco de cone é dado pela fórmula:

$$V = \pi \cdot h/12 \cdot (D^2 + D.d + d^2) \quad (1)$$

onde,

h= altura

D= diâmetro inferior

d= diâmetro superior

Para a determinação da área (cm²) de cada folha, vinte folhas colhidas ao acaso foram analisadas num aparelho integrador de área (LI-COR, LI-3000, Lambda Instrum. Corp.), obtendo-se assim, a área real de cada folha. A partir das medidas de comprimento e largura, obtidas nas mesmas folhas, foi determinada a área da figura geométrica que inscreve a folha. Através da regressão linear obtida com as medidas de área real e as medidas da área da figura geométrica que inscreve a folha, foi obtido o fator de correção (0.798). Assim, durante as amostragens foram registradas as medidas de comprimento da lâmina foliar, a partir do ponto de articulação com o pseudobulbo, e da largura máxima da folha. Dessa forma, a área real de cada folha é o produto destas medidas de comprimento e largura multiplicado pelo fator 0.798, e a área foliar de cada planta é a somatória da área real de todas as folhas dessa planta.

O delineamento experimental foi constituído por dois tratamentos, nove amostragens com cinco repetições, e a análise estatística utilizou o teste F e o teste de Tukey, a 5%. Uma planta em cada vaso foi considerada uma repetição.

METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E DO ÁCIDO MÁLICO, NA FOLHA E NO PSEUSOBULBO, AO LONGO DO DIA

Doze plantas da orquídea em estudo, cultivadas a aproximadamente um ano sob 90% da RFA, foram selecionadas para a execução deste experimento. Destas plantas foram excisados os pseudobulbos mais velhos bem como as respectivas folhas, permanecendo um broto na fase inicial de crescimento, e os pseudobulbos PS1, PS2 e PS3 com as respectivas FL1, FL2 e FL3. Visando proporcionar intensa fixação do CO_2 e intensa formação do ácido málico, essas plantas foram mantidas, inicialmente, por quinze horas no escuro; em seguida, retornaram para as condições de fotoperíodo natural, sob 90% da RFA, e foram mantidas nestas condições por 8 horas (das 9:00 às 17:00h). As amostras da FL2 e do PS2 foram retiradas em quatro amostragens, às 0, 2, 5 e 8h de exposição ao fotoperíodo natural, sendo utilizadas três plantas em cada amostragem. As amostras da FL2 e PS2 de duas plantas foram retiradas com um furador de rolhas, picadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e em seguida liofilizadas, sendo posteriormente utilizadas nas determinações quali-quantitativas de carboidratos e dos níveis de ácido málico. As amostras da terceira planta foram congeladas em nitrogênio líquido e imediatamente encaminhadas ao laboratório do DFV, onde foram processadas e testadas quanto

à atividade específica da enzima invertase ácida (EC 3.2.1.25), na FL2 e no PS2.

AÇÚCARES SOLÚVEIS NÃO ESTRUTURAIS E ÁCIDOS ORGÂNICOS: EXTRAÇÃO

Para a análise quali-quantitativa de carboidratos e para a determinação dos níveis de ácido málico, foram utilizadas as amostras liofilizadas da FL2 e do PS2. Uma alíquota com 500mg de cada amostra foi diluída em 15ml de etanol 80% e mantida em banho-maria a 75°C por trinta minutos, sob agitação. Em seguida foi centrifugada a 2.500g. Este procedimento foi repetido três vezes e o sobrenadante foi coletado para a análise de açúcares.

O precipitado foi armazenado a -18°C para posterior análise dos carboidratos solúveis em água.

As frações contendo os sobrenadantes combinados foram concentradas em evaporador rotatório e tiveram seus volumes completados com água destilada. Em seguida foi adicionado clorofórmio na proporção de 2:1 (v/v), deixando a mistura sob agitação pelo período de uma noite. A fase aquosa, composta pelos açúcares solúveis não estruturais e pelos ácidos orgânicos, foi coletada com o auxílio de um funil de separação, sendo desprezada a outra fase.

Em seguida estes extratos aquosos foram eluídos sucessivamente em colunas (1ml) de troca iônica, constituídas

pela resina catiônica "Dowex" 50 (H^+) e pela resina aniônica "Dowex" 1 (acetato), visando a separação e deionização da fração com os açúcares solúveis não estruturais da fração com os ácidos orgânicos.

Após extração, concentração e parcial purificação, os extratos aquosos obtidos das amostras de FL2 e PS2, em todas as amostragens, foram eluídos nas colunas de "Dowex" 50. O eluente coletado junto com três volumes de água de lavagem da coluna, continha as frações de açúcares solúveis não estruturais e de ácidos orgânicos.

Em seguida, foram eluídos em colunas "Dowex" 1. O eluente desta coluna, coletado com três volumes de água destilada, continha a fração purificada de açúcares solúveis não estruturais. A eluição dos ácidos orgânicos retidos na coluna foi feita com três volumes da solução de ácido fórmico 16N.

A fração purificada com os açúcares solúveis não estruturais foi congelada e liofilizada, tornando-se mais concentrada. Esta fração purificada foi utilizada nas determinações quantitativas dos açúcares solúveis não estruturais e nas determinações qualitativas dos mono e oligossacarídeos.

A fração contendo os ácidos orgânicos foi concentrada em evaporador rotatório (40-45°C), colocando-se NaOH no balão

coletor, até volume entre 10-20ml. Em seguida, o pH das amostras foi corrigido para pH 4,5 - 5,0, com NaOH.

Neste ponto, as amostras com os ácidos orgânicos estavam purificadas e prontas para a análise qualitativa.

AÇÚCARES SOLÚVEIS NÃO ESTRUTURAIS: ANÁLISE QUANTITATIVA DOS AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS, DA SACAROSE E DOS AÇÚCARES REDUTORES

As dosagens de açúcares solúveis totais (AST) nas amostras, foram feitas com o reagente fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). Todas as análises foram feitas em triplicata, a solução-padrão utilizada foi de sacarose e os resultados foram expressos como a média dos valores obtidos, em *equivalente-mg* de sacarose por grama de massa seca.

O teor de sacarose das amostras foi determinado seguindo-se o método proposto por Van Handel (1968). Em 0,1ml do extrato da amostra foram adicionados 0,1ml da solução aquosa de KOH 30%; em seguida, essa mistura foi aquecida em banho-maria a 100°C por dez minutos. Após seu resfriamento, foram adicionados 3,0ml de antrona, sendo novamente aquecida em banho-maria a 40°C por quinze minutos. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro óptico, com leitura em 620nm.

Todas as análises foram feitas em triplicata, tendo a sacarose como padrão.

A quantidade de açúcares redutores (AR) nas amostras foi determinada de acordo com Somogyi (1952). Todas as análises foram feitas em triplicata, a solução-padrão utilizada foi de glucose.

**AÇÚCARES SOLÚVEIS NÃO ESTRUTURAIS: ANÁLISE QUALITATIVA
(cromatografia descendente em papel)**

Para esta análise foram utilizadas as frações contendo os açúcares solúveis não estruturais. Foram montados dois cromatogramas em papel Whatman nº 1 e alíquotas contendo 50µg de *equivalentes* de sacarose foram aplicadas. Também foram utilizados os seguintes padrões de açúcares: galactose, glucose, manose, rafinose, sacarose e xilose. Em 100ml do sistema de solvente de corrida utilizado continham 60ml de acetato de etila, 15ml de ácido acético, 15ml de piridina e 10ml de água (Jarvis & Duncan, 1974). A corrida foi realizada em cuba de vidro, com duração aproximada de quarenta horas, em temperatura ambiente. Após serem retirados da cuba, os cromatogramas permaneceram em secagem, por uma noite, em capela. Os cromatogramas foram revelados de acordo com o método de Trevelyan *et al.* (1950), a partir de banho em solução

acetônica de nitrato de prata (2mg de AgNO_3 saturado em 200ml de acetona) seguido de secagem em capela e banho em solução etanólica de hidróxido de sódio (5ml de NaOH 10N em 100ml de etanol). Na última etapa, banho em solução aquosa de tiossulfato de sódio 5% e lavagem dos cromatogramas com água, seguidos de período de secagem em local seco e escuro.

**AÇÚCARES SOLÚVEIS NÃO ESTRUTURAIS: ANÁLISE QUALITATIVA
(cromatografia líquida de alto desempenho, HPLC)**

As frações concentradas e purificadas contendo os açúcares solúveis não estruturais também foram analisadas por cromatografia líquida de alto desempenho. Aliquotas deionizadas com $10\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de açúcares solúveis totais foram submetidas à filtração, através de filtros específicos para HPLC com malha de $0,22\mu\text{m}$, "Acrodisc". Aliquotas de $25\mu\text{l}$ foram analisadas através de uma coluna de troca iônica "CarboPac" PA-1 (4X250mm), em um sistema de cromatografia por gradiente, acoplado à detecção de pulsos amperométricos (HPAEC/PAD). Utilizou-se um equipamento "Dionex" DX-500 para análise dos açúcares solúveis não estruturais. Os monossacarídeos foram analisados por eluição isocrática em NaOH 23mM e os oligossacarídeos através de eluição isocrática em NaOH 150mM, ambos com fluxo de 0,8ml/minuto. Os potenciais aplicados ao PAD

para E1 (480ms), E2 (120ms) e E3 (60ms), foram respectivamente iguais a 0,1, 0,6 e -0,6V, sendo a faixa de seletividade da detecção baseada em 1.000nA.

ÁCIDOS ORGÂNICOS: ANÁLISE QUALITATIVA (cromatografia em camada delgada, TLC)

Foi realizada uma análise preliminar em TLC, da fração purificada dos ácidos orgânicos solúveis em água, visando a identificação destas substâncias nas amostras.

Assim sendo, duas placas de sílica gel H, aplicada em vidro, foram previamente aquecidas a 105°C por trinta minutos, para ativação da sílica. Em seguida, alíquotas correspondendo a 2mg de massa seca da FL2 e PS2 foram aplicadas. Também foram aplicadas amostras com 20µg de cada um dos seguintes ácidos orgânicos (padrões): ácido málico, ácido cítrico e ácido isocítrico. O sistema de solventes de corrida utilizado era composto por 140ml de éter etílico, 20ml de ácido fórmico 88% e 160ml de água. Após agitação, a água foi retirada com o auxílio de um funil de separação. A corrida aconteceu com desenvolvimento duplo e à temperatura ambiente. Após as corridas as cromatoplasmas permaneceram por alguns minutos à temperatura ambiente e, em seguida, foram aquecidas a 80°C por vinte minutos para a evaporação total do ácido fórmico. O

método de revelação das cromatoplasas seguiu o proposto por Knauff & Arditti (1969), através de nebulização de uma solução com azul de bromofenol 0,3% e vermelho de metila 0,1% em etanol 95%.

Através da visualização das manchas (cor e forma) e do R_f para cada padrão utilizado (Ting & Dugger, 1965) foi possível identificar o principal ácido orgânico das amostras de FL2 e PS2 deste experimento.

ÁCIDOS ORGÂNICOS: ANÁLISE QUALITATIVA (cromatografia líquida de alto desempenho, HPLC)

As frações concentradas e purificadas contendo os ácidos orgânicos também foram analisadas por HPLC. Aliquotas com 5 μ l desta fração, previamente filtradas em membrana Millipore de 0,22 μ m, foram analisadas num sistema Shimadzu, composto por uma bomba LC-10AS, uma coluna com fase reversa C18 ODS2 (5 μ m, 4X250mm), acopladas a um detector em ultravioleta (UV-VIS) SPD-10A, em 210nm e a um integrador C-R6A "Chromatopac" (Lee & Foy, 1986). Aliquotas de 5 μ l do padrão de ácido málico 15mM também foram analisadas em HPLC, mostrando perfil semelhante de leitura, com pico duplo em 4,47 e 5,0 minutos. Através da massa seca, volume injetado e área registrada no "Chromatopac" das amostras e da área,

concentração e peso molecular do ácido málico (PM= 134,09), as quantidades de ácido málico encontradas nas amostras foram expressas em $\mu\text{mol/gMS}$.

Os dados dos teores de ácidos orgânicos nos extratos de FL2 e PS2, obtidos para os diferentes pontos de amostragem, foram submetidos ao cálculo do erro padrão da média.

CARBOIDRATOS SOLÚVEIS EM ÁGUA: EXTRAÇÃO

No precipitado mantido a -18°C estava a fração dos carboidratos solúveis em água, que também foi analisada neste trabalho.

Antes da extração foram realizados testes preliminares com o material biológico em estudo para indicar o número e o tempo de extração adequados. Os testes mostraram que três era o número adequado de extrações, sendo de uma hora o tempo de extração para PS2 e de meia hora para FL2.

Para a análise quali-quantitativa dos carboidratos solúveis em água, os precipitados mantidos a -18°C foram liofilizados e deles retiradas alíquotas de 100mg das amostras, que foram diluídas em 1ml de água deionizada e mantidas em banho-maria a 60°C por uma hora para o PS2 e por meia-hora para a FL2, sob agitação. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000g por dez minutos e separados os sobrenadantes (SP₁). Os precipitados foram solubilizados em 1ml

de água, novamente macerados e mantidos em banho-maria sob as mesmas condições. A aliquota foi centrifugada a 10.000g e o sobrenadante (SP₂) foi adicionado ao primeiro. Novamente o precipitado foi ressuspenso em 1ml de água, mantido em banho-maria nas mesmas condições e centrifugado a 10.000g. Este sobrenadante (SP₃) foi adicionado aos sobrenadantes combinados.

A esta fração foram adicionados três volumes de etanol PA, sendo a mistura mantida a -18°C por uma noite. Após esse período as amostras foram centrifugadas a 10.000g por dez minutos sendo descartados os sobrenadantes.

O precipitado foi solubilizado em água deionizada, sendo mantido a 80°C por uma hora. As determinações qualitativas dos carboidratos solúveis em água foram obtidas a partir desta fração solubilizada em água.

CARBOIDRATOS SOLÚVEIS EM ÁGUA: ANÁLISE QUANTITATIVA

Para a determinação da quantidade de açúcares solúveis totais nas amostras, as dosagens foram feitas pelo método fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956). Todas as análises foram feitas em triplicata, a solução-padrão utilizada foi a de sacarose e os resultados foram expressos como a média dos valores obtidos, em *equivalente-mg* de sacarose por grama de massa seca.

Os dados dos teores de açúcares solúveis totais, obtidos para os diferentes pontos de amostragem, foram submetidos ao cálculo do erro padrão da média.

CARBOIDRATOS SOLÚVEIS EM ÁGUA: HIDRÓLISE ÁCIDA E ANÁLISE QUALITATIVA DOS MONOSSACARÍDEOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTO DESEMPENHO, HPLC

A fração solubilizada em água foi liofilizada, sendo que desta foram pesadas, em tubo cônico, 5mg para a hidrólise ácida. Em seguida foram adicionados 0,1ml de H_2SO_4 72% e incubados a 30°C por quarenta e cinco minutos, com agitação ocasional. Após a incubação foram adicionados 1,7ml de água, diluindo a solução de H_2SO_4 para 4%. O tubo cônico com a amostra foi levado à autoclave a 120°C por uma hora. A seguir a amostra foi neutralizada e foram adicionados 3ml de água, sendo a amostra centrifugada a 10.000g por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e eluido em resina aniônica "Dowex" 1, com quatro volumes de água.

A análise dos monossacarídeos em HPLC seguiu o procedimento adotado para a análise dos açúcares solúveis não estruturais, com exceção da utilização de um equipamento "Dionex" DX-500 para os monossacarídeos e a separação destes por eluição isocrática das amostras em NaOH 23mM.

INVERTASE ÁCIDA: CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Na fase anterior aos ensaios de determinação da atividade específica da invertase ácida para FL2 e PS2, *in vitro*, foram analisadas as condições experimentais para o desenvolvimento da atividade da enzima.

Foram realizados quatro ensaios consecutivos, cada qual visando estabelecer um parâmetro experimental. O primeiro ensaio determinou a faixa de pH em que a enzima apresentou maior atividade específica, ou seja, pH=3,5 para o pseudobulbo e pH=4,5 para a folha (**FIGURA 5A**). O segundo ensaio relacionou a atividade da enzima com a quantidade de proteína presente no extrato. Os dados experimentais indicaram bons níveis de atividade com 50µg de proteínas solúveis totais no extrato (**FIGURA 5B**). No terceiro ensaio foram analisadas várias concentrações de sacarose (substrato) para a incubação da enzima. Considerando-se os níveis de atividade da invertase na folha e no pseudobulbo, foi mantida a concentração de 60mM para todos os ensaios (**FIGURA 5C**). O ensaio que determinou a temperatura adequada para incubação da invertase ácida mostrou que a enzima apresenta pico de atividade ao redor de 35-37°C (**FIGURA 5D**).

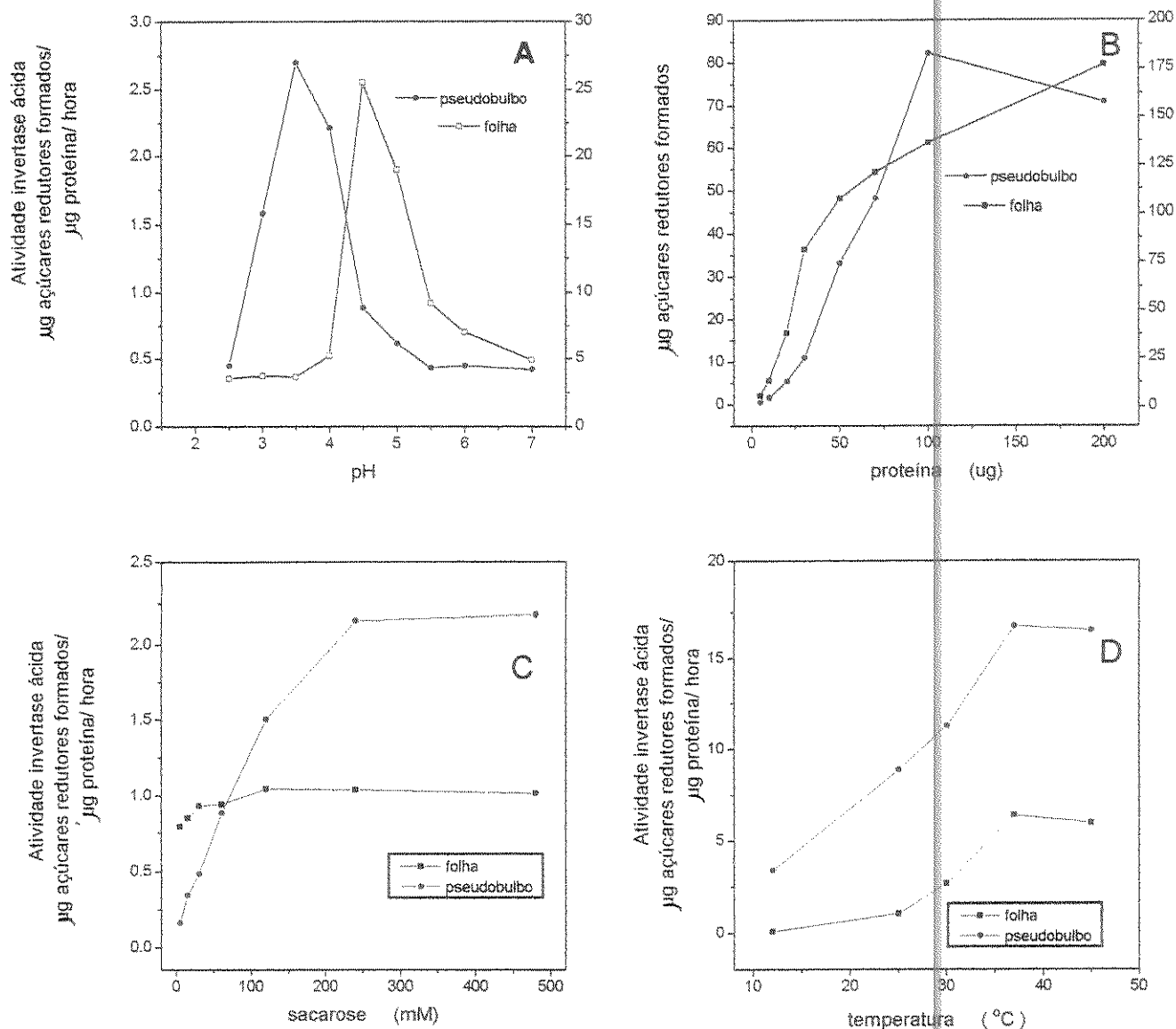


FIGURA 5. Atividade enzimática da invertase ácida, *in vitro*, no pseudobulbo e na folha do híbrido *C. forbesii* X *L. tenebrosa*, em função do pH (**A**), da concentração de açúcares redutores formados por quantidade de proteína (**B**), da concentração de substrato (**C**) e em função da temperatura (**D**).

INVERTASE ÁCIDA: EXTRAÇÃO E ATIVIDADE ESPECÍFICA *IN VITRO*

Para a determinação *in vitro*, da atividade específica da invertase ácida, as condições de extração e incubação foram aquelas indicadas por Oliveira (1985), com algumas modificações. Durante a extração todas as operações foram realizadas a 4°C, estando os equipamentos e soluções utilizados previamente resfriados. Amostras de tecido picado de FL2 ou PS2 com 1,0g foram previamente congeladas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em almofariz com 5,0ml do tampão fosfato-potássio (KP) 50mM pH=7,5, contendo 2mM de β -mercaptoetanol e 20% (p/p) de polivinilpolipirrolidona (PVPP). O homogenato permaneceu em repouso por quinze minutos, com agitação ocasional, sendo em seguida centrifugado a 12.000g por trinta minutos a 4°C. A atividade da invertase ácida foi avaliada no sobrenadante desta fração, sendo também retirada uma alíquota para a dosagem de proteínas solúveis totais, de acordo com Bradford (1976).

Para a determinação da atividade enzimática foram empregados 50 μ g de proteínas do extrato, sendo o volume do tampão de incubação (citrato-fosfato), três vezes maior que o volume do extrato contendo 50 μ g de proteínas.

O ensaio de atividade da enzima consistiu em incubar 50 μ g de proteínas do extrato em três volumes de tampão citrato-

fosfato 50mM (pH=3,5 para o PS2 e pH=4,5 para a FL2) e sacarose 60mM (concentração final), em banho-maria a 37°C, por uma hora. A reação enzimática foi interrompida pela adição do reagente de Somogyi (1952). A alíquota coletada imediatamente antes da incubação serviu como branco em espectrofotômetro óptico a 560nm e a leitura obtida com a segunda alíquota correspondia à quantidade de açúcares redutores formados durante a incubação, expressa em equivalente-mg de glucose, de acordo com Somogyi (1952).

A atividade específica da invertase ácida foi expressa pela razão entre a quantidade de açúcares redutores formados e a quantidade de proteínas solúveis totais, na mesma alíquota, em uma hora.

DESEMPENHO FOTOSSINTÉTICO E TROCAS GASOSAS EM PLANTAS SOB 90% E 22,5% DA RFA

Este experimento foi realizado com o objetivo de obter informações sobre a incorporação do CO_2 atmosférico e sobre o balanço hídrico na planta, através de medidas de fluorescência e de trocas gasosas, em plantas sob 90 e 22,5% da RFA, ao longo de 24 horas.

Neste experimento foram utilizadas seis plantas, sendo que quatro estavam sob 22,5% da RFA e duas, sob 90% da RFA. Testes preliminares mostraram que não ocorreu variação significativa quando foi utilizado um maior número de repetições. Todas as plantas já estavam sendo cultivadas sob estas intensidades luminosas há pelo menos um ano. Os cinco pseudobulbos mais novos foram mantidos com as respectivas folhas articuladas no ápice, sendo as folhas FL1 e FL3 escolhidas para as medições.

