



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Curso de Graduação em Ciências Biológicas

**EFEITO DO ESTRESSE HÍDRICO SOBRE A EXPRESSÃO DO METABOLISMO
ÁCIDO DAS CRASSULACEAE (CAM) EM PLÂNTULAS DE *Cattleya walkeriana***

STHÉFANI FONSECA SILVA

Uberlândia - MG
2026



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Curso de Graduação em Ciências Biológicas

STHÉFANI FONSECA SILVA

**EFEITO DO ESTRESSE HÍDRICO SOBRE A EXPRESSÃO DO METABOLISMO
ÁCIDO DAS CRASSULACEAE (CAM) EM PLÂNTULAS DE *Cattleya walkeriana***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
coordenação do Curso de Graduação em
Ciências Biológicas como requisito obrigatório
para obtenção do título de bacharel em
Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ana Silvia Franco
Pinheiro Moreira

Uberlândia - MG
2026

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a confiança e o apoio da minha professora orientadora, Ana Silvia, não apenas nos ensinamentos em técnicas de pesquisa, mas também por fazer do Laboratório de Fisiologia Vegetal (LAFIVE), da Universidade Federal de Uberlândia, um lugar confortável de se estar.

Agradeço à Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração (CBMM) pela doação das plântulas de *Cattleya walkeriana* micropropagadas para a realização deste Trabalho de Conclusão de Curso e para outras pesquisas com viés de conservação.

Agradeço à FAPEMIG e ao CNPq por financiarem os projetos de pesquisa em vigência no LAFIVE, permitindo a realização deste trabalho.

Gostaria de agradecer também à Maria Eduarda por me ajudar em todos os processos deste trabalho e pela paciência durante as noites e madrugadas que passamos subindo e descendo as escadas do bloco 6Z para buscar orquídeas.

Sou grata aos orientandos do LAFIVE que me estenderam a mão durante essa jornada.

Agradeço à Cecília por insistir para que eu conhecesse o LAFIVE — sem ela, nada disso teria acontecido.

Sou grata ao Lazin (Lázaro Antônio) por compreender e apoiar minhas ausências enquanto estive realizando os experimentos deste trabalho e por sempre querer que eu vá mais longe.

Agradeço às vidrarias do laboratório (inclusive as que eu quebrei) por dividirem momentos de entusiasmo e empolgação, nos quais eu me recordava de quando era criança e acreditava ser impossível me tornar cientista.

Sou extremamente grata a todos que perguntaram sobre minha pesquisa e me ouviram falar sobre plantas por horas; foram essas pessoas que viram o brilho nos meus olhos e me fizeram ter certeza de que eu estava fazendo a coisa certa.

Acima de tudo, agradeço aos meus pais, que foram o “chão” quando precisei de apoio e o “horizonte” quando precisei sonhar. A base, o cuidado e o incentivo que sustentaram cada passo até aqui. Sem eles, nada seria possível.

RESUMO

O metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) é uma via fotossintética associada à maior eficiência no uso da água, sendo frequente em plantas adaptadas a ambientes com limitação hídrica, como muitas orquídeas epífitas. Em algumas espécies, essa via pode se manifestar de forma facultativa, sendo induzida por condições ambientais adversas, como o déficit hídrico. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do estresse hídrico sobre a expressão do metabolismo CAM em plântulas de *Cattleya walkeriana* obtidas por cultivo *in vitro*, bem como analisar suas respostas fisiológicas durante o processo de aclimação. As plântulas cultivadas *in vitro* foram transferidas para tubos de ensaio contendo *Sphagnum* como substrato e aclimatadas durante 30 dias. Após esse período, foram submetidas, por mais 30 dias, a diferentes níveis de estresse hídrico induzidos por polietilenoglicol 6000 (PEG 6000). Foram avaliados parâmetros fisiológicos relacionados ao desempenho fotoquímico (F_v/F_m , $\Phi PSII$, Rfd e NPQ), ao balanço hídrico (conteúdo relativo de água – CRA e conteúdo de saturação hídrica – CSH), ao potencial hídrico foliar (Ψ) e à expressão do metabolismo CAM (acidez titulável foliar). Os resultados mostraram que o estresse hídrico imposto não promoveu aumento significativo da acidez titulável foliar, indicando que, nas condições experimentais avaliadas, não houve indução ou intensificação da expressão do metabolismo CAM em plântulas aclimatadas de *C. walkeriana*. Em relação aos parâmetros fotoquímicos, não foram observadas diferenças significativas para F_v/F_m e $\Phi PSII$ entre os tratamentos, sugerindo manutenção da funcionalidade do fotossistema II. Por outro lado, alterações nos valores de Rfd e NPQ indicaram a ocorrência de ajustes fisiológicos associados à resposta ao estresse, com ativação de mecanismos fotoprotetores. Os parâmetros de balanço hídrico e potencial hídrico indicaram manutenção do estado hídrico das plântulas, mesmo sob as condições de déficit impostas. Adicionalmente, as plântulas cultivadas *in vitro* apresentaram maior acúmulo de ácidos orgânicos tituláveis em comparação às aclimatadas, evidenciando diferenças fisiológicas entre as condições de cultivo. Conclui-se que o estresse hídrico aplicado não foi suficiente para induzir a expressão do metabolismo CAM em plântulas de *C. walkeriana*, embora tenha promovido respostas fisiológicas associadas à fotoproteção e à manutenção do estado hídrico. Esses resultados contribuem para o entendimento da fisiologia de orquídeas epífitas e fornecem informações relevantes para estratégias de aclimação, manejo e conservação de plântulas micropropagadas.