Foram realizadas sete baterias de medições ou amostragens, ao longo de uma noite e um dia, nos seguintes horários:

MEDIÇÕES	TEMPO DE PERMANÊNCIA NO ESCURO OU NA LUZ (horas)
1ª amostragem	1h escuro
2ª amostragem	6h escuro
3ª amostragem	0h luz (14h escuro)
4ª amostragem	1h luz
5ª amostragem	2h luz
6ª amostragem	5h luz
7ª amostragem	8h luz

As medidas de fluorescência foram obtidas com um analisador da eficiência fotossintética de plantas (fluorômetro), marca Hansatech, modelo PEA, e as medidas de trocas gasosas foram realizadas com um porômetro de equilíbrio dinâmico marca LI-COR Inc., modelo LI-1600. As medidas foram não destrutivas, sendo primeiro realizadas as medições com o fluorômetro e em seguida com o porômetro, nas mesmas folhas. As medições com o porômetro foram realizadas em todas as amostragens e as medições com o fluorômetro foram realizadas na 4ª, 5ª, 6ª e 7ª amostragens.

Na 5ª amostragem, imediatamente após as medições, duas plantas que estavam sob 22,5% da RFA foram transferidas para as condições de 90% da RFA. A partir daí, estas plantas

foram monitoradas nesta intensidade luminosa até o final do experimento.

PORÔMETRO DE EQUILÍBRIO DINÂMICO, LI-1600

O funcionamento do porômetro é descrito a seguir. Uma parte da planta é presa na abertura sobre a câmara interna (cubeta), que possui sensores de temperatura, um termopar, um termistor e um sensor HUMICAP Vaisala para medir a umidade relativa (UR%). Um microprocessador interno mede continuamente as temperaturas da folha, do ar e a umidade relativa. As mudanças nesses parâmetros são usadas para computar a taxa de fluxo do ar seco necessária para manter constante a umidade relativa na cubeta. O usuário é que estabelece a umidade relativa de equilíbrio.

Com base no monitoramento contínuo das temperaturas, da umidade relativa e do fluxo de ar seco, o aparelho fornece o valor da resistência estomatal ao fluxo de difusão do vapor de água, resistência difusiva (R_s) em cm.s^{-1} e da taxa de transpiração, em $\mu\text{g.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$, além da umidade relativa, em %, temperatura da folha ($^{\circ}\text{C}$) e a radiação fotossinteticamente ativa (RFA), em $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Um exame anatômico realizado em microscópio de projeção (Carl Zeiss Jena) a partir de moldes negativos,

obtidos com esmalte incolor e modificado a partir de Hilu & Randall (1984), mostrou que as folhas deste híbrido são hipostomáticas. A contagem do número de estômatos em vinte campos ao acaso mostrou valores de densidade estomática de $78,3 \pm 9,5$ estômatos/mm² na região apical, $80,6 \pm 7,7$ estômatos/mm² na região mediana e $71,3 \pm 10,4$ estômatos/mm² na região basal das folhas. De acordo com o teste F, estas médias não diferem estatisticamente entre si.

ANALISADOR DA EFICIÊNCIA FOTOSSINTÉTICA DE PLANTAS (fluorômetro)

O modelo utilizado é portátil e adequado aos procedimentos que requerem amostragens periódicas e repetitivas. As medidas de indução à fluorescência são não-destrutivas e não invasivas, sendo realizadas em folhas intactas, previamente adaptadas ao escuro.

O sistema é composto por: 1) grampo de plástico branco para a folha, com área foliar de exposição e obturador para manter a área de exposição aberta ou fechada; também existe no grampo um anel de exposição, apropriado para conectar a unidade do sensor; 2) sensor, o qual é acoplado sobre o grampo de modo que a luz natural seja excluída, sendo mantido com a mão sobre o grampo, durante a medição. O sensor possui um

conjunto óptico que proporciona uma intensa iluminação da folha e detecta o conseqüente sinal de fluorescência. A iluminação é feita por um conjunto de seis diodos que emitem luz de alta intensidade (LEDs), na faixa de 580 a 700nm com pico em 650nm, atingindo plena intensidade ($3.000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) em microsegundos. Um circuito óptico monitora e corrige as mudanças na intensidade de saída dos LEDs, causadas por alterações de temperatura. O detector é um fotodiodo PIN de alto desempenho associado a um circuito amplificador; 3) unidade de controle com um microprocessador de comando de todas as funções, sendo que o sinal de fluorescência recebido pelo sensor durante uma medição é digitalizado por um conversor analógico-digital. Os principais parâmetros de fluorescência F_0 (fluorescência dos centros de reação livres), F_m (fluorescência dos centros de reação ocupados) F_v (componente variável da fluorescência) e a razão F_v/F_m , são automaticamente calculados e mostrados num visor (primeira página), junto com o tempo em que F_m ocorreu (T_m). A segunda página mostra a área sob a curva da cinética de fluorescência da clorofila a, entre F_0 e F_m e o tempo gasto para a medição.

A relação permite inferir sobre a eficiência quântica do fotossistema II.

O tempo necessário para adaptação ao escuro e a seleção do nível de luz saturante são determinados experimentalmente, sendo variável entre as espécies. A curva de

adaptação ao escuro obtida neste experimento é mostrada na **FIGURA 6**. Os dados mostram que quinze minutos é o tempo de adaptação ao escuro com maior razão F_v/F_m , sendo o tempo adotado neste experimento. Corresponde ao tempo mínimo suficiente para o relaxamento da cadeia transportadora de elétrons no esquema Z da fotossíntese.

Análise estatística

No delineamento experimental foram considerados três tratamentos, duas repetições com sete amostragens em duas folhas, sendo submetidos à análise de variância e à comparação das médias pelo teste de Tukey a 5%. Para estas análises foi utilizado o "software" VAR-PC para MS-DOS (Ladislav Sodek, comunicação pessoal). Os valores de F_0 , F_v , F_m , da razão F_v/F_m , área e os dados de resistência difusiva e transpiração, obtidos para os diferentes pontos de amostragem, foram submetidos ao cálculo do erro padrão da média.

ENSAIOS COM PLANTAS SUBMETIDAS A PERÍODOS DE DÉFICIT HÍDRICO

Um lote com vinte plantas do híbrido *C. forbesii* X *L. tenebrosa* foi utilizado neste experimento. As plantas estiveram submetidas a 22,5% da RFA por aproximadamente um ano e foram irrigadas em dias alternados até o início do experimento. Os

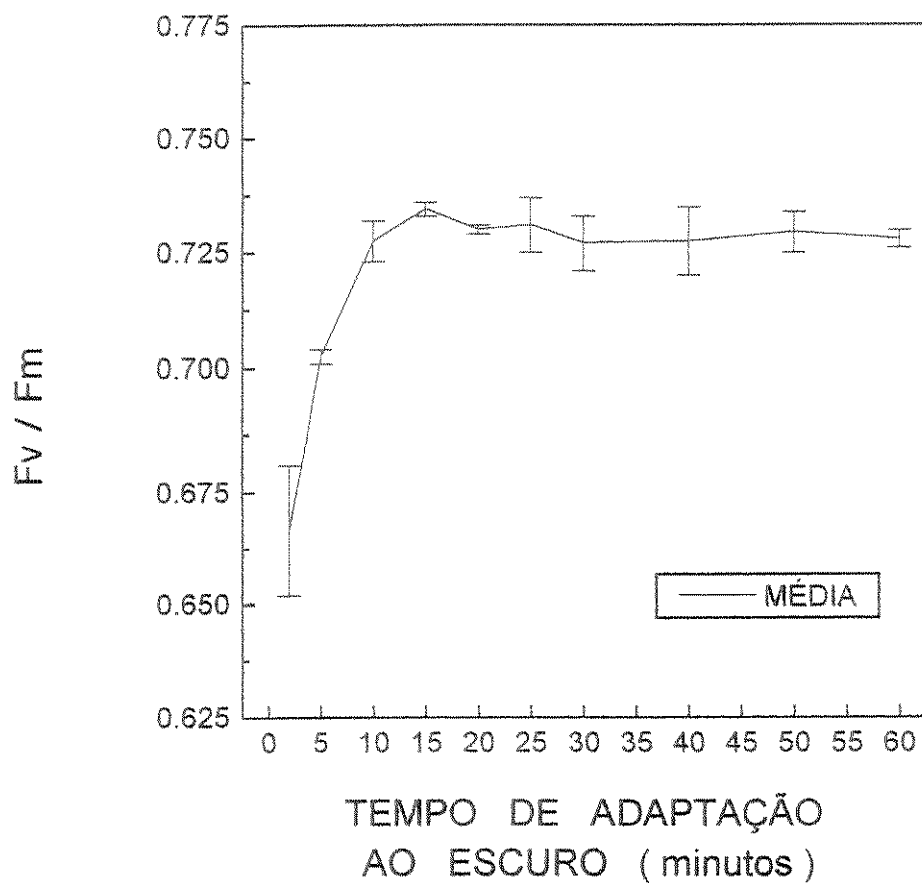


FIGURA 6. Curva de adaptação ao escuro obtida em folha do híbrido *C. forbesii* X *L. tenebrosa*, para a determinação experimental dos parâmetros de fluorescência F_0 , F_m , F_v , F_v/F_m , Tf_{max} e Área. (Barras = E.P.)

pseudobulbos e folhas mais velhos foram eliminados, sendo mantidos o broto e os cinco pseudobulbos mais novos com as respectivas folhas articuladas com ápice do pseudobulbo. As folhas 1 e 3 (FL1 e FL3) e os respectivos pseudobulbos (PS1 e PS3) foram escolhidos para as determinações e coletas.

O experimento teve a duração de quarenta e cinco dias, com amostragens aos 0, 25 e 45 dias. Com zero dias foram amostradas as plantas controle, sendo que algumas plantas irrigadas foram mantidas durante o experimento e amostradas com as plantas estressadas aos 25 e aos 45 dias. O material de duas plantas foi somado e considerado uma repetição, sendo utilizadas duas repetições por amostragem em plantas controle ou estressadas.

Na amostragem após 0, 25 e 45 dias, foram realizadas as seguintes determinações:

- 1) medições com fluorômetro (PEA) nas FL1 e FL3;
- 2) análise quali-quantitativa de carboidratos solúveis em água e de carboidratos solúveis não estruturais, na FL1 e FL3, e PS1 e PS3;
- 3) determinação da atividade específica da invertase ácida, na FL1 e FL3, e PS1 e PS3;
- 4) determinação do conteúdo relativo de água (CRA), do potencial osmótico e da relação massa seca/massa fresca (MS/MF), em folhas (FL1 e FL3) e pseudobulbos (PS1 e PS3).

ANÁLISES E DETERMINAÇÕES

MEDIÇÕES COM FLUORÔMETRO : OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS DE FLUORESCÊNCIA

O aparelho foi utilizado segundo o procedimento já descrito para ensaios anteriores. Os grampos, com o obturador na posição fechado, foram colocados na região mediana das FL1 e FL3 e o tempo de adaptação ao escuro, neste experimento, também foi de quinze minutos. Após este período, com o obturador na posição aberta, a área de exposição recebeu um pulso de luz, pico em 650nm, sendo empregado o nível de luz saturante em intensidade máxima ($3.000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

Além daqueles parâmetros automaticamente fornecidos pelo fluorômetro, F_0 , F_m , F_v e F_v/F_m , também foi estabelecida a razão F_m/F_0 , que é importante nos estudos com plantas sob déficit hídrico.

Os dados obtidos para os diferentes pontos de amostragem foram submetidos ao cálculo do erro padrão da média. Os dados referentes à razão F_m/F_0 foram submetidos a análise de variância, através do teste F.

ANÁLISE QUALI-QUANTITATIVA DOS CARBOIDRATOS SOLÚVEIS

CARBOIDRATOS DA FRAÇÃO ETANÓLICA (AÇÚCARES SOLÚVEIS NÃO ESTRUTURAIS)

As amostras de folhas (FL1 e FL3) e pseudobulbos (PS1 e PS3), em torno de 0,5g de massa seca liofilizada, foram processadas para extração com etanol 80%, banho-maria e centrifugação como anteriormente descrito.

Alíquotas foram utilizadas para a determinação colorimétrica dos níveis dos açúcares solúveis totais (Dubois et al., 1956), dos açúcares redutores (Somogyi, 1952) e de sacarose (Van Handel, 1968).

Da mesma fração, alíquotas com 10µg de equivalente-sacarose, 5µg de cada repetição, foram somadas e diluídas para 1ml de água deionizada, sendo analisadas em HPLC para monossacarídeos, oligossacarídeos e sacarose. Os parâmetros da análise por HPLC foram os mesmos descritos anteriormente.

CARBOIDRATOS DA FRAÇÃO AQUOSA

No precipitado, obtido a partir da extração e separação da fração etanólica, foram realizadas extrações para a determinação dos carboidratos solúveis em água. O procedimento utilizado para extração e análise quantitativa destes carboidratos já foi descrito neste trabalho.

Os dados obtidos para os diferentes pontos de amostragem nas análises quantitativas dos açúcares solúveis não estruturais e dos carboidratos solúveis em água, foram submetidos ao cálculo do erro padrão da média.

INVERTASE ÁCIDA: EXTRAÇÃO E ATIVIDADE *IN VITRO*

As condições de extração e incubação para a determinação da atividade *in vitro* desta enzima foram idênticas àquelas já utilizadas neste trabalho, segundo Oliveira (1985), com algumas modificações.

Os dados obtidos para os diferentes pontos de amostragem da atividade específica da invertase ácida, foram submetidos ao cálculo do erro padrão da média.

RELAÇÃO MASSA SECA/MASSA FRESCA (MS/MF), CONTEÚDO RELATIVO DE ÁGUA (CRA) E POTENCIAL OSMÓTICO

RELAÇÃO: MASSA SECA / MASSA FRESCA (MS/MF)

A relação MS/MF é dada pelo quociente entre a massa seca (MS) e a massa fresca (MF) de cada amostra, sendo uma medida adimensional. Para determinar a massa fresca (MF) nas folhas, foram coletados dez discos de cada folha (FL1 e FL3) e em cada repetição, sendo imediatamente pesados. Nos pseudobulbos (PS1 E PS3), a massa fresca foi obtida a partir de dez seções coletadas ao longo do pseudobulbo e imediatamente pesadas, por repetição. A massa fresca das amostras foi expressa em *mg*.

Em seguida, as amostras de folhas e pseudobulbos foram colocadas em estufa de secagem com ventilação forçada de ar, à 80°C, sendo mantidas nestas condições até atingirem peso constante; este peso é caracterizado como a massa seca (MS) das amostras. A massa seca das amostras foi expressa em *mg*.

Para os diferentes pontos de amostragem, os dados obtidos da relação MS/MF foram submetidos ao cálculo do erro padrão da média.

CONTEÚDO RELATIVO DE ÁGUA (CRA)

Esta relação foi obtida para folha e pseudobulbo a partir das determinações de massa fresca (MF), massa seca (MS) e de massa túrgida (MT) das amostras.

Para a obtenção da massa túrgida (MT), imediatamente após a determinação da massa fresca os discos de folhas e as seções do pseudobulbo foram colocados em recipientes contendo água destilada; estes conjuntos foram mantidos em dessecador, sob vácuo, sendo os discos de folhas e as seções do pseudobulbo periodicamente pesados. A massa túrgida foi alcançada quando as amostras não mais absorveram água, atingindo peso constante.

O conteúdo relativo de água (CRA) é dado pela relação
$$CRA = (MF - MS) \cdot (MT - MS)^{-1} \cdot 100$$
, sendo expresso em porcentagem.

POTENCIAL OSMÓTICO

Para a determinação do potencial osmótico, em osmômetro "advanced wide-range" TechCal modelo 3WII, as amostras de folhas e de pseudobulbos foram picadas e congeladas em nitrogênio líquido. Em seguida foram colocadas em seringas plásticas sendo comprimidas pelo êmbolo. O extrato vegetal produzido por este processo foi coletado num pequeno tubo de ensaio, sendo necessários 250µl, pelo menos, para leitura neste aparelho.

O osmômetro utilizado opera por crioscopia ou método do ponto de congelamento, sendo utilizadas medidas do ponto de congelamento para o cálculo do potencial osmótico da amostra. O efeito do potencial osmótico sobre o ponto de congelamento se mantém mesmo para soluções não ideais.

As medições foram realizadas logo após as extrações, sob temperatura ambiente. Os dados obtidos foram expressos em *mOsm/kg* de água.

RESULTADOS

CRESCIMENTO DE PLANTAS SOB 90% E 22,5% DA RFA

As medidas de área foliar, em cm^2 , apresentadas pelas plantas do híbrido *C. forbesii* X *L. tenebrosa*, cultivadas sob 90% e 22,5% da RFA ao longo de 173 dias de amostragem, são mostradas na **FIGURA 7**. A **FIGURA 7C** mostra a área foliar média de plantas cultivadas sob 90% da RFA apresentando área foliar inferior à das plantas cultivadas sob 22,5% da RFA, durante a maior parte do experimento, com exceção na amostragem realizada após 80 dias. O súbito incremento de área foliar observado sob as duas condições de luminosidade ocorreu devido à formação e crescimento do pseudobulbo mais novo (PS1) e a respectiva folha (FL1). Nas plantas sob 90%, a abertura completa da FL1 ocorreu na amostragem realizada após 80 dias (**FIGURA 7A**), enquanto que nas plantas sob 22,5% a abertura completa da FL1 ocorreu após 103 dias (**FIGURA 7B**). As **FIGURAS 7A** e **7B** mostram que as folhas mais novas, FL1 e FL2, apresentaram área foliar individual maior, sendo que a FL3 exibiu a menor área foliar, entre as folhas avaliadas.

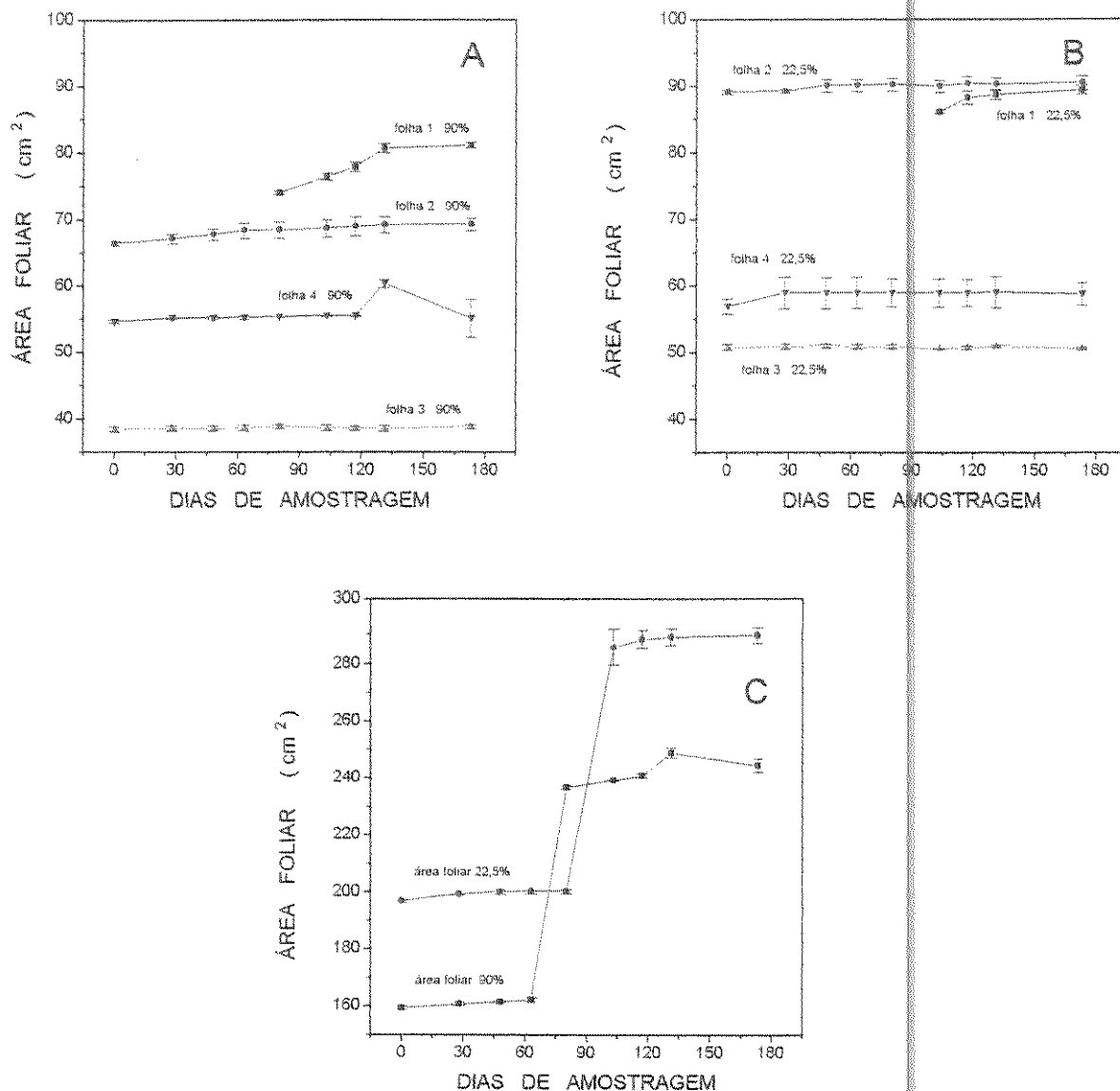


FIGURA 7. Medidas da área foliar em plantas do híbrido *C. forbesii* X *L. tenebrosa*, cultivadas em casa de vegetação, sob 90 e 22,5% da RFA, ao longo de 173 dias. As FIGURAS **A** e **B** mostram a variação na área de cada folha, sendo que a FIGURA **A** corresponde às plantas cultivadas sob 90% e a FIGURA **B**, às plantas cultivadas sob 22,5% da RFA. A FIGURA **C** corresponde à área foliar total da planta. (Barras = E.P.)

As **FIGURAS 8A e 8B** mostram a variação do volume (mm^3) dos pseudobulbos PS1, PS2, PS3 e PS4, ao longo de 173 dias, em plantas cultivadas sob 90% e 22,5% da RFA, respectivamente. Os dados mostraram que todos os pseudobulbos, sob as mesmas condições de irradiância, apresentaram alteração de volume ao longo das amostragens, simultaneamente. Nas plantas cultivadas sob 90% da RFA (**FIGURA 8A**), o PS3 apresentou o menor volume ao longo das amostragens, sendo que o PS1 exibiu o maior volume. A **FIGURA 8B** mostra que o PS3 e PS4 apresentaram o menor volume, enquanto o PS2 exibiu o maior volume durante todo o experimento.

As **FIGURAS 8A e 8B** mostram que o PS2, PS3 e PS4 tiveram seus volumes reduzidos até a amostragem imediatamente anterior à formação do PS1; após este período os volumes dos PS2, PS3 e PS4 foram gradativamente aumentando até o final do experimento. Sob 90% de RFA (**FIGURA 8A**), o PS1 não apresentou variação de volume, ao contrário do exibido pelo PS1 de plantas sob 22,5% da radiação (**FIGURA 8B**).

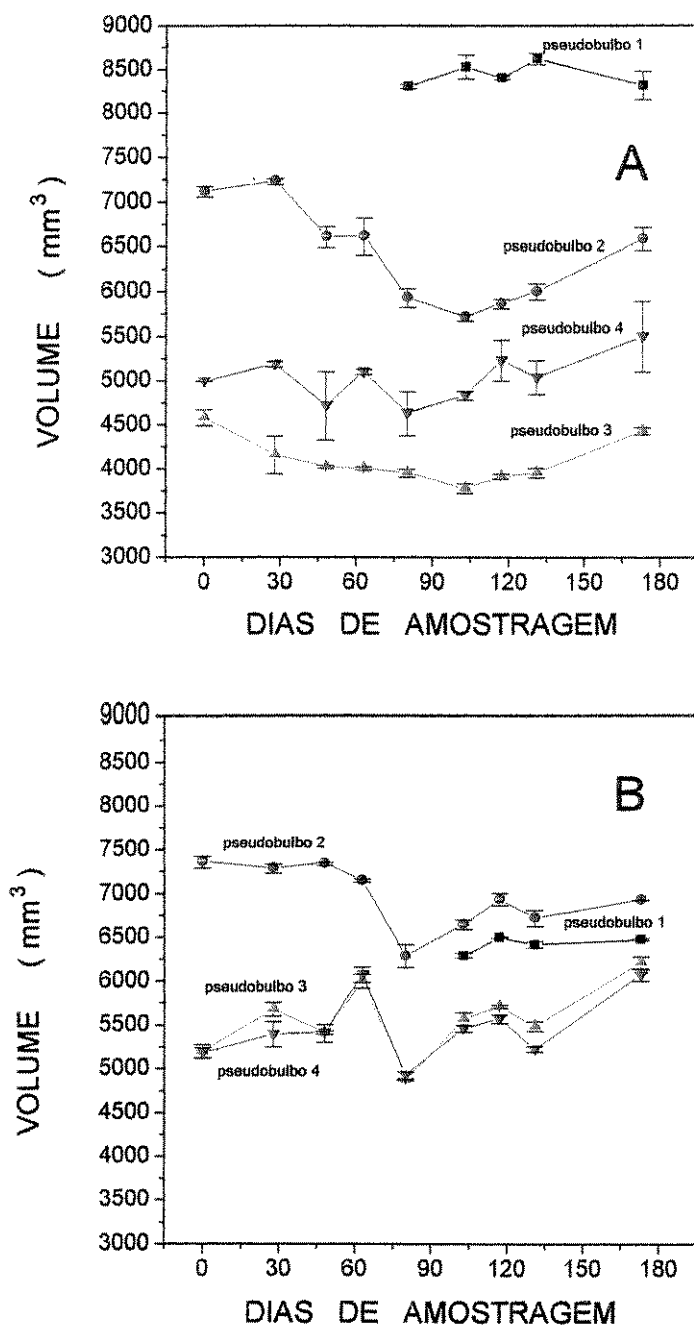


FIGURA 8. Medidas da variação no volume dos pseudobulbos em plantas do híbrido *C. forbesii* X *L. tenebrosa*, cultivadas em casa de vegetação sob 90 e 22,5% da RFA, ao longo de 173 dias. A FIGURA **A** corresponde à variação no volume dos pseudobulbos de plantas sob 90% e a FIGURA **B** corresponde à variação em plantas sob 22,5% da RFA. (Barras = E.P.)

METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E DO ÁCIDO MÁLICO, NA FOLHA E NO PSEUDOBULBO, AO LONGO DO DIA, EM PLANTAS MANTIDAS SOB 90% DA RFA

A FIGURA 9 exibe os níveis de ácido málico ($\mu\text{mol/g}$ de massa seca), encontrados na folha e no pseudobulbo, ao longo do dia. O ácido málico foi determinado inicialmente através de cromatografia em camada delgada e posteriormente através de cromatografia líquida de alto desempenho. O maior nível de ácido málico na folha foi observado às 8:00h, ainda no escuro, ocorrendo redução contínua e linear até as 16:00h, isto é, com 8 horas de luz. O nível de ácido málico encontrado no pseudobulbo manteve-se praticamente constante ao longo do período de amostragem. Os dados mostram que os níveis de ácido málico encontrados na folha são superiores aos verificados no pseudobulbo, em qualquer hora do dia.

As FIGURAS 10A e 10B apresentam os teores dos açúcares solúveis não estruturais na folha e no pseudobulbo, respectivamente. O nível de açúcares redutores (AR) na folha (FIGURA 10A) não variou ao longo do período e os teores de açúcares solúveis totais (AST) e sacarose aumentaram gradativamente até cinco horas de luz, retornando em seguida aos níveis iniciais. A FIGURA 10B mostra que os níveis de AST e de AR no pseudobulbo aumentaram nas primeiras horas do dia, atingindo o nível máximo com duas horas de luz, sendo que

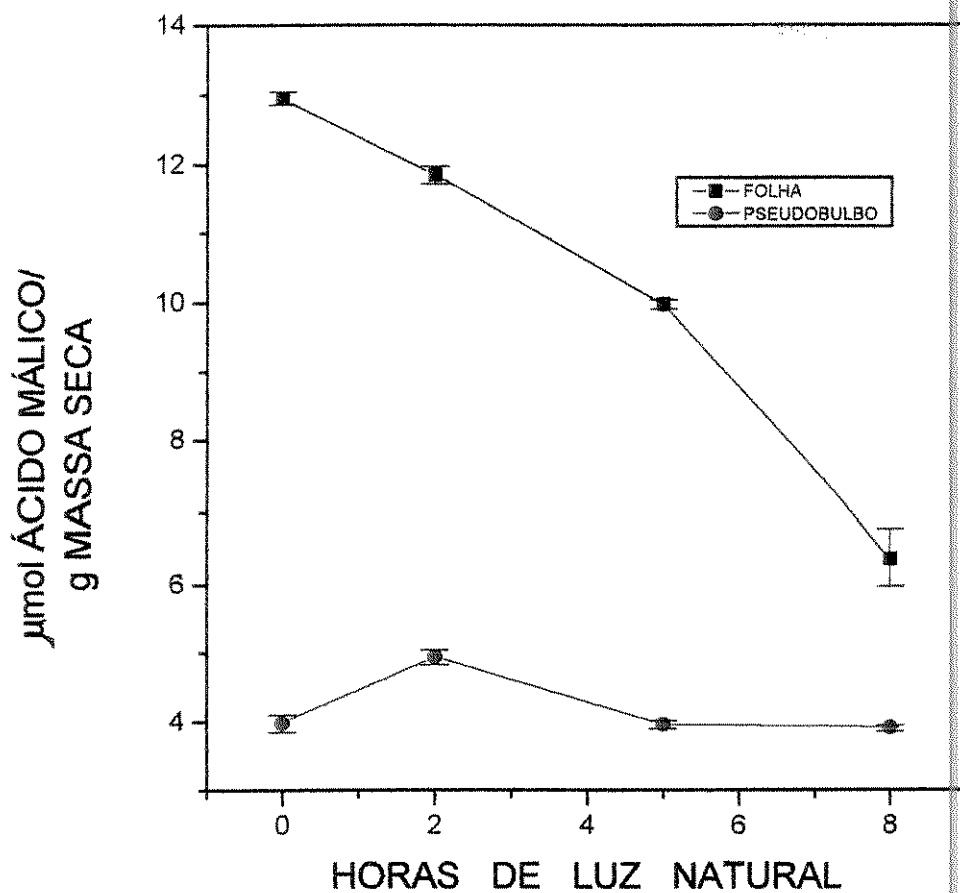


FIGURA 9. Níveis de ácido málico (PM 134,09) em folha e pseudobulbo do híbrido *C. forbesii* X *L. tenebrosa* ao longo do dia, com as plantas mantidas sob 90% da RFA. 0, 2, 5 e 8 horas luz correspondem às 8:00, 10:00, 13:00 e 16:00h respectivamente. (Barras = E.P.)

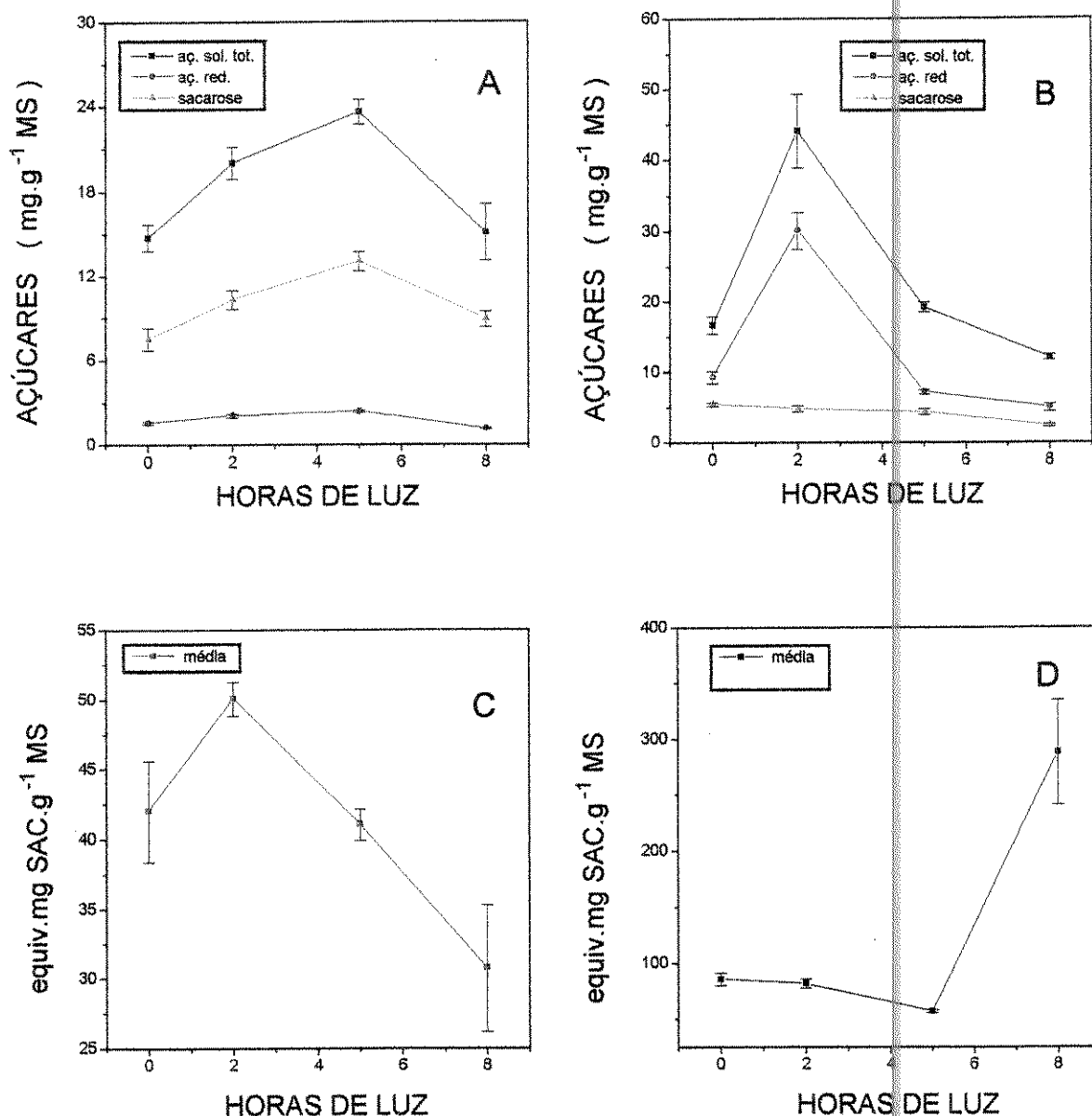


FIGURA 10. Teores de carboidratos ao longo de 8h de luz na orquídea epífita *C. forbesii* X *L. tenebrosa*. (A) açúcares solúveis totais, açúcares redutores e sacarose na folha e (B) no pseudobulbo; (C) glucomannanos na folha e (D) no pseudobulbo. (Barras = E.P.)

retornaram aos níveis iniciais até o final do período de luz; o mesmo não ocorreu com o teor de sacarose, que se manteve constante, em baixa concentração, ao longo do período.

As **FIGURAS 10C e 10D** representam a variação nos níveis de carboidratos solúveis em água, concomitante às variações no teor de açúcares solúveis não estruturais. O teor de carboidratos da fração aquosa no pseudobulbo apresentou uma redução após cinco horas de luz, ocorrendo, em seguida, uma acentuada elevação após oito horas de luz. A mesma FIGURA mostra um aumento nos níveis destes carboidratos após duas horas de luz, na folha, ocorrendo, a partir daí, uma redução acentuada após oito horas de exposição à luz.

As **FIGURAS 11 e 12** exibem a análise dos mono e oligossacarídeos que compunham a fração dos açúcares solúveis não estruturais na folha e no pseudobulbo, respectivamente. Esta análise foi realizada através de cromatografia descendente em papel, utilizando rafinose, sacarose, galactose, glucose, manose e frutose como padrões. A **FIGURA 11** mostra que em todas as amostragens realizadas verificou-se a presença de sacarose e de oligossacarídeos não identificados nos extratos (indicados por setas), sendo que após duas horas de luz também foram detectadas as maiores quantidades de frutose e glucose. Mesmo após cinco horas de luz os níveis de frutose mantiveram-se constantes e nas amostragens realizadas à zero e às oito horas de luz foram detectados apenas traços de glucose e frutose.

(A)

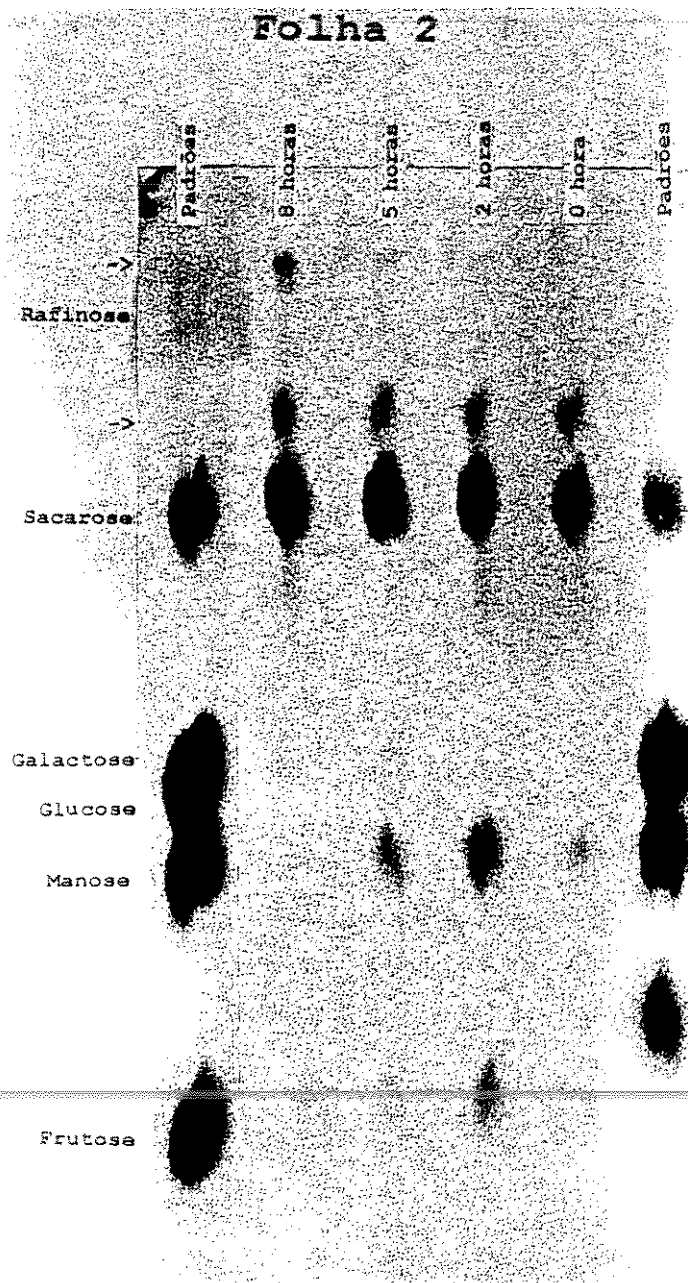
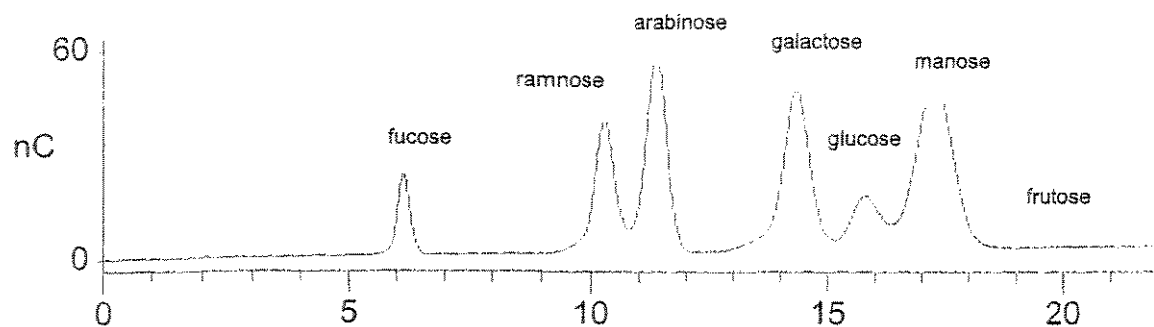


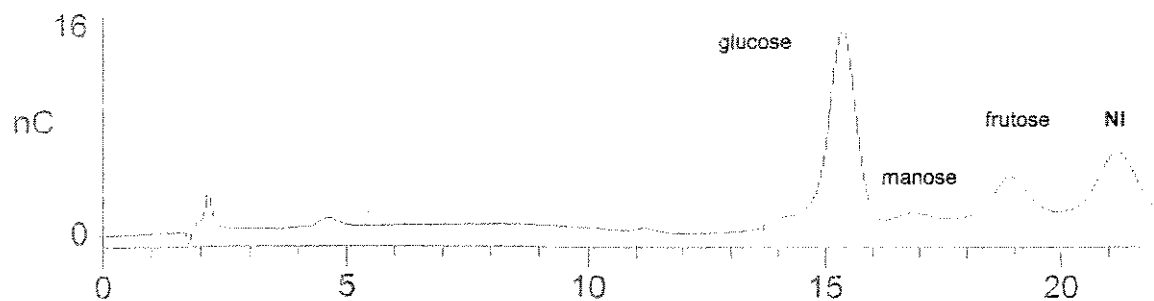
FIGURA 11. Cromatograma descendente em papel (A) e cromatograma em HPLC (B) da fração de açúcares solúveis não estruturais, em folhas do híbrido *C. forbesii* X *L. tenebrosa* ao longo do dia, com as plantas mantidas sob 90% da RFA. 0, 2, 5 e 8 horas de luz correspondem às 8:00, 10:00, 13:00 e 16:00h, respectivamente. As setas correspondem aos açúcares não identificados.

(B)

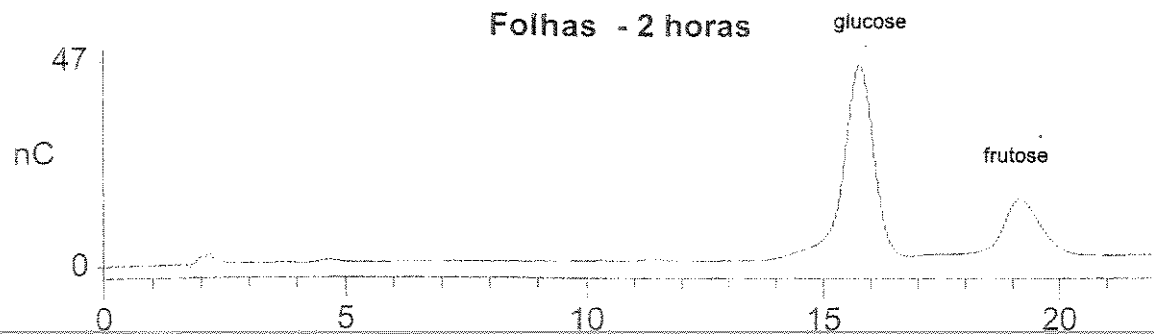
Padrão de monossacarídeos



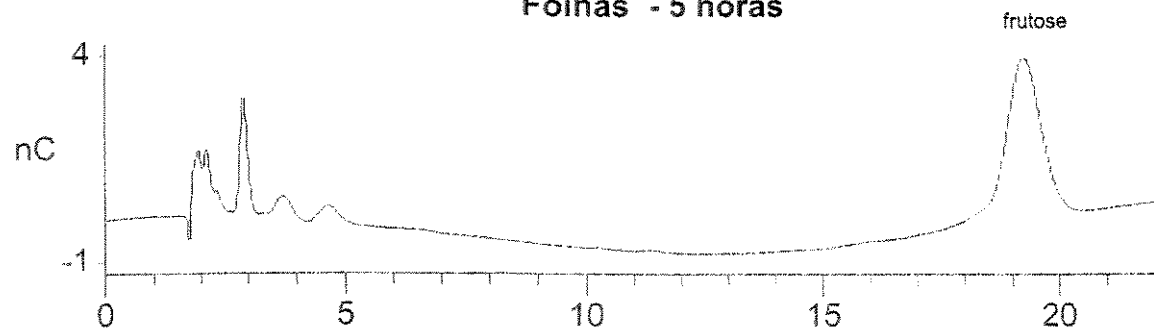
Folhas - zero hora



Folhas - 2 horas



Folhas - 5 horas



Tempo de retenção (minutos)

No pseudobulbo, a **FIGURA 12** mostra traços de oligossacarídeos não identificados e a presença de sacarose e manose em todas as amostragens realizadas, sendo que as manchas com manose mostraram-se mais intensas do que as manchas com sacarose. Paralelamente, ao longo do período de iluminação, foi observado o aparecimento transitório (entre 2 e 5h) de frutose livre, o que indica que houve hidrólise de sacarose nesse período (**FIGURAS 10, 12A e TABELA 1**).

A **TABELA 1** mostra as relações obtidas a partir de análises quali-quantitativas de carboidratos, realizadas em HPLC. As **TABELAS 1A e 1B** referem-se à fração composta pelos açúcares solúveis não estruturais e a **TABELA 1C** está relacionada aos carboidratos solúveis em água. A **TABELA 1A** mostra a relação Manose:Glucose:Frutose (Man:Glc:Fru) em folha e pseudobulbo. Para a folha, esta relação apresentou maior quantidade relativa de frutose, em seguida glucose, apresentando-se a manose em menor proporção; a variação não foi uniforme ao longo das amostragens. No pseudobulbo esta relação também não apresentou variação regular, sendo que a maior quantidade relativa é de manose, seguida pela de frutose e em menor proporção, glucose.