Palavras-chave: Estresse hídrico; aclimação; orquídeas; *in vitro*, ecofisiologia vegetal.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	5
MATERIAL E MÉTODOS	7
Delineamento experimental.....	7
Avaliação do balanço hídrico.....	9
Avaliação da expressão do metabolismo CAM.....	9
Avaliação da fluorescência da clorofila <i>a</i>.....	10
Análise Estatística.....	10
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11
Avaliação do balanço hídrico.....	11
Avaliação da fluorescência da clorofila <i>a</i>.....	13
Avaliação da expressão do metabolismo CAM.....	15
CONCLUSÃO:.....	17
REFERÊNCIAS:.....	17

INTRODUÇÃO

O Metabolismo Ácido das Crassuláceas (CAM) refere-se a uma via fotossintética que permite às plantas fixarem o carbono atmosférico durante a noite, reduzindo significativamente a perda de água por transpiração ao longo do dia. Essa via metabólica é comumente encontrada em plantas epífitas ou que crescem em zonas áridas (GILMAN; EDWARDS, 2020). O metabolismo CAM pode ser subdividido em quatro fases: na fase I (noite), os estômatos permanecem abertos e o CO₂ é fixado pela PEP-carboxilase, formando ácidos orgânicos que são armazenados nos vacúolos; na fase II (amanhecer) ocorre uma transição, com parte do CO₂ fixado diretamente pela RuBisCO enquanto outra parte continua sendo fixada pela PEPCase; durante a fase III (dia), os estômatos permanecem fechados e o CO₂ liberado dos ácidos armazenados é utilizado no ciclo de Calvin; e, na fase IV (fim da tarde), há reabertura parcial dos estômatos, iniciando a fixação de CO₂ para o ciclo noturno seguinte (LÜTTGE, 2004). Essa separação temporal entre a fixação de carbono e o Ciclo de Calvin permite que as plantas mantenham atividade fotossintética diurna com mínima perda de água, otimizando o uso dos recursos hídricos e conferindo vantagem adaptativa em ambientes com disponibilidade irregular de água (HERRERA, 2008).

Entretanto, sabe-se que este metabolismo nem sempre se expressa nestas quatro fases de forma clara; ele é altamente plástico e pode variar conforme alterações ambientais. Algumas espécies apresentam o metabolismo CAM facultativo, um fisionótipo caracterizado pela indução da via CAM por diferentes estresses ambientais, como a seca. Em geral, a mudança da expressão da via C₃ para CAM ou o aumento da expressão CAM são acompanhados pelo aumento na eficiência do uso da água, contribuindo para sua sobrevivência em ambientes desfavoráveis (HERRERA, 2008). Diversas orquídeas epífitas brasileiras apresentam características compatíveis com o metabolismo CAM facultativo, especialmente em resposta a ambientes com alta luminosidade e limitação hídrica (STANCATO; MAZZAFERA; BUCKERIDGE, 2002).

A seca é um dos principais estresses abióticos que afetam o crescimento e a produtividade das plantas. Entre as complexas respostas fisiológicas observadas, estão o fechamento estomático, a redução da assimilação de CO₂ e a diminuição do desempenho fotossintético, o que compromete o balanço energético celular (CARVALHO et al., 2008). Essas alterações podem ser monitoradas pela fluorescência da clorofila *a*, uma técnica não destrutiva e sensível às alterações no fotossistema II, amplamente utilizada para detecção de estresse hídrico (BANKS, 2018; ZHANG et al., 2021). Sob condições de déficit hídrico, a redução da

disponibilidade de CO₂ devido ao fechamento estomático pode levar ao excesso de energia excitada nos centros de reação do fotossistema II. Esse desequilíbrio favorece a ocorrência de fotoinibição, caracterizada pela redução da eficiência fotoquímica, frequentemente evidenciada por menores valores de Fv/Fm e da eficiência quântica efetiva do PSII (Φ PSII). Dessa forma, a diminuição desses parâmetros indica limitações no uso da energia luminosa e um comprometimento funcional do aparato fotossintético em plantas submetidas ao estresse hídrico (BAKER, 2008; MAXWELL; JOHNSON, 2000).