A **TABELA 1B** exhibe a relação Sacarose:Monossacarídeos ao longo das amostragens realizadas às 0, 2, 5 e 8 horas de luz natural, sendo que os monossacarídeos correspondem à somatória das frações de glucose, manose e frutose. Na folha a maior

(A)

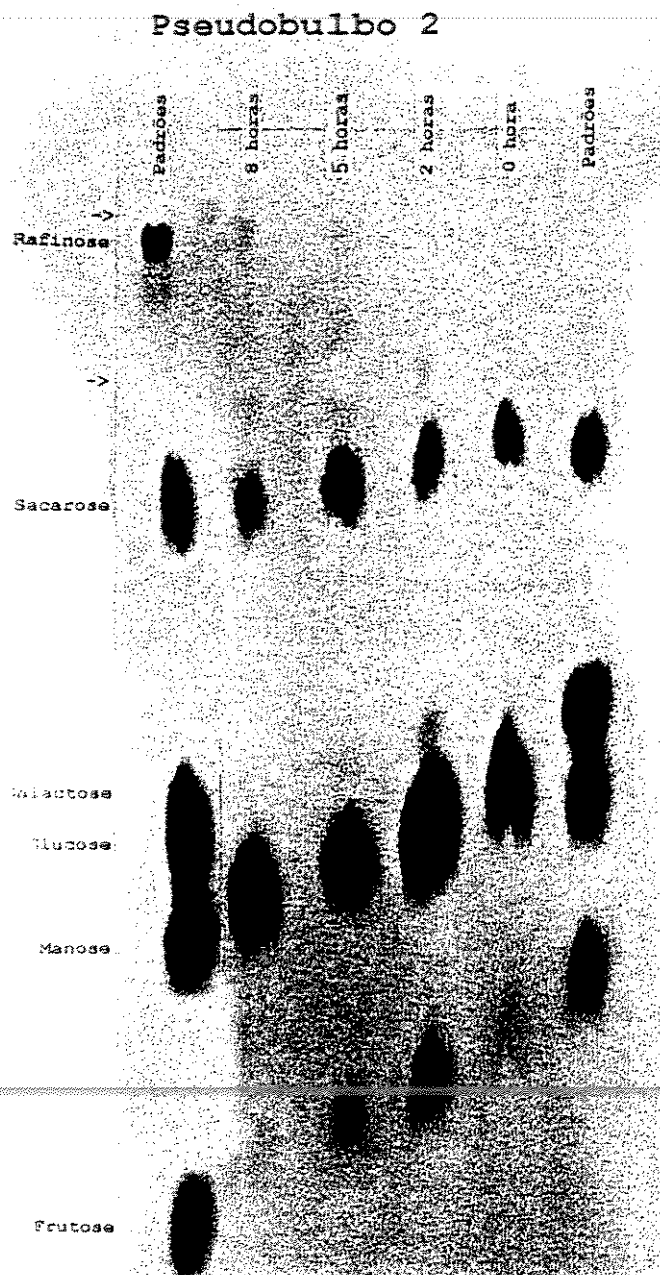
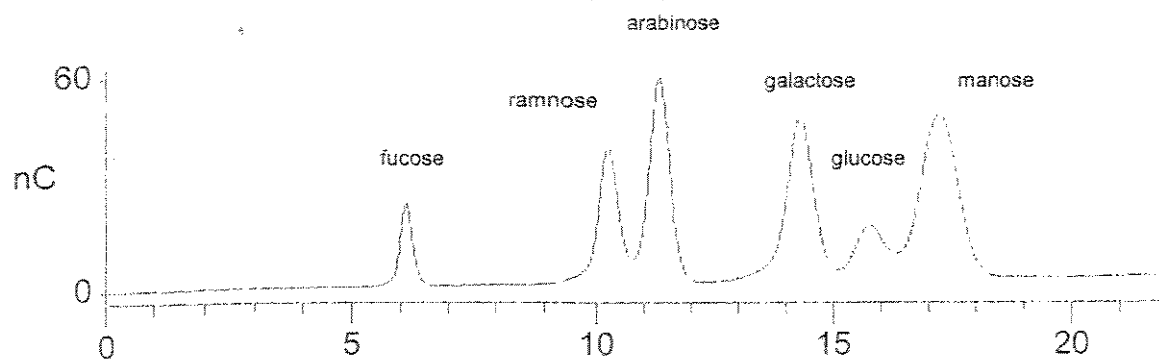


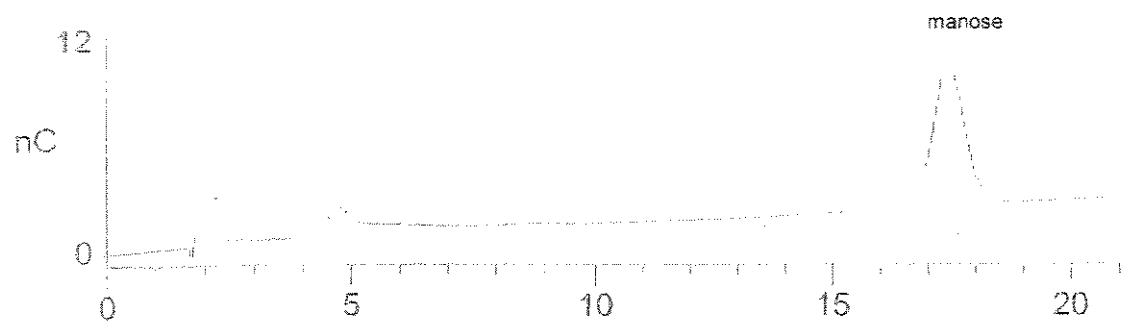
FIGURA 12. Cromatograma descendente em papel (A) e cromatograma em HPLC (B) da fração de açúcares solúveis não estruturais, no pseudobulbo do híbrido *C. forbesii* X *L. tenebrosa* ao longo do dia, com as plantas mantidas sob 90% da RFA. 0, 2, 5 e 8 horas de luz correspondem às 8:00, 10:00, 13:00 e 16:00h, respectivamente. As setas correspondem aos açúcares não identificados.

(B)

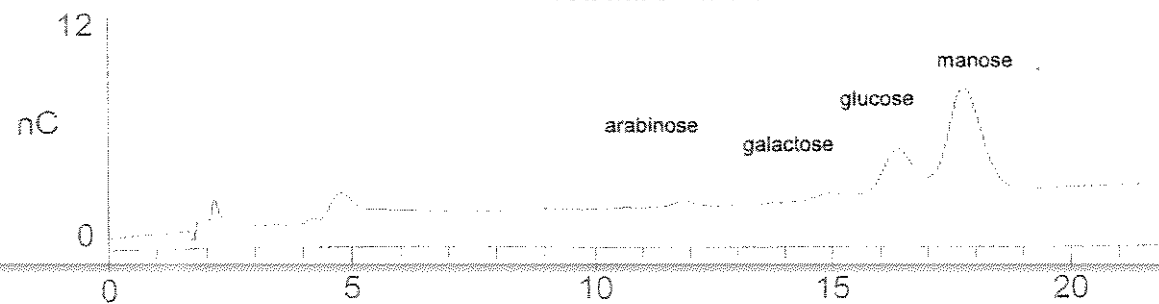
Padrão de monossacarídeos



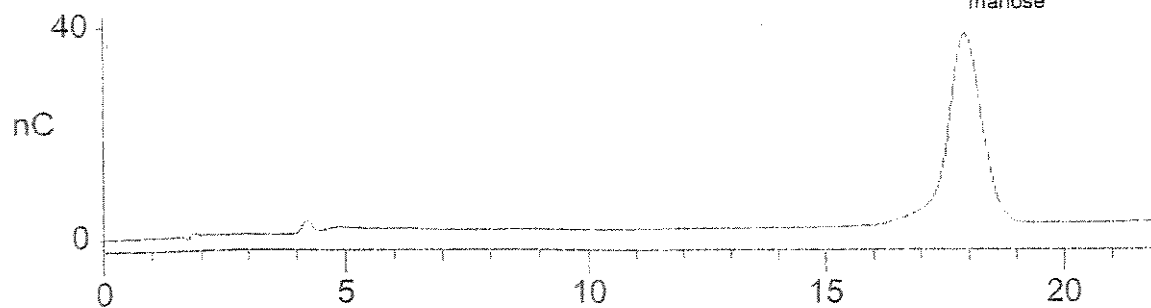
Pseudobulbo - zero hora



Pseudobulbo - 2 horas



Pseudobulbo - 5 horas



Tempo de retenção (minutos)

TABELA 1. Análise quali-quantitativa em HPLC dos açúcares solúveis não estruturais (A e B) e dos carboidratos solúveis em água (C), através da relação **Man:Glc:Fru** (A), da relação **Sacarose:Monossacarídeos** (B) e da relação **Man:Glc** (C), na folha e no pseudobulbo do híbrido *C. forbesii* X *L. tenebrosa* ao longo do dia, com as plantas mantidas sob 90% da RFA. 0, 2, 5 e 8 horas de luz, correspondem às 8:00, 10:00, 13:00 e 16:00h, respectivamente.

(A)

HORAS DE LUZ NATURAL	Man : Glc : Fru	
	FOLHA	PSEUDOBULBO
0	1 : 4,1 : 17,6	9,2 : 1 : 2,7
2	1 : 2,6 : 8,6	6,4 : 1 : 1,1
5	1 : 4,8 : 18,0	4,3 : 1 : 2,0
8	1 : 2,8 : 13,3	12,8 : 1 : 3,5

(B)

HORAS DE LUZ NATURAL	Sacarose : Monossacarídeos	
	FOLHA	PSEUDOBULBO
0	2,9 : 1	0,54 : 1
2	3,8 : 1	0,15 : 1
5	4,8 : 1	0,67 : 1
8	3,7 : 1	0,52 : 1

(C)

HORAS DE LUZ NATURAL	Man : Glc	
	FOLHA	PSEUDOBULBO
0	1,9 : 1	2,6 : 1
2	1,8 : 1	2,8 : 1
5	1,6 : 1	2,5 : 1
8	1,8 : 1	2,5 : 1

proporção foi sempre de sacarose, apresentando valores entre 2,9 a 4,8 de sacarose para um de monossacarídeos. A proporção de sacarose no pseudobulbo é menor em relação aos monossacarídeos, atingindo valores como 0,15:1 após duas horas de luz, sendo que o maior valor para sacarose, nesta relação, foi de 0,67:1, obtido após 5 horas de luz.

A **TABELA 1C** apresenta a composição e proporção dos monossacarídeos que compõem os carboidratos da fração solúvel em água, após sofrerem digestão ácida. Estes carboidratos são compostos principalmente por manose e glucose, sendo que as proporções pouco se alteraram entre as amostragens realizadas. Na folha a relação Man:Glc ficou entre 1,6 a 1,9:1; no pseudobulbo esta relação também apresentou ligeira variação, mantendo-se entre 2,5 e 2,8 de manose para 1 de glucose.

A **FIGURA 13** mostra a atividade específica de invertases ácidas na folha e no pseudobulbo, ao longo do dia. Nesta figura, é possível verificar que a atividade da enzima é superior no pseudobulbo, porém nos dois tecidos o pico de atividade ocorreu após duas horas na luz, com uma redução drástica na atividade entre duas e cinco horas, estabilizando-se entre cinco e oito horas de luz. Estas observações coincidem com aquelas das **FIGURAS 11 e 12** mostrando que as proporções de glucose e frutose livres têm um pico em 2h de luz.

Uma vez estabelecido que o pico da atividade específica da invertase ácida na folha e no pseudobulbo ocorre

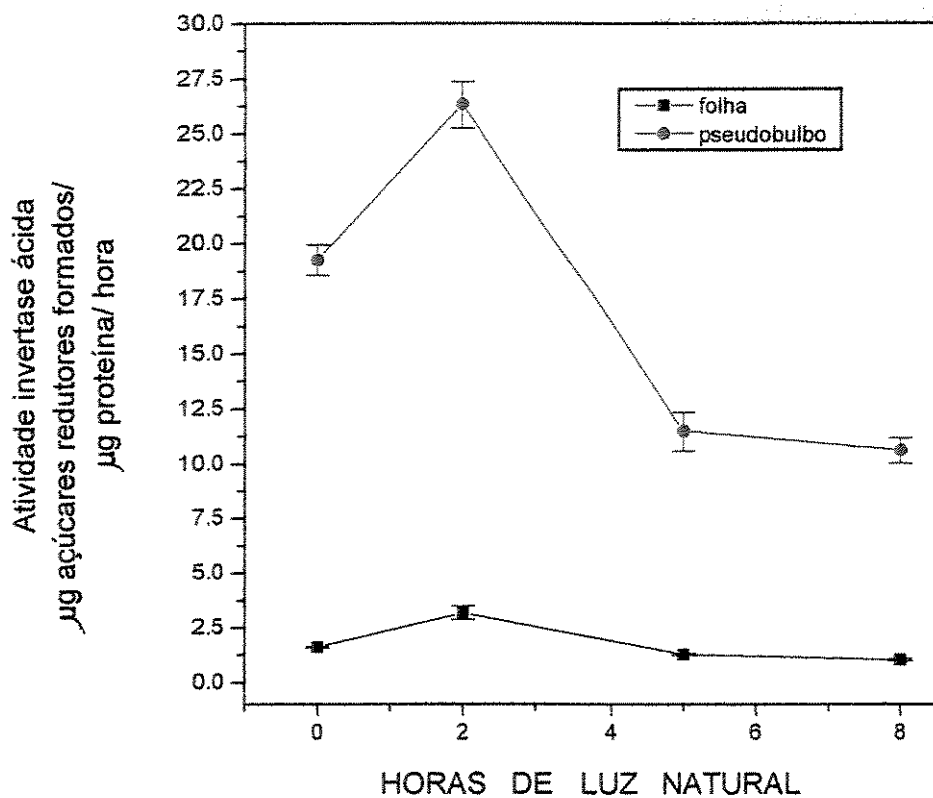


FIGURA 13. Atividade específica da invertase ácida, *in vitro*, na folha e no pseudobulbo do híbrido *C. forbesii* X *L. tenebrosa* ao longo do dia, com as plantas (n=3) mantidas sob 90% da RFA. 0, 2, 5 e 8 horas de luz, correspondem às 8:00, 10:00, 13:00 e 16:00h, respectivamente. (Barras = E.P.)

55

após duas horas de exposição à luz natural, em todos os ensaios envolvendo estas enzimas as determinações foram realizadas utilizando material vegetal coletado neste horário.

DESEMPENHO FOTOSSINTÉTICO E TROCAS GASOSAS AO LONGO DE 22 HORAS, EM PLANTAS SOB 90% E 22,5% DA RFA

As FIGURAS 14 e 15 referem-se aos parâmetros avaliados em plantas mantidas sob 90% da RFA, sob 22,5% e em plantas mantidas inicialmente sob 22,5% e posteriormente transferidas para 90%, após duas horas de luz. Os dados obtidos indicam que as plantas sob 22,5% apresentam maior volume de trocas gasosas e maior rendimento quântico quando comparadas com as plantas sob 90% da RFA, já que a transferência de plantas da condição de 22,5% para 90% estaria reduzindo a atividade do aparelho fotossintético e provocando uma menor abertura dos estômatos, nas folhas.

As FIGURAS 14A e 14C mostram os valores da resistência difusiva, obtidos nas folhas 1 e 3, respectivamente, sendo que os menores valores foram detectados durante o período noturno. As plantas mantidas sob 90% da RFA apresentaram menor valor de resistência difusiva na amostragem realizada após quatorze horas no escuro; as plantas mantidas sob 22,5% exibiram menor valor de resistência difusiva após seis horas. Este comportamento foi mostrado pela FL1 (FIGURA

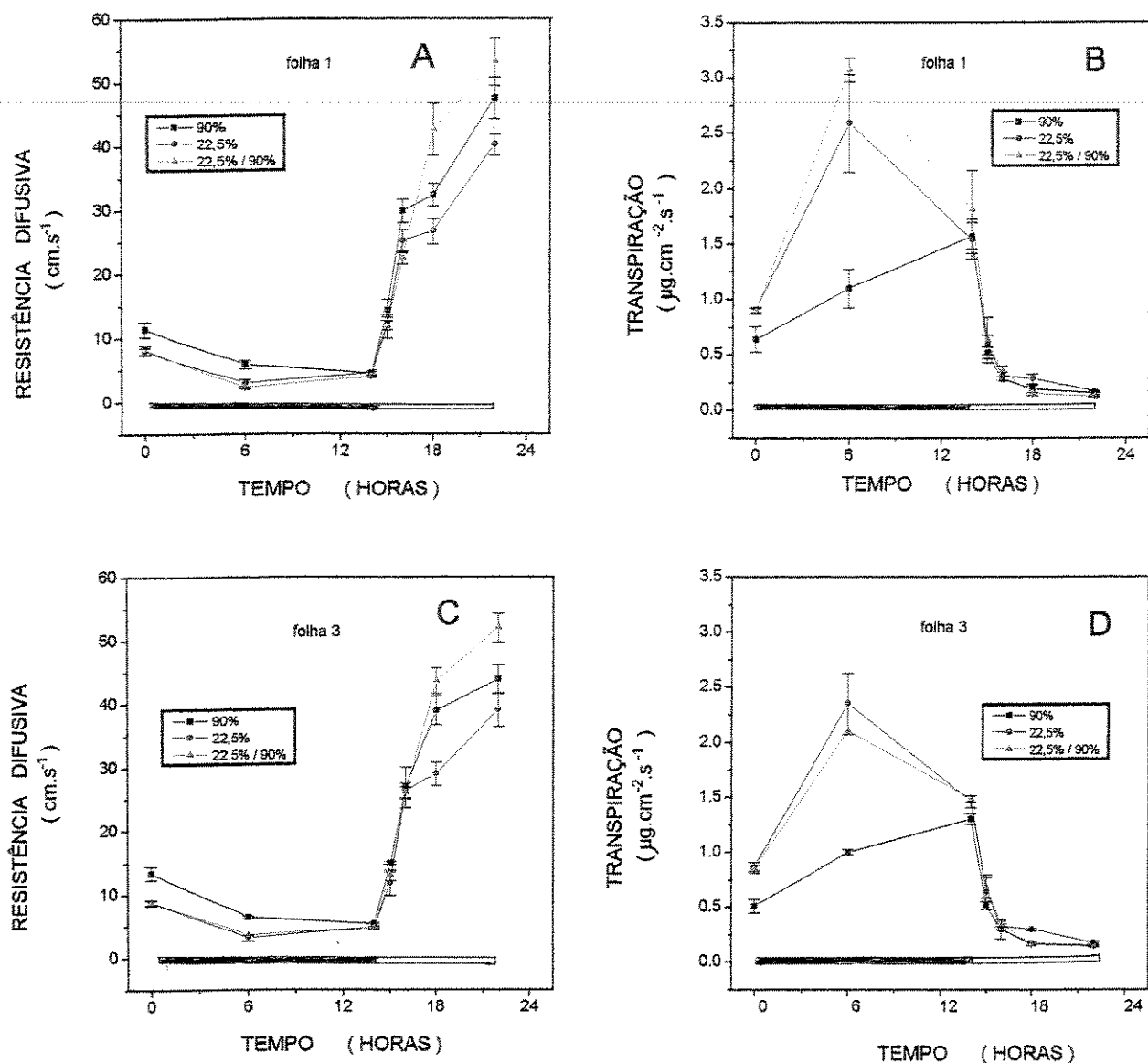


FIGURA 14. Medidas de resistência difusiva (A e C) e de transpiração (B e D), obtidas nas folhas 1 (A e B) e 3 (C e D), em plantas de *C. forbesii* X *L. tenebrosa* mantidas sob 90%, 22,5% e em plantas mantidas em 22,5% e transferidas para 90% após 2 horas de luz. As medições foram iniciadas no período escuro (0, 6 e 14 horas de escuro) e mantidas no subsequente período luminoso (1, 2, 5 e 8 horas de luz). (Barras = E.P.)

14A) e pela FL3 (FIGURA 14C). No início do subsequente período diurno, a resistência difusiva nos estômatos aumentou abruptamente após duas horas de luz, mantendo-se alta até o final do ensaio, após oito horas de luz. Neste período de luz, as plantas mantidas sob 90 e 22,5% exibiram valores muito próximos de resistência difusiva.

As FIGURAS 14B e 14D mostram que as taxas de transpiração da FL1 e da FL3 foram semelhantes, mas ocorreram diferenças significativas entre o comportamento estomático das plantas sob 90% e o das plantas sob 22,5% da RFA. As taxas de transpiração foram maiores durante o período noturno mas mantiveram-se próximas de zero durante o dia; este padrão de abertura e fechamento dos estômatos é caracterizado como sendo de uma planta do tipo CAM.

Neste caso, as informações sobre a resistência difusiva e transpiração são complementares, pois permitem o monitoramento dos estômatos durante as 24h do dia.

A FIGURA 15 mostra as medidas de fluorescência da clorofila *a* no fotossistema II, na FL1 (FIGURA 15A) e FL3 (FIGURA 15B), cujos valores estão diretamente relacionados à eficiência fotossintética das plantas. Os valores da relação F_v/F_m obtidos para a FL1 e FL3 foram bastante similares, sendo que as plantas cultivadas sob 22,5 e 90% da RFA apresentavam valores muito próximos na primeira coleta de dados, às 8:00h ou tempo zero. Esta relação manteve-se praticamente constante para

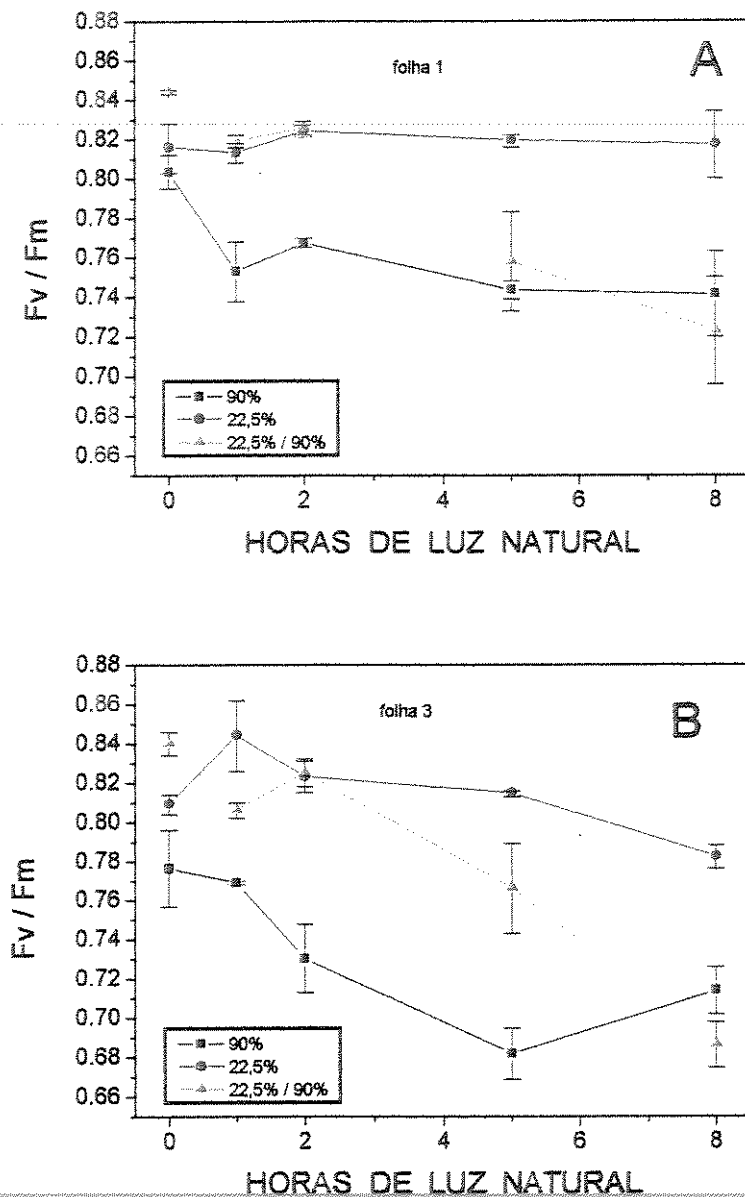


FIGURA 15. Medidas de fluorescência obtidas nas folhas 1 (A) e 3 (B) do híbrido *C. forbesii* X *L. tenebrosa* ao longo do dia, com plantas mantidas sob 90% e 22,5% da RFA e plantas transferidas de 22,5% para 90% após 2 horas de luz. 0, 1, 2, 5 e 8 horas de luz correspondem às 8:00, 9:00, 10:00, 13:00 e 16:00h, respectivamente. (Barras = E.P.)

as plantas sob 22,5%, porém para as plantas sob 90% a relação foi diminuindo, estabilizando após cinco horas de luz até o final das amostragens. As plantas transferidas após duas horas de luz, da condição de 22,5% para 90% da RFA, mostraram imediata redução no valor da relação F_v/F_m após a transferência, apresentando valores similares aos exibidos pelas plantas mantidas sob 90%. Estes dados indicam que a transferência provocou a redução na eficiência fotossintética destas plantas.

ENSAIOS COM PLANTAS SUBMETIDAS A PERÍODOS DE DÉFICIT HÍDRICO

As FIGURAS 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 e a TABELA 2 mostram os parâmetros avaliados nos pseudobulbos 1 e 3 e nas respectivas folhas, de plantas mantidas sob déficit hídrico e em plantas controle, com amostragens aos 0, 25 e 45 dias de déficit hídrico. Esses parâmetros foram utilizados para mostrar como o déficit hídrico havia interferido no metabolismo.