Essas respostas fisiológicas ao déficit hídrico são particularmente relevantes em plantas epífitas, que frequentemente enfrentam oscilações na disponibilidade de água em seus ambientes naturais. Entre essas plantas, muitas espécies de orquídeas apresentam adaptações morfofisiológicas associadas à conservação hídrica, incluindo, em alguns casos, a expressão do metabolismo ácido das crassuláceas (CAM), o que reforça seu interesse em estudos voltados à tolerância ao estresse hídrico e ao desempenho fotossintético (LÜTTGE, 2004; HERRERA, 2009; ZOTZ; WINKLER, 2013).

Cattleya walkeriana Gardner é uma orquídea epífita, nativa e endêmica do Brasil, com ocorrência predominante no bioma Cerrado, embora também possa ser encontrada em regiões de Mata Atlântica e da Amazônia (FLORA E FUNGA DO BRASIL, 2025). Devido seu alto valor ornamental, *C. walkeriana* é amplamente explorada e sofre com a pressão do crescimento urbano sobre suas áreas naturais, o que tem contribuído para a redução significativa de suas populações. É considerada como uma espécie “Vulnerável” (VU) conforme classificação quanto ao risco de extinção (MARTINELLI; MORAES, 2013). Neste contexto, a propagação *in vitro* aparece como uma alternativa para a produção de mudas e contribuição para a exploração sustentável e a conservação da espécie. Entretanto, durante a micropropagação, as plantas são cultivadas em condições artificiais que diferem do ambiente natural, exigindo ajustes fisiológicos, anatômicos e metabólicos para garantir o sucesso da propagação. Em plantas cultivadas *in vitro*, a alta umidade, baixa luminosidade e a nutrição heterotrófica podem resultar em anomalias estruturais, como estômatos disfuncionais e tecidos pouco desenvolvidos. A fase de aclimação pós-cultura é, então, essencial, pois permite que as plantas restabeleçam gradualmente sua funcionalidade fisiológica e se adaptem às condições externas (ISAH, 2015).

Considerando que *C. walkeriana* habita regiões sazonalmente secas do Cerrado, é possível que também apresente a via CAM como estratégia fisiológica de sobrevivência neste ambiente. Embora ainda não existam estudos específicos que confirmem essa via para a espécie, outros estudos indicam a expressão da via CAM para espécies congêneras, como *Cattleya guttata*

Lindl. e *Cattleya forbesii* Lindl (LIMA et al., 2022). Entretanto, a alta umidade, a baixa luminosidade e a nutrição heterotrófica podem não induzir a expressão CAM, o que imporia maior dificuldade ao processo de aclimação visando a reintrodução das plântulas. Compreender em que condições de estresse hídrico o metabolismo CAM pode ser ativado pode contribuir para estratégias de aclimação das plântulas obtidas *in vitro*. Diante disso, parte-se da hipótese de que o estresse hídrico seja capaz de induzir ou intensificar a expressão de respostas fisiológicas associadas ao metabolismo CAM em plântulas de *Cattleya walkeriana*, especialmente após a fase de aclimação, em que as plantas passam a enfrentar condições ambientais mais variáveis em relação ao cultivo *in vitro*. Para avaliar o estresse hídrico nas plântulas de *C. walkeriana*, o conteúdo relativo de água e a fluorescência da clorofila *a* foram avaliados em plantas *in vitro* e cultivadas em diferentes potenciais hídricos.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental

Plântulas de *C. walkeriana* cultivadas *in vitro* por um ano foram utilizadas nos experimentos. Elas foram produzidas pela empresa Ayelttac de acordo com o protocolo estabelecido por Galdiano *et al.* (2014) e doadas pela Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração para a realização de experimentos visando sua reintrodução e conservação. As plantas foram retiradas dos frascos, lavadas em água destilada e dispostas em tubos de ensaio de 40 ml, utilizando como substrato *Sphagnum* (Figura 1). Dez plantas retiradas diretamente dos frascos foram lavadas e submetidas imediatamente às análises fisiológicas. Posteriormente, 150 plantas foram removidas dos frascos e aclimatadas por 30 dias em condições de luz ($\sim 3,98 \text{ mol m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 horas) e temperatura ($\sim 25^\circ\text{C}$) controladas, no Laboratório de Anatomia, Desenvolvimento Vegetal e Interações (LADEVI), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Durante este período, todas as plântulas foram irrigadas a cada dois dias, em regime de dias alternados, até alcançar a capacidade de campo do substrato. Após os 30 dias, 30 plântulas foram utilizadas para avaliações no tempo inicial (plantas aclimatadas) e as demais foram submetidas a cada um dos tratamentos (30 plântulas em cada), sendo novamente avaliadas após 30 dias de experimento. As plântulas foram avaliadas quanto à expressão do metabolismo CAM, o conteúdo relativo de água (CRA), o conteúdo de saturação hídrica, o potencial hídrico foliar e a atividade fotoquímica das folhas (fluorescência da clorofila *a*).