A FIGURA 16 apresenta os níveis dos AST, AR e sacarose, nas folhas 1 (A) e 3 (C) e nos respectivos pseudobulbos (B e D). Na FIGURA 16A é possível verificar que os níveis de AST, sacarose e AR na FL1 são praticamente iguais para as plantas controle e para as plantas estressadas após 25 dias de seca, sendo que aos 45 dias, os níveis de AST e de sacarose foram maiores nas plantas sob seca e o nível de AR

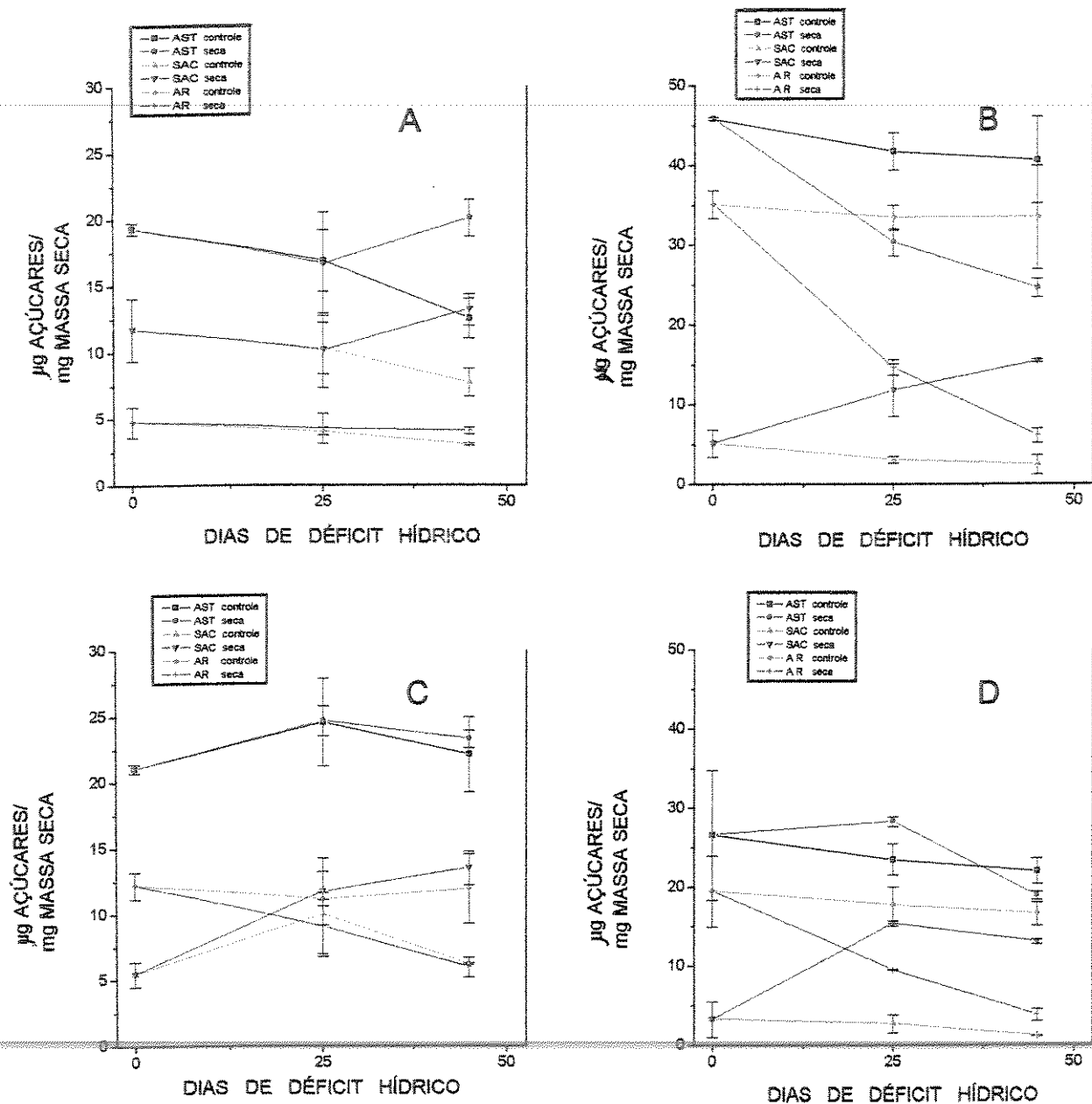


FIGURA 16. Níveis de açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR) e sacarose (SAC) nas folhas 1 (A) e 3 (C) e nos respectivos pseudobulbos (B e D), em plantas mantidas sob déficit hídrico e em plantas controle do híbrido *C. forbesii* X *L. tenebrosa*, aos 0, 25 e 45 dias de déficit hídrico. (Barras = E.P.)

101

mantteve-se ligeiramente superior. Na FL3 (**FIGURA 16C**), os níveis de AST das plantas controle e das plantas estressadas estiveram semelhantes ao longo do período de amostragem, ocorrendo um aumento no nível de sacarose após 45 dias, nas plantas em déficit hídrico.

As variações nos níveis de AST, AR e sacarose ocorridas nos pseudobulbos (**FIGURAS 16B e D**) foram acentuadas, sendo que os níveis de AST e AR, nas plantas em déficit hídrico, diminuíram seguidamente após 25 e 45 dias, enquanto o nível de sacarose mostrou um aumento acentuado. Os níveis de AR foram superiores aos níveis de sacarose, no pseudobulbo de plantas controle, ao longo do período de amostragem, ocorrendo inversão nas concentrações destes açúcares, após 45 dias, nas plantas em déficit hídrico.

Os níveis dos carboidratos solúveis em água são vistos na **FIGURA 17**. Nas folhas 1 (**A**) e 3(**C**), os níveis destes carboidratos nas plantas em déficit hídrico apresentaram um aumento considerável após 25 dias, sendo que após 45 dias estes níveis diminuíram fortemente. Nos pseudobulbos 1 (**B**) e 3 (**D**) das plantas controle, o nível destes açúcares permaneceu praticamente constante, enquanto nas plantas estressadas este nível mostrou acentuada redução.

A **FIGURA 18** mostra a atividade de invertases ácidas, *in vitro*, nas folhas 1 (**A**) e 3 (**C**) e nos pseudobulbos 1 (**B**) e 3 (**D**). A atividade destas enzimas nas plantas em déficit hídrico

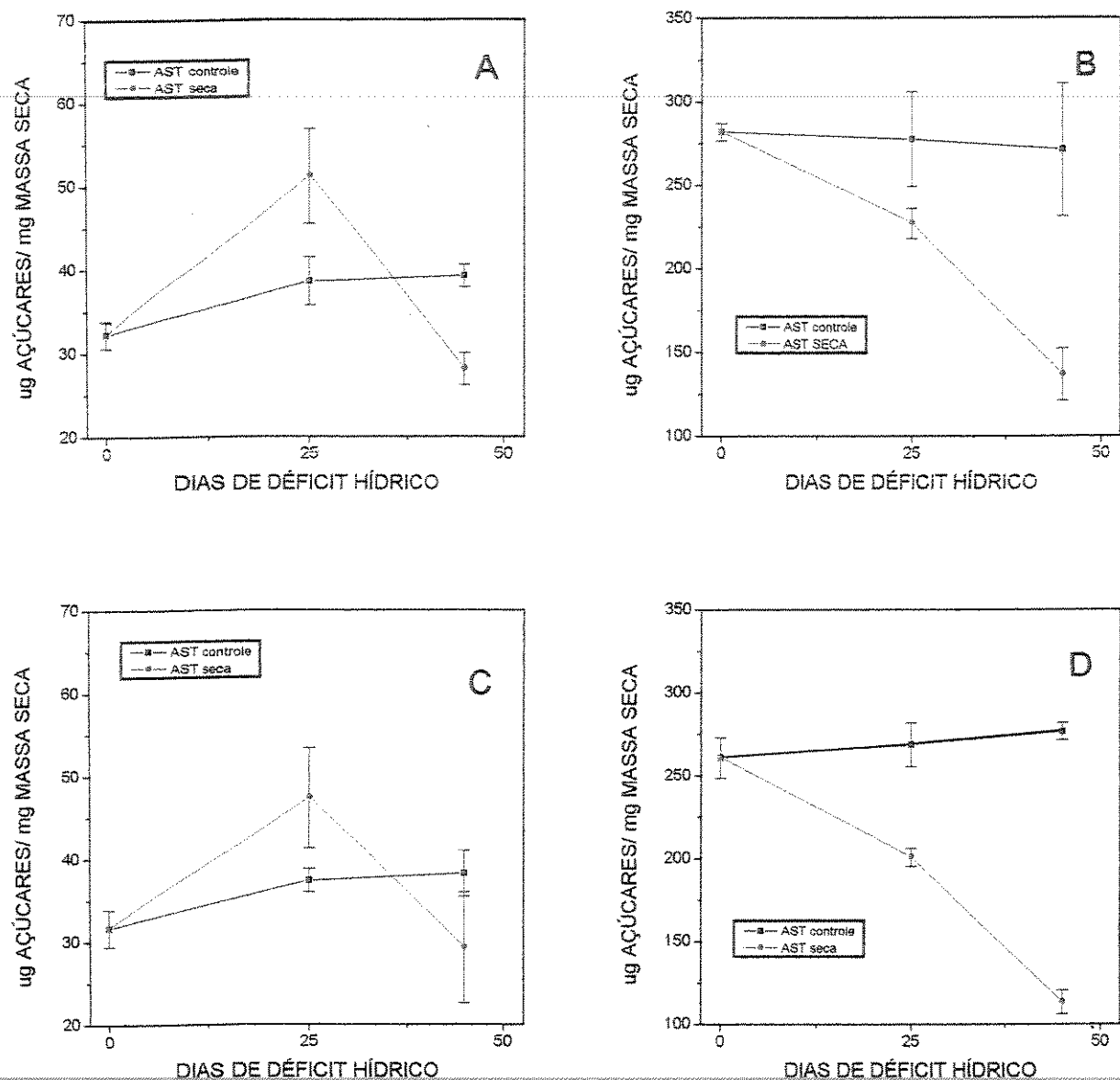


FIGURA 17. Níveis dos carboidratos solúveis em água, expressos em açúcares solúveis totais (AST), nas folhas 1 (A) e 3 (C) e nos respectivos pseudobulbos (B e D), em plantas mantidas sob déficit hídrico e em plantas controle do híbrido *C. forbesii* X *L. tenebrosa*, aos 0, 25 e 45 dias de déficit hídrico. (Barras = E.P.)

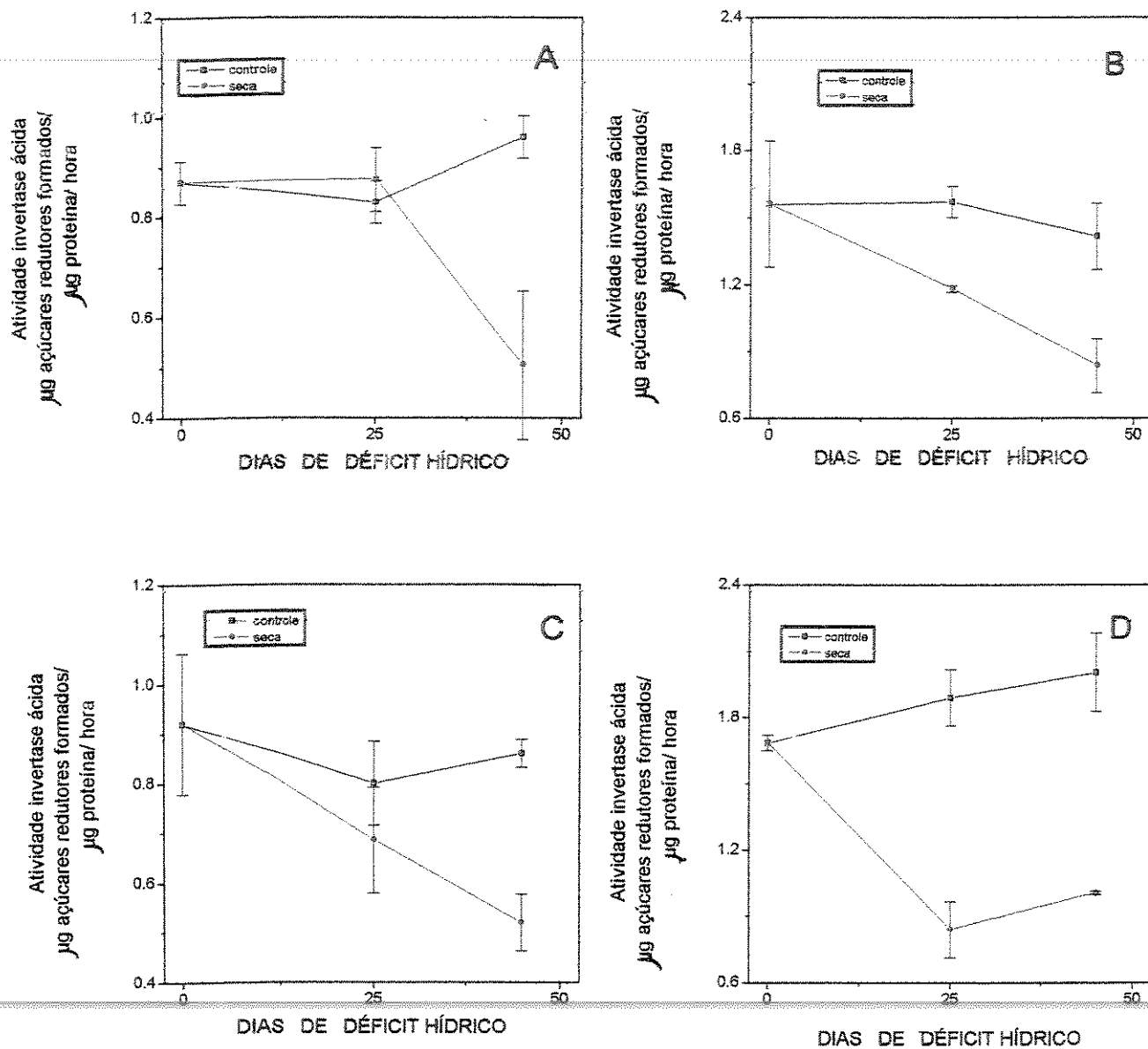


FIGURA 18. Atividade da invertase ácida, *in vitro*, nas folhas 1 (A) e 3 (C) e nos pseudobulbos 1 (B) e 3 (D), em plantas mantidas sob déficit hídrico e em plantas controle, do híbrido *C. forbesii* X *L. tenebrosa*, aos 0, 25 e 45 dias de déficit hídrico. (Barras = E.P.)

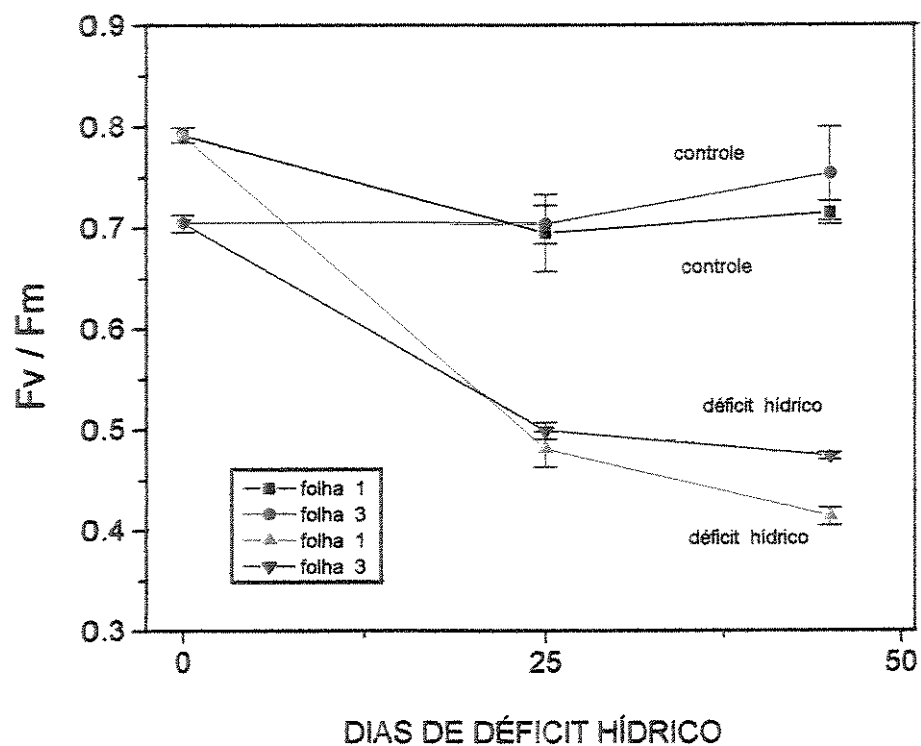


FIGURA 19. Medidas da relação F_v/F_m de fluorescência obtidas nas folhas 1 e 3, em plantas mantidas sob déficit hídrico e em plantas controle do híbrido *C. forbesii* X *L. tenebrosa*, aos 0, 25 e 45 dias de déficit hídrico. (Barras = E.P.)

foi seguidamente reduzida após 25 e 45 dias, porém manteve-se praticamente inalterada nas plantas controle.

A variação nos parâmetros de fluorescência obtidos das folhas 1 e 3, são vistos na **FIGURA 19**. Os dados mostram que a relação F_v/F_m apresentou pouca variação para as plantas controle, ao longo do período, porém mostrou acentuada redução nas folhas das plantas sob déficit hídrico. A relação F_v/F_m , que é proporcional à taxa de fotossíntese líquida de folhas intactas, diminuiu seguidamente após 25 e 45 dias nas plantas estressadas, mas permaneceu estável nas plantas controle.

A relação F_m/F_0 , que depende do potencial de água na folha e é afetada pelo déficit hídrico (Butler & Kitajima, 1975), é vista na **FIGURA 20**. Os valores obtidos para a folha 1 (**FIGURA 20A**), após 25 dias, apresentaram grande redução nas plantas sob déficit hídrico. Nas plantas controle esta relação também foi reduzida, e a partir daí permaneceu constante até aos 45 dias. Os dados da **FIGURA 20B** mostram que a relação F_m/F_0 manteve-se sem alteração na folha 3 das plantas controle, apresentando um ligeiro aumento nas plantas sob déficit hídrico, aos 45 dias.

A **FIGURA 21** mostra a relação massa seca/massa fresca (MS/MF) e o conteúdo relativo de água (CRA), nas folhas 1 e 3 (**A** e **C**) e nos pseudobulbos 1 e 3 (**B** e **D**), respectivamente. A relação MS/MF permaneceu inalterada nas folhas 1 e 3 e nos respectivos pseudobulbos, nas plantas controle (**FIGURAS 21A** e

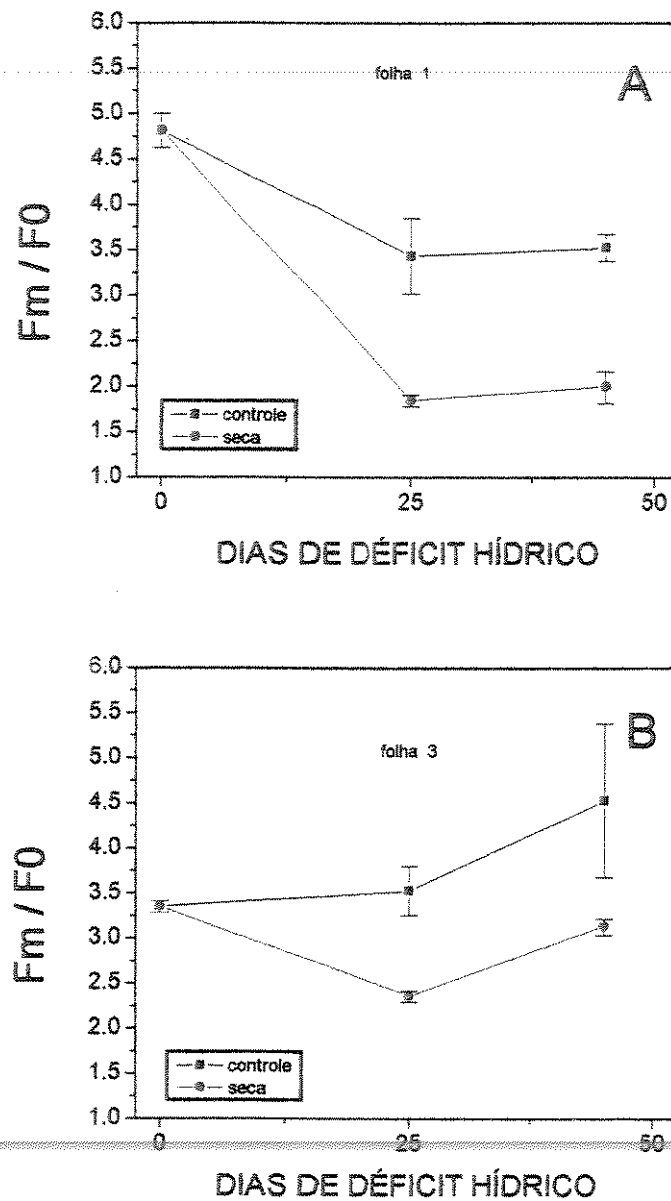


FIGURA 20. Medidas da relação F_m/F_0 de fluorescência nas folhas 1 (A) e 3 (B), em plantas mantidas sob déficit hídrico e em plantas controle do híbrido *C. forbesii* X *L. tenebrosa*, aos 0, 25 e 45 dias de déficit hídrico. (Barras = E.P.)

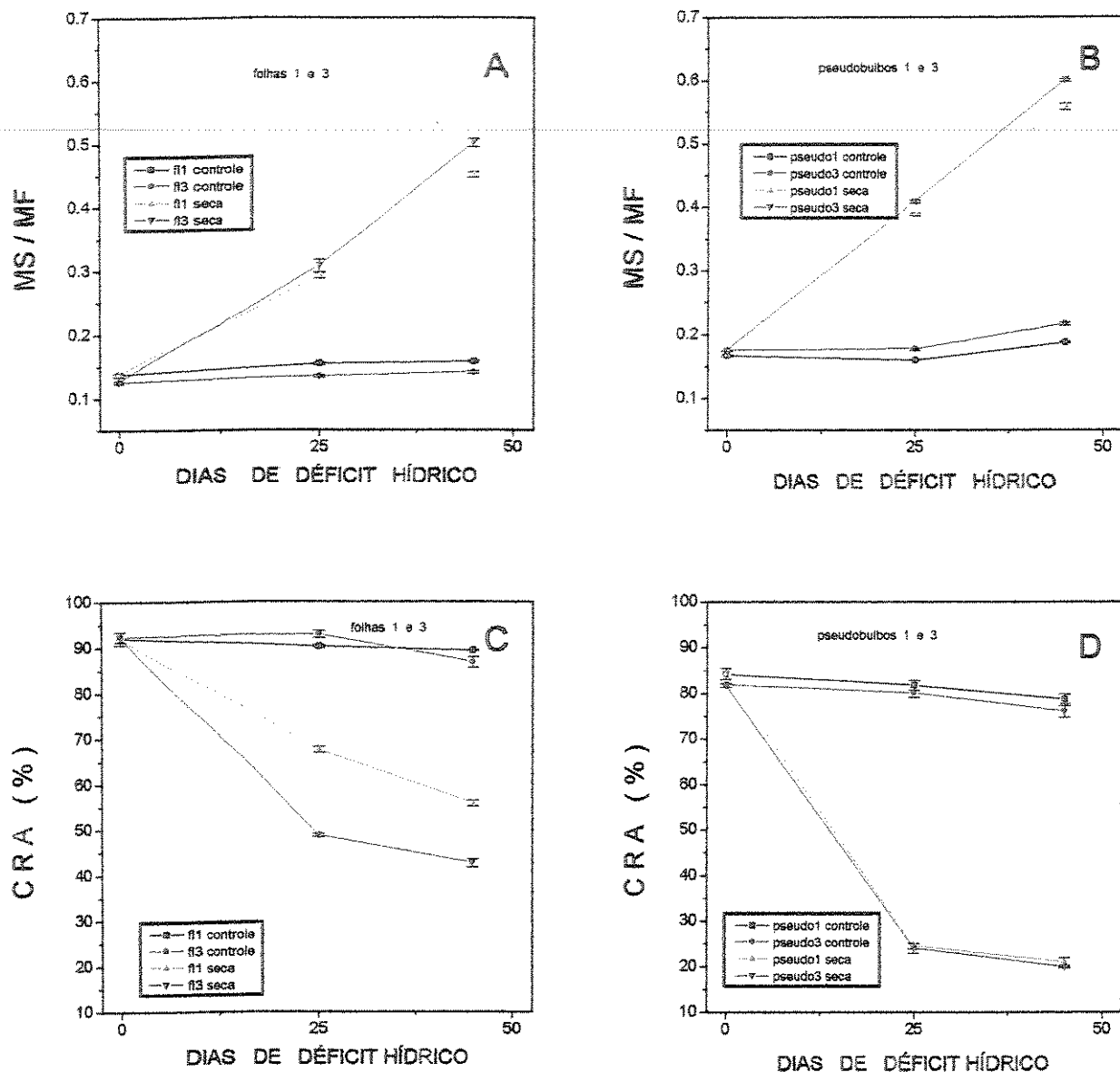


FIGURA 21. Relação massa seca/massa fresca (MS/MF) nas folhas 1 e 3 (A) e nos respectivos pseudobulbos (B) e o conteúdo relativo de água (CRA) nas folhas 1 e 3 (C) e nos respectivos pseudobulbos (D), em plantas mantidas sob déficit hídrico e em plantas controle do híbrido *C. forbesii* X *L. tenebrosa*, aos 0, 25 e 45 dias de déficit hídrico. (Barras = E.P.)