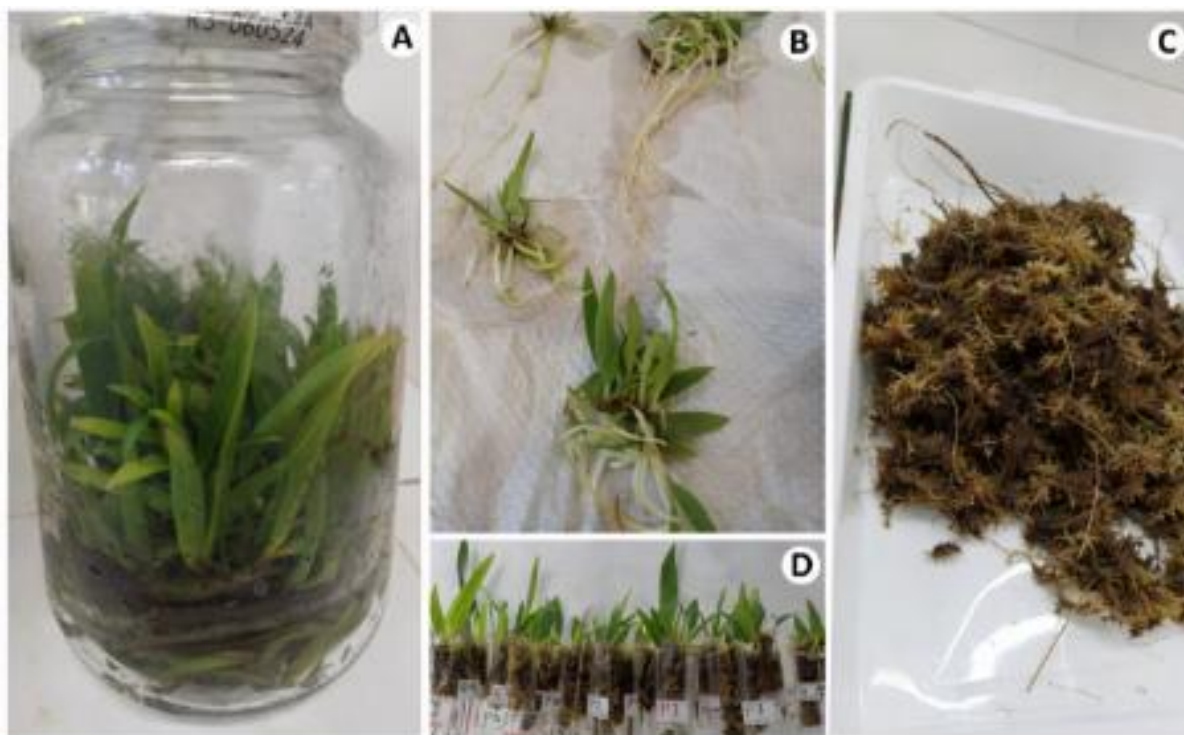


Figura 1: Transição das plântulas de *Cattleya walkeriana* do cultivo *in vitro* para a fase de aclimação. **(A)** Plântulas cultivadas *in vitro* em frasco de cultivo; **(B)** plântulas de *C. walkeriana* após remoção do meio de cultura e lavagem do sistema radicular; **(C)** substrato de *Sphagnum* utilizado no processo de aclimação; **(D)** plântulas transplantadas para tubos de ensaio contendo substrato de *Sphagnum*.

O estresse hídrico das plântulas de *C. walkeriana*, foi induzido por meio da adição de diferentes concentrações de Polietilenoglicol 6000 (PEG 6000) em soluções, considerando quatro tratamentos distintos. O PEG 6000 é um agente osmótico de alto peso molecular que reduz o potencial hídrico da solução, dificultando a absorção de água pelas plantas sem ser facilmente absorvido pelos tecidos vegetais. Dessa forma, sua utilização permite simular condições de déficit hídrico de maneira controlada, sem provocar toxicidade direta às plântulas. As soluções foram aplicadas com o auxílio de pipetas de Pasteur, até atingir a capacidade de campo do substrato. A concentração de (A) foi tida como tratamento controle, sendo mantida a irrigação a cada dois dias com água destilada. As concentrações de PEG 6000 foram baseadas nos experimentos de Villela *et al.* (1991) e Michael & Kaufmann (1973) e foram preparadas para simular diferentes potenciais hídricos (Ψ_s), sendo a solução (B) com Ψ_s de -0,03 MPa, a solução (C) com Ψ_s de -0,06 MPa e a solução (D) com Ψ_s de -1,00 MPa, conforme indicado na Tabela 1.

Tabela 1 - Concentração de PEG 6000 para os diferentes tratamentos

Solução	Ψ_s (MPa)	g/100 ml
A	0	0
B	-0,03	151,402
C	-0,06	223,664
D	-1,0	295,713

Avaliação do balanço hídrico

O potencial hídrico foliar (Ψ_w) foi determinado com auxílio de uma bomba de Scholander (Soilmoisture, Estados Unidos). Dez folhas das plântulas de *C. walkeriana in vitro* e controle foram colocadas individualmente na câmara de pressão. As plântulas submetidas ao estresse hídrico (Soluções B, C e D) perderam parte de suas folhas e não puderam ter este parâmetro avaliado. A pressão exercida na folha sem que ela se parta e capaz de inverter o fluxo no xilema foi utilizada para determinar o potencial hídrico foliar.