B); porém, mostrou seguidos aumentos após 25 e 45 dias nas plantas sob déficit hídrico.

O CRA nas folhas 1 e 3 e nos respectivos pseudobulbos, visto nas **FIGURAS 21C e D**, apresentou redução acentuada após 25 dias, diminuindo mesmo após 45 dias sob déficit hídrico. Nas plantas controle, o CRA manteve-se no mesmo nível ao longo do ensaios. A diminuição no CRA da FL3 é mais acentuada do que na FL1, possivelmente indicando translocação de água para as partes em crescimento.

Os valores do potencial osmótico, expressos em mOsm/kg de água, nas folhas 1 e 3 e nos respectivos pseudobulbos são mostrados na **FIGURA 22**. Isto indica que quanto maior o valor apresentado em mOsm/kg de água, maior a quantidade de substâncias osmoticamente ativas; dessa forma, o potencial osmótico se torna mais negativo. As folhas das plantas sob déficit hídrico apresentaram aumento acentuado após 45 dias, enquanto as folhas das plantas controle tiveram pequena alteração, tanto para a folha 1 como para a folha 3 (**FIGURA 22A**). Nos pseudobulbos (**FIGURA 22B**), o valor do potencial osmótico teve um aumento semelhante ao apresentado pelas folhas, com incrementos sucessivos após 25 e 45 dias.

Os valores do potencial osmótico após 45 dias foram superiores aos verificados no início das amostragens para as plantas sob déficit hídrico, enquanto para as plantas controle, estes valores apresentaram pequena alteração.

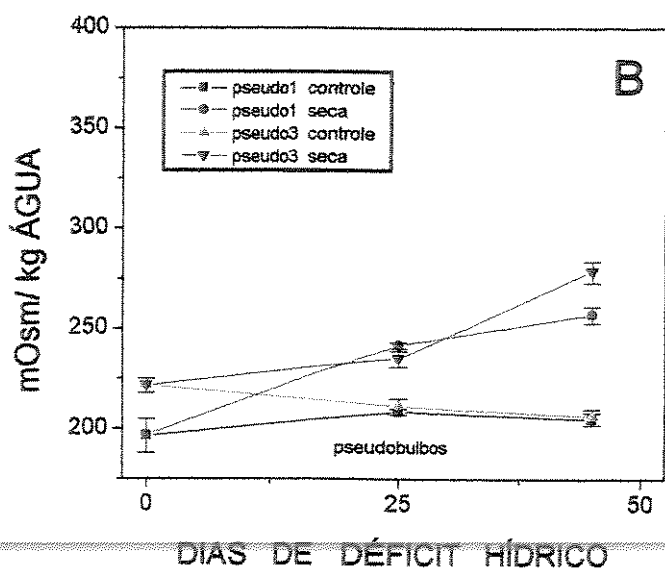
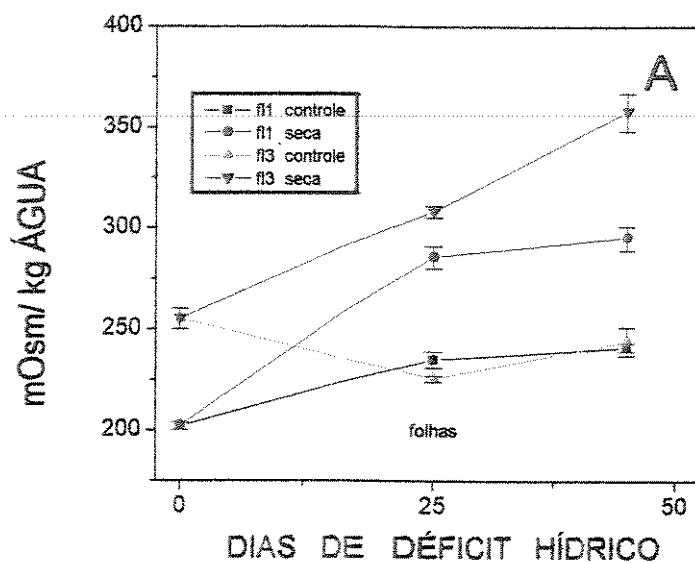


FIGURA 22. Valores do potencial osmótico nas folhas 1 e 3 (A) e nos respectivos pseudobulbos (B), em plantas mantidas sob déficit hídrico e em plantas controle do híbrido *C. forbesii* X *L. tenebrosa*, aos 0, 25 e 45 dias de déficit hídrico. (Barras = E.P.)

A **TABELA 2** mostra as relações obtidas a partir de análises quali-quantitativas de carboidratos, realizadas em HPLC, em amostras de folhas e pseudobulbos de plantas controle e plantas sob déficit hídrico. As **TABELAS 2A** e **2B** referem-se à fração composta pelos açúcares solúveis não estruturais e a **TABELA 2C** está relacionada aos carboidratos solúveis em água. A **TABELA 2A** mostra a relação Manose:Glucose:Frutose (Man:Glc:Fru) em folha e pseudobulbo. Na folha, esta relação apresentou maior quantidade relativa de glucose, seguida pela frutose e a manose em menor proporção. Em média, apresentou valores de 1:14,7:3,7 nas plantas controle e nas plantas estressadas, não ocorrendo variação uniforme ao longo do ensaio. No pseudobulbo esta relação diminuiu sucessivamente aos 0, 25 e 45 dias, apresentando valores ligeiramente superiores nas plantas sob déficit hídrico. A maior quantidade relativa é de manose, seguida pela frutose e, em menor proporção, glucose.

A **TABELA 2B** exibe a relação Sacarose:Monossacarídeos ao longo das amostragens realizadas, sendo que os monossacarídeos correspondem à somatória das frações de glucose, manose e frutose. Na folha, esta proporção apresentou valores entre 1,0 e 2,0:1. A proporção de sacarose no pseudobulbo é menor em relação aos monossacarídeos. Iniciando em 0,2:1 aos 0 dias, passando para 0,15:1 e 0,65:1 aos 25 dias em plantas controle e estressadas, respectivamente, e atingindo 0,35:1 e 0,90:1 aos 45 dias sob déficit hídrico.

TABELA 2. Análise quali-quantitativa em HPLC dos açúcares solúveis não estruturais (A e B) e dos carboidratos solúveis em água (C), através da relação **Man:Glc:Fru** (A), da relação **Sacarose:Monossacarídeos** (B) e da relação **Man:Glc** (C), na folha e no pseudobulbo, em plantas mantidas sob déficit hídrico e em plantas controle do híbrido *C. forbesii* X *L. tenebrosa*, aos 0, 25 e 45 dias de déficit hídrico.

(A)

DIAS EM DÉFICIT HÍDRICO	Man : Glc : Fru			
	FOLHA		PSEUDOBULBO	
	CONTROLE	ESTRESSADA	CONTROLE	ESTRESSADA
0	1:22,6:7,4		51,7:1:6,8	
25	1:16,1:4,1	1:12,2:3,4	34,6:1:3,1	37,1:1:2,6
45	1:15,6:4,3	1:15,1:3,0	26,6:1:2,9	31,0:1:3,5

(B)

DIAS EM DÉFICIT HÍDRICO	Sacarose : Monossacarídeos			
	FOLHA		PSEUDOBULBO	
	CONTROLE	ESTRESSADA	CONTROLE	ESTRESSADA
0	1,3:1		0,2:1	
25	1,4:1	1,0:1	0,15:1	0,65:1
45	1,8:1	2,0:1	0,35:1	0,90:1

(C)

DIAS EM DÉFICIT HÍDRICO	Man : Glc			
	FOLHA		PSEUDOBULBO	
	CONTROLE	ESTRESSADA	CONTROLE	ESTRESSADA
0	1,2:1		3,0:1	
25	1,7:1	1,9:1	0,8:1	2,2:1
45	2,0:1	2,8:1	2,5:1	2,6:1

A TABELA 2C apresenta a composição e proporção dos monossacarídeos que compõem os carboidratos da fração solúvel em água, após sofrerem hidrólise ácida. Estes carboidratos são compostos principalmente por manose e glucose, sendo que as proporções pouco se alteraram ao longo das amostragens realizadas. Na folha a relação Man:Glc aumentou progressivamente ao longo das amostragens, iniciando em 1,2:1 e finalizando, aos 45 dias, em 2,0:1 para plantas controle e 2,8:1 para plantas estressadas. No pseudobulbo esta relação também variou, mantendo-se entre 2,5 a 2,6:1 moléculas de manose para 1 de glucose, em plantas controle e em plantas sob déficit hídrico.

DISCUSSÃO

Os resultados das análises bioquímicas mostraram que uma fração considerável da massa do pseudobulbo é composta por carboidratos solúveis em água, os glucomananos. Estes carboidratos representam de 10 a 30% da massa seca, sendo que os pseudobulbos mais novos apresentam as maiores concentrações; na folha, esses teores variam de 3 a 5%. Igualmente, a composição e metabolismo dos glucomananos presentes em órgão de reserva subterrâneo de *Orchis morio* foram estudados por Franz (1979), sendo que o conteúdo de glucomananos compunha cerca de 22% da massa seca do órgão. Outros trabalhos também analisaram, com resultados semelhantes, a composição dos glucomananos presentes na família Orchidaceae (Elbein & Hassid, 1966; Franz, 1973; Buchala et al., 1974; Tomoda & Kimura, 1976).

Dessa forma, à semelhança do que ocorre com as orquídeas terrestres, esta tese mostrou que os glucomananos podem ser considerados a principal reserva de carbono da *C. forbesii* X *L. tenebrosa*, uma vez que foram apresentadas as evidências de que esses carboidratos são armazenados principalmente no pseudobulbo e, posteriormente, são

mobilizados durante as diferentes fases do crescimento e desenvolvimento da planta. Franz & Meier (1971) acompanharam a mobilização de açúcares em rizomas de *Orchis morio*, seguindo a degradação de polissacarídeos na mucilagem no rizoma mais velho e a formação de compostos de reserva no rizoma mais novo.

Como as reservas de glucomananos estão metabolicamente ligadas às outras frações de carboidratos, por exemplo os açúcares da fração etanólica (AST, AR e sacarose), sua utilização pode representar mais uma característica de adaptação fisiológica que esta orquídea vem desenvolvendo. As curvas apresentadas na **FIGURA 10**, pg. 86, mostrando os níveis dos carboidratos da fração aquosa e da fração etanólica, foram interpretadas como sendo os padrões diário de variação, em resposta aos processos de síntese e degradação destes carboidratos.

Os níveis de AST, AR e sacarose (vistos na **FIGURA 10A-B**, pg. 86), de atividade da invertase ácida (**FIGURA 13**, pg. 93), das relações estabelecidas nas **TABELAS 1A e 1B**, pg. 91, na folha e no pseudobulbo, bem como a presença dos glucomananos como material de reserva e o fato desta orquídea ser do tipo CAM, são fortes evidências de que o metabolismo dos carboidratos na folha está intimamente associado ao metabolismo dos carboidratos no pseudobulbo, apresentando níveis diuturnos bem definidos.

No período avaliado de oito horas, uma vez que as plantas foram expostas à luz, os resultados obtidos indicam que a atividade fotossintética nas folhas foi responsável pela biossíntese e posterior acúmulo de glucomananos no pseudobulbo, juntamente com o acúmulo de água. Paralelamente, o nível de sacarose na folha foi significativamente superior ($p < 0,05$) ao nível encontrado no pseudobulbo. Isso poderia indicar uma maior atividade de transporte desses açúcares do pseudobulbo para a folha, sendo que na folha também estaria ocorrendo a biossíntese de sacarose, a partir do processo fotossintético. Os dados apresentados na **TABELA 1B**, pg. 91, mostram que, proporcionalmente aos níveis de AST e AR, o nível de sacarose é mais baixo no pseudobulbo com duas horas de luz natural, em torno de 10:00h, sendo que, na folha, a relação é aproximadamente vinte e cinco vezes maior, no mesmo horário; paralelamente foram observados altos níveis de AR no pseudobulbo. Estas informações podem significar que está ocorrendo uma intensa hidrólise de sacarose no pseudobulbo, talvez, em resposta às alterações ocorridas nos componentes do potencial de água da planta. De acordo com Goh & Kluge (1989), o pseudobulbo também pode ser importante para explicar o potencial hídrico da folha, ao longo do dia. Sendo um órgão que armazena água, é presumível que a água perdida por transpiração seja rapidamente substituída pela água armazenada no pseudobulbo.

Os dados apresentados nas **FIGURAS 10C e 10D**, pg. 86, estão relacionados com os níveis dos glucomananos, ao longo do mesmo período de estudo. Observa-se na **FIGURA 10D**, pg. 86, que o teor destes carboidratos no pseudobulbo diminuiu significativamente, pelo teste de Tukey a 5%, após cinco horas de luz, ocorrendo seu acúmulo justamente no período em que os níveis de AST, AR, e sacarose são reduzidos. Isto possivelmente decorre da intensa biossíntese de glucomananos e da interação entre os dois grupos de carboidratos na folha e no pseudobulbo.

Em plantas do tipo CAM que usam amido como fonte de carboidratos para a síntese de fosfoenolpiruvato (PEP), o potencial osmótico aumenta à noite e está linearmente relacionado ao aumento noturno da concentração de ácido málico (Smith & Lüttge, 1985). Nas plantas que utilizam açúcares solúveis como fonte para PEP (Medina et al., 1986; Carnal & Black, 1989), como é suposto acontecer com a orquídea em estudo, o aumento na osmolaridade pode ser devido, parcialmente, à presença dos açúcares solúveis osmoticamente ativos, como por exemplo manose e glucose.

Os dados obtidos por Sutton (1975) mostram o envolvimento de outros carboidratos de reserva, que não o amido, em disponibilizar esqueletos de carbono para a síntese de ácido málico, no escuro. Na folha, o maior aumento no teor de glucomananos foi observado após duas horas de luz, ocorrendo sucessivas reduções nesses níveis, até o final do ensaio. Estas

informações podem indicar que a hidrólise dos glucomananos neste órgão estaria fornecendo compostos intermediários para a biossíntese de ácido málico.

A análise qualitativa dos açúcares solúveis não estruturais do pseudobulbo (**FIGURA 12**, pg. 89, e **TABELAS 1A e 1B**, pg. 91), mostra que os carboidratos dessa fração são compostos, basicamente, por sacarose, glucose, frutose e manose, não sendo encontrados carboidratos da série rafinósica, o que representaria, entre outros aspectos, a presença de carboidratos de reserva do grupo dos frutanos (Avigad & Dey, 1997). Na folha (**FIGURA 11**, pg. 88 e **TABELAS 1A E 1B**) estão presentes os mesmos mono, di e trissacarídeos presentes no pseudobulbo, sendo também encontrados, oligossacarídeos não identificados. Estes dados podem contribuir para a afirmação de que o metabolismo dos carboidratos no pseudobulbo está associado ao metabolismo dos carboidratos na folha.

PLANTAS SOB DIFERENTES INTENSIDADES LUMINOSAS

De acordo com os dados apresentados nas **FIGURAS 7 e 8**, pgs. 81 e 83, a intensidade luminosa interferiu no crescimento e no desenvolvimento da orquídea em estudo. Desde o início deste experimento as plantas cultivadas sob 22,5% da RFA exibiram área foliar superior, em torno de 23,4%, em relação às plantas cultivadas sob 90%. Na amostragem realizada após 80

dias, as plantas mantidas sob 90% da RFA passaram a apresentar um novo conjunto de pseudobulbo e folha, PS1 e FL1, respectivamente, aumentando em 45,9% a capacidade das plantas de interceptar a luz solar. O aparecimento do PS1 e da FL1 nas plantas sob 22,5% da RFA só ocorreu após 103 dias do início do ensaio, também aumentando a área foliar total destas plantas em 42,8%, porém, a diferença de vinte e três dias no estabelecimento desta unidade do simpódio (PS1 e FL1) implica num atraso do desenvolvimento das plantas, havendo a possibilidade da folha mais nova (FL1) ter iniciado sua atividade fotossintética precocemente (Zimmerman & Whigham, 1992). Estes dados são reforçados pelo fato de que sob 22,5% a FL1 apresenta atividade fotossintética aos 80 dias, mas a importação de reservas dos outros pseudobulbos ocorre até os 103 dias; já sob 90% da RFA, a FL1, que já havia sido emitida aos 80 dias, iniciou sua atividade aos 103 dias, porém a importação de reservas dos outros pseudobulbos havia sido interrompida aos 80 dias.

Todos os pseudobulbos sofreram alterações reversíveis em seus volumes (**FIGURAS 8A e 8B**, pg. 83), sendo estas alterações cronologicamente relacionadas com o surgimento da unidade mais nova da planta, ou seja, PS1 e FL1, independentemente da intensidade luminosa. A análise estatística comparativa do volume dos pseudobulbos no início das amostragens e na amostragem onde apresentaram o volume mais

reduzido, revela que as diferenças são significativas, através do teste de Tukey a 5%, podendo indicar que parte do conteúdo destes pseudobulbos migrou para o pseudobulbo e folha em formação (PS1 e FL1).

As alterações de volume verificadas nos pseudobulbos das plantas mantidas sob 90% da RFA não foram significativas, enquanto as diferenças verificadas no volume dos pseudobulbos das plantas mantidas sob 22,5%, foram significativas. Portanto, com exceção do PS2, que mostrou uma redução no volume final, os demais pseudobulbos apresentaram um aumento variando entre 5 e 16%.

Zimmerman & Whigham (1992) determinaram, em *Tipularia discolor* (Orchidaceae), que as reservas de carboidratos solúveis em água presentes no órgão subterrâneo, sofreram hidrólise e foram importantes para suportar o início da nova fase de crescimento e reprodução. A perda de matéria orgânica durante a fase reprodutiva está relacionada com o declínio na concentração destes carboidratos no órgão de reserva e nas folhas. Por outro lado, estudos de translocação indicaram que o início do crescimento se faz às custas dos carboidratos de reserva mas o crescimento subsequente e o florescimento são suportados pela fotossíntese atual (Ho & Rees, 1976 e 1977).

Nossos resultados, em concordância com os dados obtidos por esses autores, também indicam que os carboidratos armazenados nos pseudobulbos de *C. forbesii* X *L. tenebrosa* são

utilizados no crescimento do pseudobulbo e folha mais novos. Dessa maneira, as reservas em glucomananos seriam hidrolisadas aos seus monossacarídeos constituintes, transportadas na forma de sacarose para o pseudobulbo e folha em crescimento e, nestes órgãos, estes açúcares seriam utilizados nos processos respiratórios e na síntese de outros compostos. Assim sendo, o papel armazenador do pseudobulbo estaria sendo evidenciado, já que após o crescimento inicial do pseudobulbo e folha mais novos, os fotoassimilados foram novamente alocados nos pseudobulbos mais velhos, recompondo suas reservas para um eventual período de déficit hídrico ou para o próximo período de brotação, que ocorre anualmente.

Dentre alguns dos aspectos da plasticidade fenotípica mostrados pelas plantas submetidas aos dois níveis de intensidade luminosa, estão a modulação da área foliar, apresentada na **FIGURA 7A-C**, pg. 81, e a variação sazonal do volume dos pseudobulbos, vista nas **FIGURAS 8A e 8B**, pg. 83.

As **FIGURAS 14A-D e 15A-B**, pgs. 95 e 97, também evidenciam o nível de adaptação experimentado pelo híbrido em estudo. Nestas figuras, é possível verificar que as plantas apresentaram características diferenciadas, provavelmente em função da intensidade luminosa a que estavam submetidas. A **FIGURA 14A-D**, pg. 95, permite distinguir o comportamento estomático, através da resistência difusiva e da taxa de transpiração, das plantas sob 90% e das plantas sob 22,5% da

RFA. A variação nestes parâmetros indica que as plantas submetidas a 22,5% da RFA apresentaram a maior abertura dos estômatos após seis horas de escuro, enquanto nas plantas sob 90% o máximo na abertura estomática ocorreu após quatorze horas de escuro, sendo que no pico, os níveis de resistência difusiva e transpiração exibidos pelas plantas submetidas a 22,5% da RFA foram estatisticamente superiores aos apresentados pelas plantas sob 90%, através do teste de Tukey a 5%, mostrando um acréscimo na transpiração em torno de 70% e uma diminuição de 75% na resistência estomática.

O padrão de abertura estomática, apresentado pelas plantas sob 22,5% e 90% da RFA, pode ser considerado um ótimo parâmetro de avaliação desta orquídea epífita frente aos níveis de intensidade luminosa, sendo que as plantas sob 22,5% exibiram o comportamento de abrir os estômatos justamente no período mais úmido, ou seja, à noite. Enquanto isso, as plantas sob 90% mostraram-se menos sensíveis às variações na umidade relativa, apresentando maior capacidade para trocas gasosas com a atmosfera somente quando a umidade relativa do ar atingiu os maiores valores, isto é, ao amanhecer.

Como este híbrido apresenta o metabolismo do tipo CAM, estas características podem significar que as plantas submetidas a 22,5% da RFA apresentam maiores taxas de incorporação do CO_2 atmosférico, como também maior fluxo de água para as folhas, já que permanecem com os estômatos mais abertos e por maior tempo, durante à noite. Hinsberg &

Tienderen (1997) também encontraram diferenças morfológicas e fisiológicas em plantas de *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae), quando cultivadas sob alta intensidade de luz e sob sombra.

Estes dados estariam indicando que as plantas submetidas a 22,5% da RFA apresentam maior taxa de acúmulo de massa seca, como consequência do melhor desempenho fotossintético enquanto as plantas sob 90% estariam sofrendo efeitos da fotoinibição.