O conteúdo relativo de água (CRA) foi calculado para avaliar a quantidade de água nas folhas nos diferentes tratamentos (*in vitro*, aclimatadas, e com solução A, B, C e D de PEG 6000). O conteúdo relativo de água: $CRA = (MF - MS) / (MT - MF) * 100$ foi obtido utilizando uma folha de cada indivíduo (n=10) imediatamente pesada em balança analítica (Shimadzu, Japão) para obtenção da massa fresca (MF). Posteriormente, foi colocada em água destilada por 24 horas para obtenção da massa túrgida (MT). Para obtenção da massa seca (MS), as folhas foram secas em estufa a 60°C por 48 horas ou até atingirem peso constante (TURNER, 1981). O conteúdo de saturação hídrica (CSH) foi determinado a partir da fórmula $CSH = (MT - MS) / MS$ conforme Ogburn & Edwards (2012).

Avaliação da expressão do metabolismo CAM

A expressão do metabolismo (CAM) foi avaliada pela variação diurna dos ácidos orgânicos em plântulas de todos os tratamentos (*in vitro*, controle e condições de estresse hídrico). A variação diurna dos ácidos orgânicos foi determinada através da titulação dos ácidos orgânicos no período da manhã (6 horas) e no período noturno (18 horas). Foram pesados aproximadamente 0,200 g de folhas frescas (n=10), que foram transferidos para um tubo de ensaio. Em seguida, foram adicionados 5 ml de água deionizada previamente fervida, e o tubo

foi colocado em banho-maria a 100 °C por cerca de cinco minutos. Após esse período, o material foi deixado em repouso até atingir a temperatura ambiente. Em seguida, foram pipetados 2,5 ml da solução resultante da fervura do material e transferidos para um Erlenmeyer de 50 ml. Foi adicionada uma gota de fenolftaleína em cada frasco e, posteriormente, a titulação foi realizada com a solução de NaOH 0,01 N. O ponto de viragem foi identificado pela mudança de coloração para magenta, momento em que o volume gasto foi registrado.

Avaliação da fluorescência da clorofila *a*

Para acompanhar o estresse ocasionado pelos diferentes tratamentos (*in vitro*, aclimatadas, e com solução A, B, C e D de PEG 6000), foi avaliada a fluorescência da clorofila *a* no fotossistema II (PSII) nas folhas de 6 indivíduos (LICHTENTHALER & MIEHÉ 1997). Foi utilizado um fluorímetro por imagem (Handy Flour-Cam - PSI (Photon Systems Instruments), acoplado ao software FluorCam 7.0, através do protocolo “Quenching”, considerando os parâmetros: rendimento quântico máximo do fotossistema II (PSII) (Fv/Fm) (OXBOROUGH 2004), eficiência quântica do PSII adaptado à luz (Φ PSII) (Genty *et al.* 1989), a razão de declínio da fluorescência (Rfd) como um parâmetro empírico para acessar a vitalidade da planta (LICHTENTHALER & MIEHÉ 1997) e o rendimento não fotoquímico (NPQ).

Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando os softwares JMP versão 5, R (versão 4.5.2) e GraphPad Prism 8. Inicialmente, os conjuntos de dados foram avaliados quanto à distribuição de normalidade por meio do ajuste à distribuição normal. Valores de *p* superiores a 0,05 indicaram distribuição normal dos dados. Quando os pressupostos de normalidade foram atendidos, as diferenças entre os tratamentos foram analisadas por análise de variância (ANOVA). Em casos em que a ANOVA indicou diferenças significativas ($p \leq 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Para os dados que não atenderam aos pressupostos de normalidade ($p \leq 0,05$), foram utilizados testes não paramétricos (Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn (Bonferroni)), considerando o tratamento como variável categórica. Nesses casos, as diferenças entre os grupos foram avaliadas por meio de testes baseados em estatística do tipo qui-quadrado. Quando a comparação envolveu apenas dois tratamentos, foi utilizado o teste *t* de Student. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas para valores de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação do balanço hídrico

O conteúdo relativo de água (CRA) apresentou diferença significativa entre os tratamentos, permanecendo similar entre as plântulas *in vitro*, aclimatadas e controles. Quando submetidas aos diferentes níveis de estresse hídrico, observou-se redução significativa do CRA, indicando que o déficit hídrico afetou diretamente o estado hídrico das folhas (Figura 2). A redução nos valores de CRA nas folhas sob estresse confirma a eficiência do protocolo de indução hídrica por PEG 6000, uma vez que a diminuição do potencial hídrico resulta na menor absorção de água pelos tecidos foliares, conforme descrito por Michel & Kaufmann (1973) e Villela *et al.* (1991).