É interessante notar que a intensidade luminosa também afetou a eficiência do processo fotossintético. A relação F_v/F_m vista nas **FIGURAS 15A e 15B**, pg. 97, para as folhas 1 e 3, respectivamente, e que é proporcional à taxa de fotossíntese líquida de folhas intactas (Bjorkman & Demmig, 1987), mostrou-se estatisticamente superior para as plantas sob 22,5% da RFA. Esta relação manteve-se em torno de 0.8 para as plantas sob 22,5%, o que representa um bom índice fotossintético para as plantas cultivadas em geral, enquanto que sob 90% da RFA esta relação só foi superior a 0.8 na primeira amostragem, mantendo-se na faixa entre 0.76 e 0.74, ao longo das amostragens, o que indica uma redução no desempenho fotossintético. Não considerando a primeira amostragem, os valores obtidos em plantas sob 90% da RFA podem revelar a presença de mecanismos de foto-proteção não adaptados aos altos níveis de irradiância, podendo refletir no equilíbrio adequado

entre a síntese e a destruição de pigmentos acessórios e de dissipação do calor, na folha. Xerófitas adaptadas à alta intensidade luminosa apresentam uma taxa de transpiração mais reduzida e podem suportar temperaturas interiores bastante elevadas. Neste caso, o equilíbrio ocorre com um aumento na emissão de radiação infra-vermelha e perdas de calor por condução e convecção (Jones, 1992).

A transferência de algumas plantas da condição de 22,5% para a condição de 90% da RFA mostrou como esta orquídea epífita responde frente a uma exposição repentina à luz com alto nível de irradiância, tendendo gradativamente a se comportar como aquelas mantidas há mais tempo nesta condição, sendo que as plantas do tipo CAM crescidas na sombra podem ser sensíveis à fotoinibição (Adams & Osmond, 1988). Após a transferência, ocorreu a rápida diminuição do rendimento quântico destas plantas, sendo que a relação F_v/F_m (FIGURAS 15A e 15B, pg. 97) mostra como a capacidade fotossintética foi reduzida gradativamente, atingindo níveis significativamente inferiores aos exibidos pelas plantas sob 22,5%. O comportamento das plantas transferidas indica que estaria ocorrendo a fotoinibição do processo fotossintético, já que não houve exposição das plantas a baixos níveis de CO_2 , nem submissão temporária a temperaturas inferiores a $10^\circ C$ (Bjorkman & Demmig, 1987).

É muito provável que sob 90% da RFA, as plantas também estivessem expostas às altas temperaturas, que por sua vez, poderiam induzir alterações deletérias ao aparelho fotossintético, mimetizando os efeitos da fotoinibição. Estas informações estão em concordância com alguns trabalhos (Medina et al., 1986; Medina, 1987) e mostram que algumas orquídeas epífitas, nativas de matas tropicais e subtropicais, incorporam o CO_2 atmosférico à noite, porém são plantas que apresentam fotoinibição quando expostas a níveis mais elevados de luz.

O comportamento dos estômatos apresentado pelas plantas sob 90% (**FIGURA 14A-D**, pg. 95), poderia estar contribuindo para um aumento na temperatura interna da folha, não permitindo que as trocas térmicas com a atmosfera acontecessem em sua plenitude, já que uma parte do potencial de troca térmica, devida à perda do vapor de água, não estaria ocorrendo.

Como as folhas desta orquídea não estão geneticamente adaptadas à exposição solar plena, nos períodos sob alta exposição elas reduzem sensivelmente a taxa fotossintética, provavelmente por não possuírem mecanismos adequados de proteção aos mais altos níveis de irradiância, nem sistemas mais sensíveis de termodissipação. Os níveis de AR na folha mantêm-se reduzidos, como consequência de sua utilização nos processos respiratórios, sendo que sob alta intensidade

luminosa também ocorre biossíntese e acúmulo de glucomananos no pseudobulbo.

PLANTAS SUBMETIDAS A PERÍODOS DE DÉFICIT HÍDRICO

Os dados obtidos neste ensaio mostraram que plantas de *C. forbesii* X *L. tenebrosa* quando submetidas a períodos de déficit hídrico em torno de 25 dias apresentaram tolerância relativa, porém se mostraram desprotegidas contra a seca prolongada além dos 45 dias. Em todos os parâmetros avaliados, as plantas em déficit hídrico exibiram comportamento distinto se comparadas às plantas controle, a partir dos 25 dias de déficit hídrico.

No metabolismo dos açúcares solúveis totais na folha e no pseudobulbo, as **FIGURAS 16A, 16C**, pg. 99 e a **TABELA 2B**, pg. 110, mostram que ocorreu ligeira variação no nível de AST até 25 dias de déficit hídrico, representados na folha principalmente por sacarose; após 45 dias, as plantas em déficit hídrico mostraram um aumento acentuado de sacarose na folha ($p < 0,05$), enquanto nas plantas controle o nível de sacarose permaneceu estável. O nível de AR manteve-se baixo, não variando sua concentração ao longo das amostragens.

As **FIGURAS 16B e 16D**, pg. 99 e a **TABELA 2**, pg. 110, confirmam que no pseudobulbo das plantas controle os níveis de AST e seus constituintes não sofreram variações significativas

durante os 45 dias. Ao contrário, nas variações apresentadas pelas **FIGURAS 16A-D** e **TABELAS 2A** e **2B** podem estar os indícios de que ocorreram alterações importantes no metabolismo e na mobilização destes compostos, em resposta à redução na capacidade fotossintética das plantas que permaneceram sob déficit hídrico (**FIGURAS 19**, pg. 104 e **20A-B**, pg. 105); estas respostas também podem confirmar o intercâmbio de substâncias entre a folha e o pseudobulbo. Desta forma, é possível que parte dos AR mobilizados no pseudobulbo tenha sido translocada para a folha na forma de sacarose, contribuindo para a manutenção dos níveis de AR e sacarose, naquele órgão; sob condições de déficit hídrico, é provável que tenha ocorrido intensa síntese de sacarose no pseudobulbo para atender à demanda na folha, não havendo, porém, suficiente mobilização e nem transporte deste açúcar à medida em que o déficit hídrico foi se acentuando. Adicionalmente, é sabido que sob condições estressantes, a atividade enzimática e a translocação de assimilados podem ficar comprometidas (Watson & Wardlaw, 1981).

Ainda em relação ao metabolismo dos carboidratos, a **FIGURA 17A-D**, pg. 101, possivelmente vem confirmar um papel importante que é desempenhado pelos carboidratos solúveis em água (glucomananos). A hidrólise e mobilização destes carboidratos na folha e, principalmente, no pseudobulbo, sob forte ação do déficit hídrico, podem estar relacionadas com a mobilização dos glucomananos e com a concomitante síntese de

sacarose no pseudobulbo e também com o transporte de sacarose deste órgão para a folha até 25 dias, como verificado por Sutton et al. (1981) em *Opuntia bigelovii*. De acordo com Virgona & Barlow (1991), a imposição do déficit hídrico no caule de *Triticum aestivum* resultou na incorporação de monossacarídeos para a fração dos açúcares solúveis da fração etanólica, a partir de carboidratos solúveis em água.

Todas as orquídeas epífitas possuem tecidos que armazenam água, isto é, são também chamadas de suculentas (Sinclair, 1984; Zimmerman, 1990; Stern & Morris, 1992; Zheng et al., 1992; Hew & Young, 1994). Mais uma vez, na orquídea estudada, o pseudobulbo é considerado um órgão com acúmulo de carboidratos e de água. Dessa maneira, as **FIGURAS 21A-D**, pg. 107 e **22A-B**, pg. 108, indicam que o híbrido estudado mostrou-se sensível a um período de déficit hídrico muito prolongado, além dos 45 dias, pois mesmo possuindo pseudobulbo, não foi capaz de reter grande parte da água perdida por transpiração cuticular nem de repôr à folha a água previamente armazenada no pseudobulbo.

Como não foram conduzidos os ensaios de recuperação das plantas submetidas aos períodos de déficit hídrico, adotou-se a possibilidade de recuperação após 25 dias de déficit hídrico e a impossibilidade de recuperar plenamente uma planta após os 45 dias.

Alguns trabalhos conduzidos com epífitas mostraram que as relações hídricas apresentam restrições dentro de cada grupo, não sendo permitidas generalizações. Walter (1951) citado por Goh & Kluge (1989), trabalhou com orquídeas epífitas que perderam água lentamente na folha, mantendo altos valores do CRA. Ao contrário, Sinclair (1983a e b) observou redução nos valores do CRA e do potencial de água, ao longo de um período de déficit hídrico, em algumas epífitas tropicais. Essas informações, em associação com as obtidas neste trabalho, podem indicar que a elevação no valor do componente osmótico na folha deve ter contribuído para o colapso celular após os 25 dias, reduzindo gradualmente a translocação de compostos e o transporte de água entre os tecidos.

O aumento no nível de monossacarídeos na folha após 25 dias em déficit hídrico (**FIGURAS 17A e 17C**, pg. 101) pode ser resultante da hidrólise enzimática dos glucomananos presentes na folha e no pseudobulbo, implicando no abaixamento do potencial osmótico (**FIGURA 22A-B**, pg. 108). As variações ocorridas no nível dos glucomananos, principalmente no pseudobulbo, seriam uma indicação de que estes carboidratos estariam sendo hidrolisados. Geralmente, a hidrólise é realizada por determinados grupos de enzimas cujas reações podem incorporar moléculas de água como produto; parte dos monossacarídeos presentes neste órgão juntamente com a água incorporada (cada ligação glicosídica quebrada incorpora uma

molécula de água por molécula de monossacarídeo) seriam o produto desta hidrólise e seriam colocados em disponibilidade.

O aumento significativo ocorrido na relação MS/MF na folha (**FIGURA 21A**, pg. 107) e no pseudobulbo (**FIGURA 21B**, pg. 107) de plantas estressadas, seguidamente aos 25 e 45 dias, confirma a rápida desidratação verificada nestes órgãos. Uma menor quantidade de água determina um menor turgor e conseqüentemente o crescimento é reduzido.

A **FIGURA 18A-D**, pg. 103, mostra que a invertase ácida apresentou comportamento distinto na folha (**FIGURAS 18A e 18C**) e no pseudobulbo (**FIGURAS 18B e 18D**). Não há diferença estatística no nível de atividade da enzima entre a primeira amostragem e aquela realizada aos 25 dias de déficit hídrico, na folha, sendo que após 45 dias a atividade reduziu-se significativamente. No pseudobulbo, a redução no nível de atividade aconteceu já a partir da amostragem realizada após 25 dias em déficit hídrico. É possível que a manutenção da atividade desta enzima na folha até 25 dias de déficit hídrico tenha acontecido em função do fluxo de sacarose e de água vindos do pseudobulbo, sendo que a elevação nos níveis de sacarose na maioria das plantas sob déficit hídrico está freqüentemente associada a um ajustamento osmótico (Quick et al., 1989). Porém, é provável que através das reações de hidrólise dos glucomananos (**FIGURA 17A-D**, pg. 101), os monossacarídeos produzidos também seriam utilizados diretamente

nas reações celulares, principalmente na respiração. É sabido que o déficit hídrico associado à alta temperatura eleva a velocidade dos processos degradativos, especialmente de proteínas (Giardi et al., 1997). Esta adaptação supõe uma reposição muito rápida de materiais e, portanto, um elevado consumo energético. Dessa forma não haveria hidrólise das moléculas de sacarose, ocorrendo seu acúmulo na folha (**FIGURA 16A**, pg. 99) após 45 dias e no pseudobulbo (**FIGURA 16B**, pg. 99) após 25 dias.

A redução da relação F_v/F_m nas plantas estressadas foi significativa aos 25 e 45 dias de déficit hídrico (**FIGURA 19**, pg. 104). Os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* apontam para uma redução da capacidade fotossintética, devida principalmente à alterações no processo fotoquímico, como relatado por Zotz & Tyree (1996). Existem vários fatores que interferem com o crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo o déficit hídrico a razão mais comum de estresse na fotossíntese (Giardi et al., 1997). Outros fatores também devem estar interferindo no processo de incorporação fotossintética do CO_2 atmosférico. A **FIGURA 19**, pg. 104, por exemplo, pode estar indicando, a partir de 25 dias, um efeito deletério da temperatura, sendo que os danos térmicos no fotossistema II do esquema Z da fotossíntese causam aumento drástico no valor de F_0 e o valor de F_m diminui após a exposição das folhas às altas temperaturas, sem injúrias (Demmig-Adams et al., 1996).

Foi sugerido que a relação F_m/F_0 (**FIGURA 20**, pg. 105) é a que melhor representa a capacidade fotossintética nas folhas de plantas sob déficit hídrico, estando associada ao potencial osmótico (Jensen & Feige, 1991). Nas plantas estudadas esta relação foi estatisticamente inferior após 25 dias, nas folhas 1 e 3, não podendo ser analisada ao longo deste ensaio. Porém, é possível que após 45 dias sob déficit hídrico outros fatores também estejam interferindo no rendimento quântico, sendo tais fatores classificados como "extinção não fotoquímica" (Björkman & Demmig-Adams, 1994).

Esta orquídea não dispõe de mecanismos efetivos de proteção à seca, sendo que a rápida perda de água reduziu a eficiência quântica, provocando a hidrólise e mobilização das reservas de glucomananos para manter as atividades vitais da planta; os níveis reduzidos de AR e de glucomananos no pseudobulbo vêm confirmar este fato, indicando alta atividade respiratória e intensa hidrólise de glucomananos.

A orquídea epífita estudada não pode ser considerada uma orquídea nativa brasileira, mas existe grande possibilidade dela apresentar características fisiológicas e metabólicas semelhantes às daquelas das orquídeas nativas das províncias 1 e 2. Exibe o metabolismo do tipo CAM (**FIGURA 9**, pg. 85) e está adaptada a locais com alta umidade relativa e menor intensidade de luz, sendo o metabolismo do tipo CAM um processo fisiológico

que favorece um balanço positivo de carbono, com alto potencial hídrico, numa grande diversidade de ambientes (MEDINA, 1987).

Os dados obtidos neste trabalho permitem concluir que o pseudobulbo, através do conteúdo de suas reservas em carboidratos, visa atender aos processos anuais de brotação e formação das partes mais novas da planta. Da mesma maneira, essas reservas podem ser mobilizadas durante os períodos de estresse. Para a orquídea estudada, as substâncias selecionadas ao longo do período evolutivo foram os carboidratos solúveis em água, os glucomananos, pela ampla funcionalidade destes compostos. A folha constitui o sítio de mobilização e consumo, enquanto no pseudobulbo ocorre a biossíntese e o acúmulo destes carboidratos, originados a partir da sacarose fotossintetizada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, W.W. & OSMOND, C.B. 1988. Internal CO₂ supply during photosynthesis of sun and shade grown CAM plants in relation to photoinhibition. **Plant Physiol.** 86: 117-123.
- ANDO, T. & OGAWA, M. 1987. Photosynthesis of leaf blades in *Laelia anceps* Lindl. is influenced by irradiation of pseudobulb. **Photosynthetica** 21: 588-590.
- ARDITTI, J. & ERNST, R. 1984. Physiology of germinating orchid seeds. In: **Orchid Biology: Reviews and Perspectives**. Vol. 3. ARDITTI, J. (ed.). Cornell University Press, Ithaca, EUA. pp. 179-224
- ARDITTI, J. & FISCH, M.H. 1977. Anthocyanins of the Orchidaceae: Distribution, heredity, functions, synthesis and localization. In: **Orchid biology: reviews and perspectives**. Vol. 1. ARDITTI, J. (ed.). Cornell University Press, Ithaca, New York, EUA. pp. 117-155.
- AVIGAD, G. 1982. Plant Carbohydrates. In: **Encyclopedia of Plant Physiology**. Vol. 13A. LOEWUS, F.A. e TANNER, W. (eds.). Springer-Verlag, Berlim, Alemanha. pp. 217-347.
- AVIGAD, G. & DEY, P.M. 1997. Storage carbohydrates. In: **Plant Biochemistry**. DEY, P.M. e HARBORNE, J.B. (eds.). Academic Press, Londres, Inglaterra. pp. 143-204.

- BARROW, S.R. & COCKBURN, W. 1982. Effects of light quantity and quality on the decarboxylation of malic acid in Crassulacean acid metabolism photosynthesis. **Plant Physiol.** 69: 568-571.
- BENZING, D.H. 1984. Epiphytic vegetation: a profile and suggestions for future inquiries. In: **Physiological Ecology of Plants of the Wet Tropics**. MEDINA, E., MOONEY, H.A. & VÁSQUEZ-YANES, C. (eds.). W. Junk Publishers, New York, EUA. pp. 155-171.
- BENZING, D.H. 1990. **Vascular epiphytes, general biology and related biota**. Cambridge University Press, Cambridge, EUA. 353p.
- BENZING, D.H. & RENFROW, A. 1971. Significance of the patterns of CO₂ exchange to the ecology and phylogeny of the Tillandsioideae (Bromeliaceae). **Bull. Torrey Bot. Club** 98: 322-327.
- BENZING, D.H., BENT, A., MOSCOW, D., PETERSON, G. & RENFROW, A. 1982. Functional correlates of deciduousness in *Catasetum integerrimum* (Orchidaceae). **Selbyana** 7: 1-9.
- BJÖRKMAN, O. & DEMMIG, B. 1987. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origin. **Planta** 170: 489-504.
- BJÖRKMAN, O. & DEMMIG-ADAMS, B. 1994. Regulation of photosynthetic light energy capture, conversion, and dissipation in leaves of higher plants. In: **Ecophysiology of photosynthesis**. SCHULZE, E.D. & CALDWELL, M.M. (eds.). Springer-Verlag, Berlin, Alemanha. pp. 17-47.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein, utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254.

- BRAEM, G.J. 1984. **The Brazilian bifoliate Cattleyas**. Vol I. SCHMERSOW, K. (ed.) Bruck-Verlag, Hildesheim, Alemanha. 94p.
- BUCHALA, A.J., FRANZ, G. & MEIER, H. 1974. A glucomannan from the tubers of *Orchis morio*. **Phytochem.** 13: 163-166.
- BUTLER, W.L. & KITAJIMA, M. 1975. A tripartite model for chloroplast fluorescence. In: **Proceedings of the 3rd International Congress on Photosynthesis**. AVRON, M. (ed.), Elsevier, Amsterdam, Holanda. pp. 127-145.
- CARNAL, N.W. & BLACK, C.C. 1989. Soluble sugars as the carbohydrate reserve for CAM in pineapple leaves. **Plant Physiol.** 90: 91-100.
- CONN, E.E. & STUMPF, P.K. 1976. **Outlines of biochemistry**. John Wiley & Sons, Inc., New York, EUA. 525p.
- DEMMIG-ADAMS, B., ADAMS III, W.W., BARKER, D.H., LOGAN, B.A., BOWLING, D.R. & VERHOEVEN, A.S. 1996. Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. **Physiol. Plant.** 98: 253-264.
- DEY, P.M. 1978. Biochemistry of plant galactomannans. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.** 35: 341-373.
- DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. & SMITH, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.** 28: 350-356.
- ELBEIN, A.D. & HASSID, W.Z. 1966. The enzymatic synthesis of a glucomannan. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 23: 311-318.
- ERNST, R. & RODRIGUEZ, E. 1984. Carbohydrates of the Orchidaceae. In: **Orchid Biology - Reviews and Perspectives**. Vol. 3. Chapter 5. ARDITTI, J. (ed.). Comstock Publishing Associates, Ithaca, New York, EUA. pp. 223-260.

- ERTELT, J.B. 1992. Horticultural aspects of growing and displaying a wide variety of epiphytes . **Selbyana** 13: 95-98.
- FANFANI, A. & ROSSI, W. 1988. **Guide to Orchids**. SCHULER, S. (ed.). Arnoldo Mondadori Editore S.p.A., Milão, Itália. 255p.
- FAHRENDORF, T., HOLTUM, J.A.M., MUCKERJEE, U. & LATZKO, E. 1987. Fructose 2,6-biphosphate, carbohydrate partitioning, and Crassulacean acid metabolism. **Plant Physiol.** 84: 182-187.
- FRANZ, G. 1973. Biosynthesis of salep mannan. **Phytochem.** 12: 2369-2373.
- FRANZ, G. 1979. Metabolism of reserve polysaccharides in tubers of *Orchis morio* L. **Planta Med.** 36: 68-73.
- FRANZ, G. & MEIER, H. 1971. Bildung und Abbau des Schelimpolysaccharids (Salepmannan) von Orchideenknollen. **Planta Med.** 19: 326-332.
- FU, C.F. & HEW, C.S. 1982. Crassulacean acid metabolism in orchids under water stress. **Bot. Gaz.** 143: 294-297.
- GIARDI, M.T., MASOJÍDEK, J. & GODDE, D. 1997. Effects of abiotic stresses on the turnover of the D₁ reaction centre II protein. **Physiol. Plant.** 101: 635-642.
- GOH, C.J., AVADHANI, P.N., LOH, C.S., HANEGRAAF, C. & ARDITTI, J. 1977. Diurnal stomatal and acidity rhythms in orchid leaves. **New Phytol.** 78: 365-372.
- GOH, C.J. & KLUGE, M. 1989. Gas exchange and water relations in epiphytic orchids. In: **Vascular plants as epiphytes, Evolution and Ecophysiology**. LÜTTGE, U. (ed.), Springer-Verlag, Heidelberg, Alemanha. pp. 139-166.
- GOLDBERG, R. & ROLAND, J.C. 1971. Etude de l'utilisation des glucomannes au cours de la germination des graines d'*Asparagus officinalis*. **Rev. Gen. Bot.** 78: 75-102.

- GRIFFITHS, H., SMITH, J.A.C., LÜTTGE, U., POPP, M., CRAM, W.J., DIAZ, M., LEE, H.S.J., MEDINA, E., SCHÄFER, C. & STIMMEL, K. 1989. Ecophysiology of xerophytic and halophytic vegetation of a coastal alluvial plain in northern Venezuela. IV. *Tillandsia flexuosa* S.W. e *Schomburgkia humboldtiana* Reichb., epiphytic CAM plants. *New Phytol.* 111: 273-282.
- HALE, G.M. & ORCUTT, D.M. 1987. **The physiology of plants under stress.** John Wiley & Sons, Wiley-Interscience Publication, New York, EUA. 206p.
- HALL, D.O. & RAO, K.K. 1995. **Photosynthesis.** 5th edition. Cambridge University Press, New York. 211p.
- HARRISON, C.R. & ARDITTI, J. 1978. Physiological changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). *Bot. Gaz.* 139: 180-189.
- HAWKER, J.S. 1985. **Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants.** DEY, P.M. & DIXON, R.A. (eds.). Academic Press, Londres, Inglaterra. 495p.
- HEW, C.S. & MAH, T.C. 1989. Sugar uptake and invertase activity in *Dendrobium* tissues. *New Phytol* 111: 167-171.
- HEW, C.S., TING, S.K. & CHIA, T.K. 1988. Substrate utilization by *Dendrobium* tissues. *Bot. Gaz.* 149: 153-157.
- HEW, C.S. & YONG, J.W.H. 1994. Growth and photosynthesis of *Oncidium Goldiana*. *J. Hortic. Sci.* 69: 809-819.
- HILU, W.K. & RANDALL, 1984. Convenient method for studying grass leaf epidermis. *Taxon* 33: 413-415.
- HINSBERG, A. & TIENDEREN, P. 1997. Variation in growth form in relation to spectral light quality (red/far-red ratio) in *Plantago lanceolata* L. in sun and shade populations. *Oecologia* 111: 452-459.
- HO, L.C. & REES, A.R. 1976. Re-mobilization and redistribution of reserves in the tulip bulb in relation to new growth until anthesis. *New Phytol.* 76: 59-68.