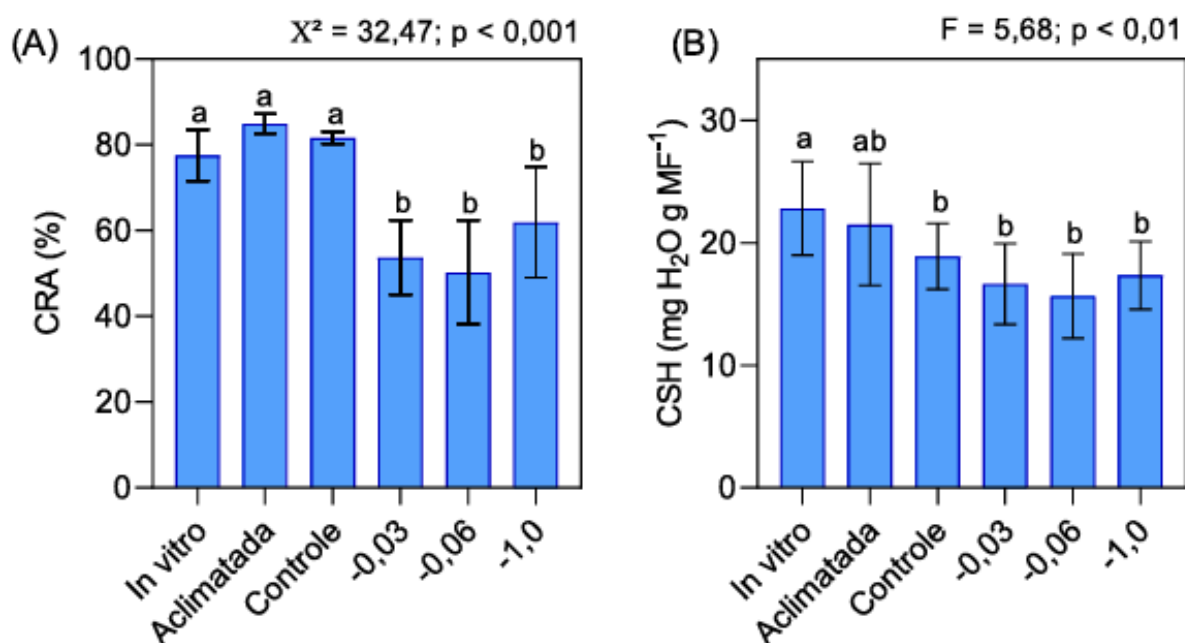


Figura 2: Balanço hídrico em folhas de *Cattleya walkeriana* cultivadas *in vitro*, aclimatadas e submetidas a condições de estresse hídrico em câmara de crescimento. Aclimatada (30 dias); Plântulas controle (irrigadas com água destilada por 30 dias após aclimatadas), $\Psi_w = -0,03$ (30 dias depois de aclimatadas); $\Psi_w = -0,06$ (30 dias depois de aclimatadas); e $\Psi_w = -1,0$ (30 dias depois de aclimatadas). **(A)** Conteúdo relativo de água (CRA) e **(B)** Conteúdo de saturação hídrica (CSH).

Os valores do CSH foram similares para as folhas das plântulas *in vitro* e aclimatadas. Porém, as plântulas controle e submetidas aos tratamentos de estresse hídrico indicaram valores menores do que as plântulas *in vitro*. Após 60 dias de remoção dos frascos, não havia novas

folhas. Esses resultados nos fazem pensar que, após 60 dias, alterações na composição e, portanto, nas propriedades da parede celular são fisiologicamente perceptíveis e podem ter relação com a diminuição da elasticidade e do menor potencial de retenção hídrica. A parede celular vegetal é uma estrutura altamente dinâmica que responde ao déficit hídrico por meio de um remodelamento significativo de sua matriz polissacarídica, especialmente das pectinas, cuja organização estrutural desempenha papel central na regulação da elasticidade celular (CARPITA; GIBEAUT, 1993; REITER, 2002). Alterações no grau de metilesterificação das homogalacturonanas (HGs) favorecem a formação de ligações cruzadas mediadas por Ca^{2+} , resultando em uma parede mais rígida e menos extensível, o que compromete a capacidade de acomodação hídrica dos tecidos (PEAUCELLE et al., 2011; DU et al., 2022). Além disso, mudanças nas interações entre pectinas, hemiceluloses e microfibrilas de celulose alteram as propriedades mecânicas da parede, reduzindo sua plasticidade sob condições de déficit hídrico (SOMERVILLE et al., 2004; REITER, 2002). Alguns estudos, mostram ainda que pode haver o acúmulo de proteínas estruturais da parede celular, como extensinas e outras glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, que reforçam a rede parede–matriz e contribuem para o aumento da rigidez da parede (JAMET *et al.*, 2006). Assim, os dados apontam para um remodelamento da parede celular como um fator contribuinte para a menor elasticidade e capacidade de armazenamento de água sob déficit hídrico.

Os valores de potencial hídrico (Ψ) das plântulas de *C. walkeriana*, considerando as plântulas *in vitro* e após 30 dias de aclimação, estão apresentados na Tabela 2. Observa-se que as plântulas avaliadas após o período de aclimação apresentaram valores médios de Ψ estatisticamente semelhantes com as plântulas *in vitro* (p- valor: 0.7966).

Tabela 2- Potencial hídrico (Ψ , MPa) em plântulas de *C. walkeriana in vitro* e após 30 dias de aclimação.

condição	n	Média + Desvio Padrão	Mediana	Mínimo-Máximo
<i>In vitro</i>	10	-1,236 ± 0,259	-1,175	-1,67 e -0,9
aclimatada	7	-1,316 ± 0,382	-1,55	-1,75 – -0,85

A maior mediana observada nas plantas aclimatadas, assim como a amplitude dos valores registrados, sugere variação individual na capacidade de ajuste hídrico durante o processo de aclimação. Esse comportamento é compatível com o período de aclimação de plantas

micropropagadas, no qual ocorrem alterações fisiológicas e metabólicas associadas à transição do ambiente *in vitro* para *ex vitro* (ISAH, 2015). Embora os dados tenham sido avaliados apenas nas condições *in vitro* e aclimatada, em função da limitação de material vegetal para aplicação da técnica em todos os tratamentos, os resultados obtidos complementam as análises fotoquímicas, reforçando a ocorrência de alterações fisiológicas associadas ao processo de aclimação das plântulas.

Avaliação da fluorescência da clorofila *a*

Os resultados das análises de fluorescência da clorofila *a* mostraram aumento significativo da eficiência máxima do fotossistema II (Fv/Fm) e da eficiência quântica efetiva do PSII (ΦPSII) nas plântulas aclimatadas em comparação às plântulas *in vitro* (Tabela 3). Esses resultados sugerem que o processo de aclimação promoveu recuperação funcional do aparato fotossintético, reduzindo o estresse fisiológico típico das condições *in vitro*, caracterizadas por baixa luminosidade e elevada umidade.

Tabela 3- Resultados obtidos nas análises de fluorescência da clorofila *a* em plântulas de *C. walkeriana* *in vitro* e após 30 dias de aclimação. Estão representados dados do rendimento quântico máximo do PSII (Fv/Fm), da eficiência quântica do PSII adaptado à luz (Φ PSII, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), da razão de declínio da fluorescência (Rfd) como um parâmetro empírico para acessar a vitalidade da planta e do rendimento não fotoquímico (NPQ).

condição	Fv/Fm	Φ PSII	Rfd	NPQ
<i>In vitro</i>	0,692 ± 0,031	0,43±0,073	2,796±0,612	2,604±0,818
aclimatada	0,752 ±0,013	0,539±0,043	2,44±0,198	2,115±0,442
p- valor	≤0.001	≤0.005	0.4649	0.1848
Valor da estatística	$\chi^2=9.7718$	$t = 3.5192$	$\chi^2= 0.53407$	$t = -1.4148$

A ausência de diferenças significativas nos parâmetros Rfd e NPQ indica que, apesar da melhora observada na eficiência fotoquímica, os mecanismos de dissipação de energia e a vitalidade geral do PSII permaneceram relativamente estáveis durante o processo de aclimação. Resultados semelhantes foram descritos por Isah (2015), que observou recuperação progressiva da eficiência fotossintética durante a aclimação de plantas micropropagadas, sem alterações expressivas nos mecanismos de dissipação de energia.

Os parâmetros fotossintéticos das plântulas de *C. walkeriana* submetidas a diferentes concentrações de PEG 6000 após 30 dias de tratamento estão apresentados na Tabela 4. Não

foram observadas diferenças significativas para os valores de F_v/F_m e $\Phi PSII$ entre os tratamentos ($p > 0,05$), indicando que a eficiência fotoquímica máxima e o rendimento quântico efetivo do PSII não foram significativamente afetados pelas concentrações de PEG avaliadas. Esses resultados sugerem que, mesmo sob restrição hídrica induzida, o fotossistema II manteve sua funcionalidade básica, sem evidências de fotoinibição acentuada.

Tabela 4- Parâmetros fotossintéticos das plântulas de *C. walkeriana* obtidas *in vitro* e tratadas com diferentes concentrações de PEG 6000 após 30 dias de aclimação. Estão representados dados do rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m), da eficiência quântica do PSII adaptado à luz ($\Phi PSII$, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), da razão de declínio da fluorescência (Rfd) como um parâmetro empírico para acessar a vitalidade da planta e do rendimento não fotoquímico (NPQ).

condição	F_v/F_m	$\Phi PSII$	Rfd	NPQ
Controle	0.670 ± 0.067	0.426 ± 0.086	2.816 ± 0.481 ab	2.621 ± 0.465 ab
-0,03	0.580 ± 0.071	0.380 ± 0.057	2.113 ± 0.256 b	1.960 ± 0.263 ab
-0,06	0.540 ± 0.095	0.306 ± 0.084	3.774 ± 1.806 a	3.842 ± 1.988 a
-1,0	0.650 ± 0.141	0.430 ± 0.156	2.545 ± 0.134 ab	2.295 ± 0.290 b
p- valor	0.070	0.164	≤ 0.05	≤ 0.05
Valor da estatística	$\chi^2 = 7.0346$	$\chi^2 = 5.1042$	$\chi^2 = 10.5681$	$\chi^2 = 9.8165$