- HO, L.C. & REES, A.R. 1977. The contribution of current photosynthesis to growth and development in the tulip during flowering. **New Phytol.** 78: 65-70.
- HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. 1950. The water culture method for growing plants without soil. **Cal. Agric. Exp. Sta., Circular n° 347.** California, EUA. 39p.
- HOLTJE, P.A., PATEL, A. & TING, I.P. 1992. The occurrence of CAM in *Peperomia*. **Selbyana** 13: 77-87.
- HOLTUM, R.E. 1955. Growth habits of monocotyledons: variations of a theme. **Phytomorphology** 5: 399-413.
- HSIAO, T.C. 1973. Plant responses to water stress. **Annu. Rev. Plant Physiol.** 24: 519-570.
- HUBER, S.C. 1989. Biochemical mechanism for regulation of sucrose accumulation in leaves during photosynthesis. **Plant Physiol.** 91: 656-662.
- JARVIS, M.C. & DUNCAN, H.J. 1974. Paper chromatography of plant sugars. **J. Chromatog.** 92: 454-456.
- JENSEN, M. & FEIGE, G.B. 1991. Quantum efficiency and chlorophyll fluorescence in the lichens *Hypogymnia physodes* e *Parmelia sulcata*. **Symbiosis** 11: 179-191.
- JONES, H.G. 1992. **Plants and microclimate: A quantitative approach to environmental plant physiology.** 2nd edition. Cambridge University Press, New York, EUA. 428p.
- JUERS, D.H., SWENSON, H.A. & KURATH, S.F. 1967. Configuration and hydrodynamic properties of fully acetylated salep glucomannan. **J. Polym. Sci.** 5: 361-375.
- KANABUS, J., BRESSAN, R.A. & CARPITA, N.C. 1986. Carbon assimilation in carrot cells in liquid culture. **Plant Physiol.** 82: 363-368.
- KEILLER, D.R., SLOCOMBE, S.P. & COCKBURN, W. 1994. Analysis of chlorophyll a fluorescence in C₃ and CAM forms of *Mesembryanthemum crystallinum*. **J. Exp. Bot.** 45: 325-334.

- KENYON, W.H., SCOTT-HOLADAY, A. & BLACK, C.C. 1981. Diurnal changes in metabolite levels and CAM in *Kalanchoe daigremontiana* leaves. **Plant Physiol.** 68: 1002-1007.
- KEUSCH, L. 1968. Die Mobilisierung des Reservemannans in keimenden Dattelsamen. **Planta** 78: 321-350.
- KLUGE, M. & TING, I.P. 1978. **Crassulacean Acid Metabolism. Analysis of an Ecological Adaptation.** KLUGE, M. & TING, I.P. (eds.). Springer-Verlag, Berlin, Alemanha. 268p.
- KNAUFT, R.L. & ARDITTI, J. 1969. Partial identification of dark $^{14}\text{CO}_2$ fixation products in leaves of *Cattleya* (Orchidaceae). **New Phytol.** 68: 657-661.
- KNUDSON, L. 1946. A new nutrient solution for germination of orchid seed. **Am. Orch. Soc. Bull.** 15: 214-217.
- LANGE, O.L. & MEDINA, E. 1979. Stomata of the CAM plant *Tillandsia recurvata* respond directly to humidity. **Oecologia** 40: 357-363.
- LEE, Y.K., CHIA, T.F., HEW, C.S. & LOH, C.S. 1987. Sugar uptake by *Aranda* orchid callus tissues. **Life Sciences Advances, Plant Physiol.** 6: 235-241.
- LEE, E.H. & FOY, C.D. 1986. Aluminum tolerances of two snapbean cultivars related to organic acid content evaluated by high performance liquid chromatography. **J. Plant Nutr.** 9: 1.481-1.498.
- LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L. & COX, M.M. 1993. **Principles of Biochemistry.** 2nd edition. Worth Publishers, New York, EUA. 1.013p.

- LENZ, L.W. & WIMBER, D.E. 1959. Hybridization and Inheritance in Orchids. In: **The Orchids, A scientific survey**. WITHNER, C.L. (ed.). John Wiley & Sons, Inc., New York, EUA. pp. 261-314.
- LÜNING, B. 1974. Alkaloids of the Orchidaceae. In: **The Orchids, Scientific studies**. WITHNER, C.L. (ed.). John Wiley & Sons, Ithaca, New York, EUA. pp. 349-382.
- LÜTTGE, U. 1987. Carbon dioxide and water demand: crassulacean acid metabolism (CAM), a versatile ecological adaptation exemplifying the need for integration in ecophysiological work. **New Phytol.** 106: 593-629.
- LÜTTGE, U. 1989. **Vascular plants as epiphytes, Evolution and Ecophysiology**. LÜTTGE, U. (ed.), Spring-Verlag, Heidelberg, Alemanha. 270p.
- MATHESON, N.K. 1990. Storage Carbohydrates. In: **Methods in Plant Biochemistry**. Vol. 2. DEY, P.M. & HARBORNE, J.B. (eds.). Academic Press, Londres, Inglaterra. pp. 371-413.
- MATSUO, T. & MIZUNO, T. 1974. Changes in amounts of two kinds of reserve glucose containing polysaccharides during germination of the easter lily bulb. **Plant Cell Physiol.** 15: 555-558.
- MCCLEARY, B.V. 1980. Hydrolysis of legume seed D-galactomannans by α -D-galactosidases and β -D-mannanases. In: **Mechanisms of Saccharide Polymerization and Depolymerization**. MARSHALL, J.J. (ed.). Academic Press, Londres, Inglaterra. pp. 285-300.
- MEDINA, E. 1984. On the temperature dependence of dark CO₂ fixation in CAM plants: acidity, growth and $\delta^{13}\text{C}$ values. In: **Physiological ecology of CAM plants**. MEDINA, E. (ed.). Ediciones IVIC-CIET, Caracas, Venezuela. pp. 52-72.
- MEDINA, E. 1987. Aspectos ecofisiológicos de plantas CAM en los trópicos. **Rev. Biol. Trop.** 35(supl. 1): 55-70.

- MEDINA, E., MONTES, G., CUEVAS, E. & ROKSANDIS, Z. 1987. Profiles of CO₂ concentrations and $\delta^{13}\text{C}$ values in tropical rainforests of the upper Rio Negro basin, Venezuela. **J. Trop. Ecol.** 2: 207-217.
- MEDINA, E., OLIVARES, E. & DIAZ, M. 1986. Water stress and light intensity effects on growth and nocturnal acid accumulation in a terrestrial CAM bromeliad (*Bromelia humilis*) under natural conditions. **Oecologia** 70: 441-446.
- MEDINA, E., OLIVARES, E., DIAZ, M. & van der MERWE, N. 1986. Metabolismo ácido de crassuláceas en bosques húmedos tropicales. In: **Anales del IV Congreso Latino Americano de Botánica**, Vol. V, Simposio: Ecofisiología. Medellín, Colombia. pp. 56-67.
- MEIER, H. & REID, J.S.G. 1982. Reserve polysaccharides other than starch in higher plants. In: **Plant Carbohydrates. Encyclopedia of Plant Physiology**. New Series, vol. 13A. LOEWUS, F.A. & TANNER, W. (eds.). Springer-Verlag, Berlin, Alemanha. pp. 418-471.
- MIRANDA, E.L.F.M. 1989. O gênero *Laelia*, Seção Cattleyoides, Taxonomia, Ecologia e Conservação. In: **Anais do IV Forum Regional de Orquídeas**. Sociedade Batataense de Orquidófilos, Batatais, SP. pp. 1-14.
- NONOGAKI, H., NOMAGUCHI, M. & MOROHASHI, Y. 1995. Endo- β -mannases in the endosperm of germinated tomato seeds. **Physiol. Plant.** 94: 328-334.
- NUERNBERGK, E.L. 1963. On the CO₂ metabolism of orchids and its ecological aspect. In: **Proceedings of 4th World Orchid Conference**. Straits Times Press, Singapura. pp. 158-169.

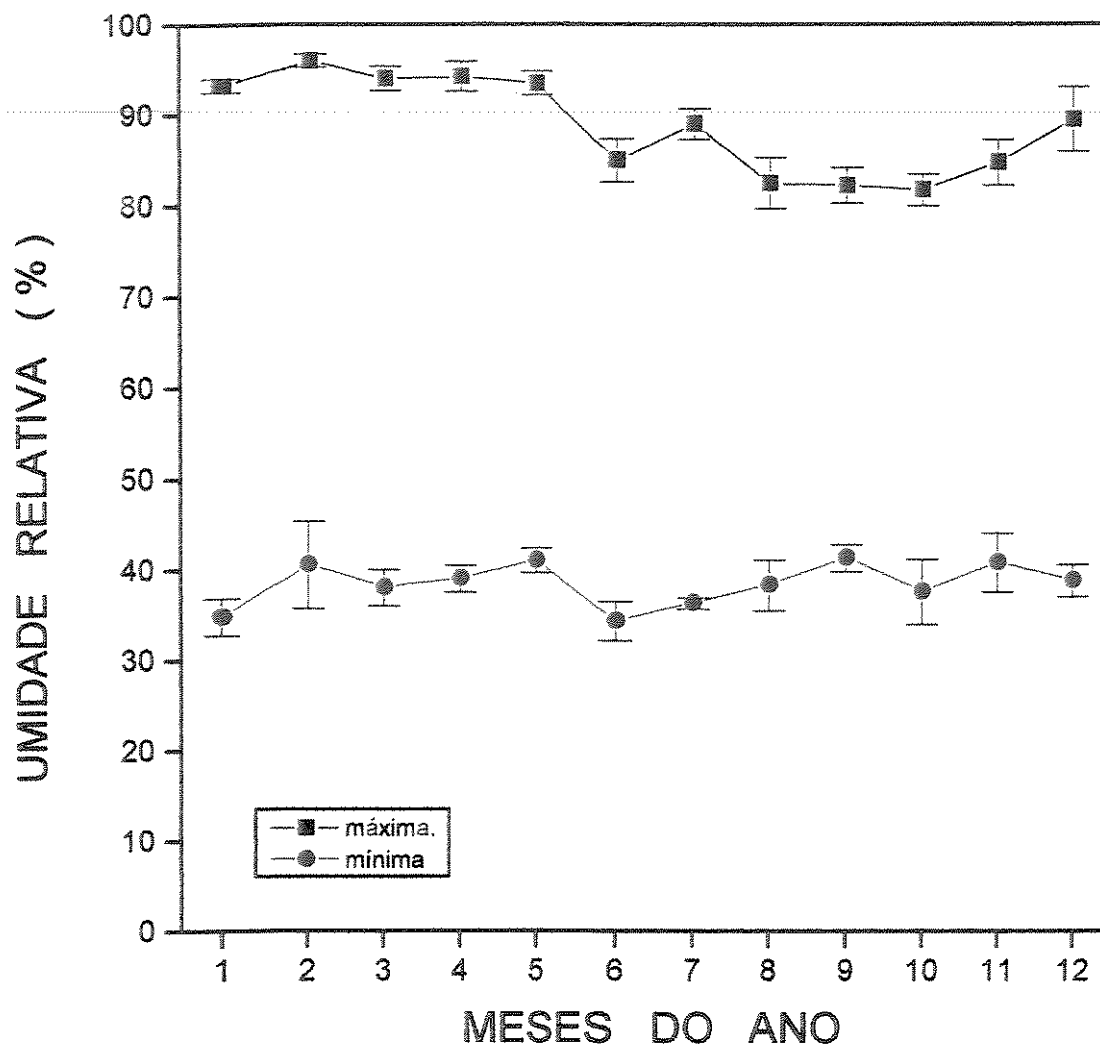
- OLIVEIRA, L.E.M. 1985. Comportamento fisiológico de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum sp*) sob condições de deficiência hídrica: Alterações da assimilação do nitrato e mobilização de açúcares. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, São Paulo, Brasil. Tese de Doutorado. 126p.
- OSMOND, C.B. 1978. Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 29: 379-414.
- PABST, G.F.J. & DUNGS, F. 1975. *Orchidaceae Brasilienses*. Band.1. Brücke-Verlag Kurt Schmiersow (ed.). Hildesheim, Alemanha. 408p.
- PARK, Y., CHOW, W.S. & ANDERSON, J.M. 1997. Antenna size dependency of photoinactivation of photosystem II in light-acclimated pea leaves. *Plant Physiol.* 115: 151-157.
- QUICK, W.P. & SCHAFFER, A.A. 1996. Sucrose metabolism in sources and sinks. In: *Photoassimilate Distribution in Plants and Crops, Source-Sink Relationships*. ZAMSKI, E. e SCHAFFER, (eds.). Academic Press, Londres, Inglaterra. pp. 115-156.
- QUICK, W.P., SIEGEL, G., NEUHAUS, E., FEIL, R. & STITT, M. 1989. Short-term water stress leads to a stimulation of sucrose synthesis by activating sucrose-phosphate synthase. *Planta* 177: 535-546.
- REID, J.S.G. 1985. Galactomannans. In: *Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants*. DEY, P.M. & DIXON, R.A. (eds.). Academic Press, Londres, Inglaterra. pp. 265-288.
- REID, J.S.G. & BEWLEY, J.D. 1980. A dual role for the endosperm and its galactomannan reserves in the germination physiology of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) and endospermic leguminous seed. *Planta* 147: 145-150.
- RENTOUL, J.N. 1987. The Cattleyas and other epiphytes. In: *Growing Orchids*. Timber Press, Portland, EUA. 218p.

- SALISBURY, F.B. & ROSS, C.W. 1991. **Plant Physiology**. 4th edition. Wadsworth Publishing Company, Belmont, EUA. 687p.
- SCHÄFER, C. & LÜTTGE, U. 1987. Water translocation in *Kalanchoë daigremontiana* during periods of drought. **Plant Cell Environ.** 10: 761-766.
- SCHREIBER, U., SCHLIWA, U. & BILGER, W. 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. **Photosynthesis Res.** 10: 51-62.
- SHUSHAN, S. 1959. Developmental anatomy of an orchid, *Cattleya x Trimos*. In: **The Orchids, A scientific survey**. WITHNER, C.L. (ed.). John Wiley & Sons, Inc., New York, EUA. pp. 45-72.
- SINCLAIR, R. 1983a. Water relations of tropical epiphytes: I. relationships between stomatal resistance, relative water content and the components of water potential. **J. Exp. Bot.** 34: 1652-1663.
- SINCLAIR, R. 1983b. Water relations of tropical epiphytes: II. performance during droughting. **J. Exp. Bot.** 34: 1664-1675.
- SINCLAIR, R. 1984. Water relations of tropical epiphytes: III. evidence for crassulacean acid metabolism. **J. Exp. Bot.** 35: 1-7.
- SLAYTOR, M.B. 1977. Phytochemistry, The distribution and chemistry of alkaloids in the Orchidaceae. In: **Orchid Biology: reviews and perspectives**. Vol. 1. ARDITTI, J. (ed.). Cornell University Press, Ithaca, New York, EUA. pp. 95-115.
- SMITH, J.A.C. & LÜTTGE, U. 1985. Day-night changes in leaf water relations associated with the rhythm of crassulacean acid metabolism in *Kalanchoë daigremontiana*. **Planta** 163: 272-282.
- SOMOGYI, M. 1952. Notes on sugar determination. **J. Biol. Chem.** 195: 19-23.

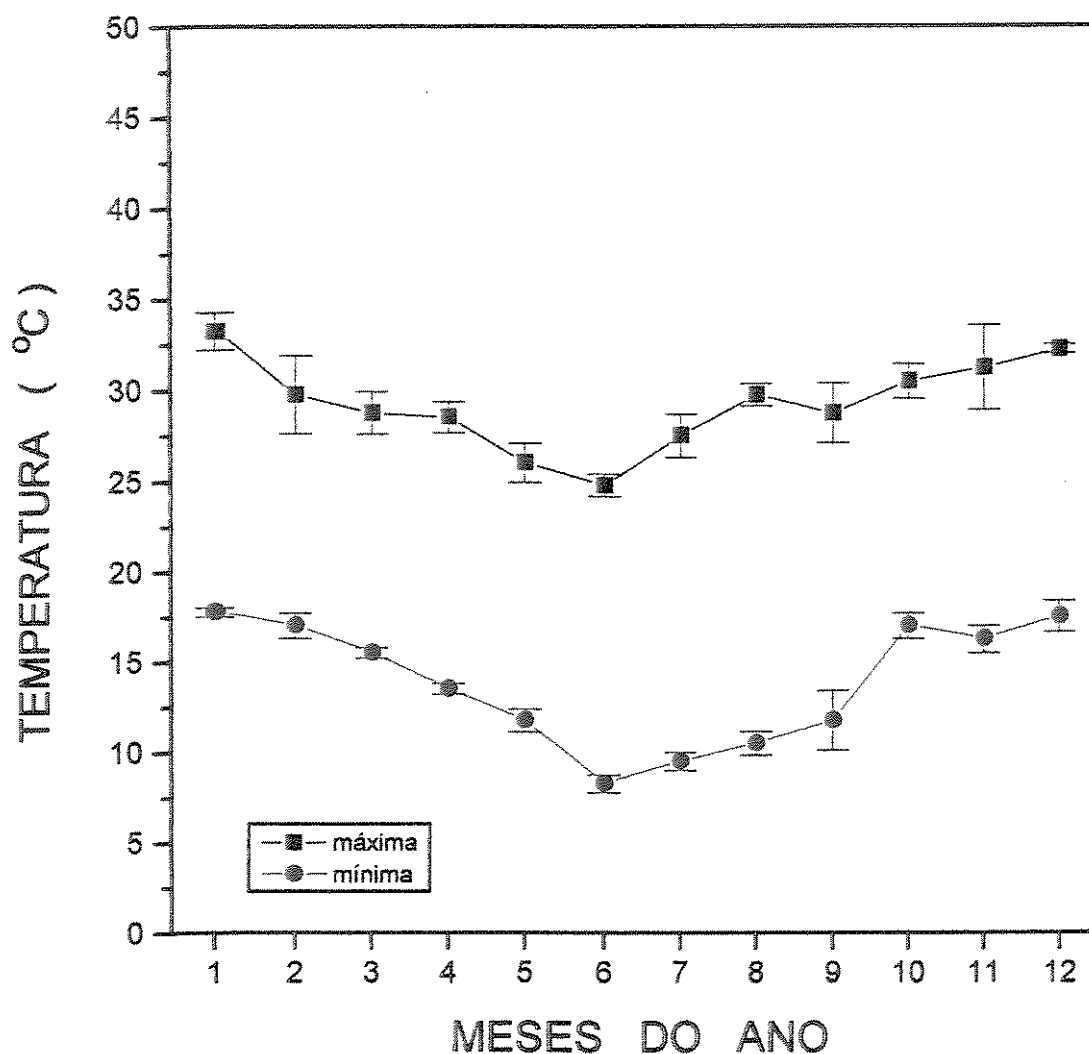
- STERN, W.L. & MORRIS, M.W. 1992. Vegetative anatomy of *Stanhopea* (Orchidaceae) with special reference to pseudobulb water-storage cells. *Lindleyana* 7: 34-53.
- STERNBERG, L.S.L. 1986. Aspectos fotosinteticos e isotopicos de epifitas y hemiepifitas. In: **Anales del IV Congreso Latinoamericano de Botánica**, Vol. V, Simposio: Ecofisiologia. Medellín, Colombia. pp. 50-55.
- SUTTLEWORTH, F.S., ZIM, H.S., DILLON, G.W. & SMITH, E.W. 1970. **Orchids**. HUBER, G. (ed.). Western Publishing Company, Inc., São Francisco, EUA. 161p.
- SUTTON, B.G., TING, I.P. & SUTTON, R. 1981. Carbohydrate metabolism of cactus in a desert environment. **Plant Physiol.** 68: 784-787.
- SUTTON, B.G. 1975. The path of carbon in CAM plants at night. **Aust. J. Plant Physiol.** 2: 377-387.
- THORPE, T.A. & MEIER D.D. 1973. Sucrose metabolism during tobacco callus growth. **Phytochemistry** 12: 493-497.
- TING, I.P. & DUGGER, W.M. 1965. Separation and detection of organic acids on silica gel. **Anal. Biochem.** 12: 571-578.
- TOMODA, M. & KIMURA, S. 1976. Plant mucilages, fourteen oligosaccharides obtained from *Bletilla*-glucomannan by partial acetolysis. **Chem. Pharm. Bull.** 24: 1807-1812.
- TOMODA, M., NAKATSUKA, S., TAMAI, M. & NAGAT, M. 1973. Plant mucilages: Isolation and characterization of a mucous polysaccharide "Bletilla-glucomannan", from *Bletilla striata* tubers. **Chem. Pharm. Bull.** 21: 2.667-2.671.
- TREVELYAN, W.E., PROCTER, D.P. & HARRISON, J.S. 1950. Determination of sugars on paper chromatography. **Nature** 166: 444-445.
- TURNER, N.C. 1979. Drought resistance and adaptation to water deficits in crop plants. In: **Stress Physiology in Crop Plants**. MUSSELL, H. e STAPLES, R.C. (eds.). Wiley-Interscience, New York, EUA. 445p.

- VAN HANDEL, E. 1968. Direct microdetermination of sucrose. *Anal. Biochem.* 22: 280-283.
- VIRGONA, J.M. & BARLOW, E.W.R. 1991. Drought stress induces changes in the non-structural carbohydrate composition of wheat stems. *Aust. J. Plant Physiol.* 18: 239-247.
- WATSON, B.T. & WARDLAW, I.F. 1981. Metabolism and export of ^{14}C -labelled photosynthate from water-stressed leaves. *Aust. J. Plant Physiol.* 8: 143-153.
- WILLIAMS, J.H.H., WINTERS, A.L. & FARRAR, J.F. 1992. **Molecular Biochemical and Physiological Aspects of Plant Respiration.** LAMBERS, H. & VAN der PLAS (eds.). Academic Press, New York, EUA. 428p.
- WINTER, K., WALLACE, B.J., STOCKER, G.C. & ROKSANDIC, Z. 1983. Crassulacean acid metabolism in Australian vascular epiphytes and some related species. *Oecologia* 57: 129-141.
- WINTER, K., OSMOND, C.B. & HUBICK, K.T. 1986. Crassulacean acid metabolism in the shade. Studies on an epiphytic fern, *Pyrrosia longifolia*, and other rainforest species from Australia. *Oecologia* 68: 224-230.
- WINTER, K. & GADEMANN, R. 1991. Daily changes in CO_2 and water vapour exchange, chlorophyll fluorescence and leaf water relations in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* during the induction of Crassulacean acid metabolism in response to high salinity. *Plant Physiol.* 95: 768-776.
- WITHNER, C.L. 1959. **The Orchids, A scientific survey.** WITHNER, C.L. (ed.). John Wiley & Sons, Inc., New York, EUA. 648p.
- WITHNER, C.L. 1988. The *Cattleyas*. In: **The Cattleyas and their relatives.** Vol I. WITHNER, C.L. (ed.). Timber Press, Portland, EUA. 147p.
- WITHNER, C.L. 1990. The *Laelias*. In: **The Cattleyas and their relatives.** Vol II. WITHNER, C.L. (ed.). Timber Press, Portland, EUA. 154p.

- ZHENG, X.N., WEN, Z.Q., PAN, R.C. & HEW, C.S. 1992. Response of *Cymbidium sinense* to drought stress. **J. Hort. Sci.** 67: 295-299.
- ZIMMERMAN, J.K. 1990. Role of pseudobulbs in growth and flowering of *Catasetum viridiflavum* (Orchidaceae). **Am. J. Bot.** 77: 533-542.
- ZIMMERMAN, J.K. & WHIGHAM, D.F. 1992. Ecological functions of carbohydrates stored in corms of *Tipularia discolor* (Orchidaceae). **Func. Ecol.** 6: 575-581.
- ZOTZ, G. & TYRRE, M.T. 1996. Water stress in the epiphytic orchid, *Dimerandra emarginata* (G. Meyer) Hoehne. **Oecologia** 07: 151-159.



APÊNDICE 1. Umidade relativa em casa de vegetação no Depto. de Fisiologia Vegetal, IB, **UNICAMP**, durante a realização dos experimentos com o híbrido *C. forbesii* X *L. tenebrosa*. Os dados correspondem às médias mensais nos meses de janeiro (1) a dezembro (12) de 1994, 1995 e 1996.



APÊNDICE 2. Temperatura ambiente em casa de vegetação no Depto. de Fisiologia Vegetal, IB, **UNICAMP**, durante a realização dos experimentos com o híbrido *C. forbesii* X *L. tenebrosa*. Os dados correspondem às médias mensais nos meses de janeiro (1) a dezembro (12) de 1994, 1995 e 1996.