Em contraste, diferenças significativas foram observadas para os parâmetros Rfd e NPQ ($p \leq 0,05$). Para Rfd, o tratamento -0,06 apresentou valores superiores em relação ao tratamento -0,03, enquanto controle e -1,0 apresentaram valores intermediários, não diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. De forma semelhante, para NPQ, o tratamento -0,06 apresentou os maiores valores, diferindo do tratamento -1,0, enquanto controle e -0,03 não diferiram significativamente dos demais. O aumento nos valores de NPQ, especialmente nos tratamentos com maior concentração de PEG, indica intensificação dos mecanismos de dissipação não fotoquímica da energia luminosa, mecanismo frequentemente associado à proteção do aparato fotossintético sob condições de estresse. As variações observadas em Rfd indicam alterações na capacidade de ajuste dos fotossistemas, refletindo ajustes fisiológicos relacionados ao balanço entre assimilação de carbono e dissipação de energia. Assim, os resultados indicam que o estresse hídrico imposto pelo PEG 6000 afetou principalmente

parâmetros associados à regulação e fotoproteção do aparato fotossintético, sem comprometer diretamente a eficiência fotoquímica máxima das plântulas. Esse comportamento sugere uma resposta de ajuste fisiológico ao estresse, na qual a modulação dos processos de dissipação de energia contribui para a manutenção da integridade funcional do aparato fotossintético em *C. walkeriana*.

Avaliação da expressão do metabolismo CAM

A variação diurna dos ácidos orgânicos tituláveis diferiu significativamente entre as plântulas cultivadas *in vitro* e aquelas após 30 dias de aclimação (Figura 3). As plântulas *in vitro* apresentaram valores de ΔH^+ significativamente superiores aos observados nas plântulas aclimatadas ($t = 13,797$; $p < 0,001$), indicando maior acúmulo de ácidos orgânicos nessa condição de cultivo.

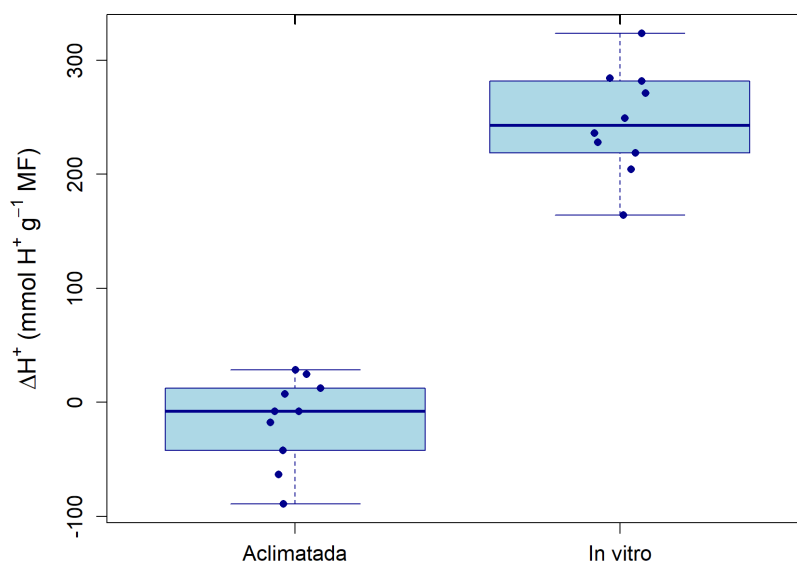


Figura 3: Variação diurna dos ácidos orgânicos tituláveis (ΔH^+ , mmol H^+ g⁻¹ MF) em folhas de plântulas de *Cattleya walkeriana* cultivadas *in vitro* e após 30 dias de aclimação. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste t de Student ($p < 0,001$).

O elevado acúmulo de ácidos orgânicos nas plantas cultivadas *in vitro* sugere a ocorrência de comportamento metabólico semelhante ao CAM, possivelmente favorecido pelas condições artificiais de cultivo, como elevada umidade relativa, ambiente fechado e disponibilidade contínua de carboidratos. Esse resultado indica que a expressão da via CAM em *Cattleya walkeriana* pode ser modulada pelo ambiente de cultivo, mesmo na ausência de estresse hídrico

direto, conforme descrito para espécies com metabolismo CAM facultativo (HERRERA, 2009; GILMAN & EDWARDS, 2020).

Considerando apenas as plântulas aclimatadas submetidas aos diferentes níveis de estresse hídrico, foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 4) (ANOVA, $p < 0,01$). No entanto, a variação observada entre os grupos não seguiu um padrão progressivo de aumento da acidez titulável em função da intensificação do estresse hídrico. O tratamento correspondente a $-0,06$ MPa apresentou os maiores valores médios de ΔH^+ , diferindo significativamente do tratamento $-1,0$ MPa, enquanto os demais tratamentos apresentaram comportamento intermediário.

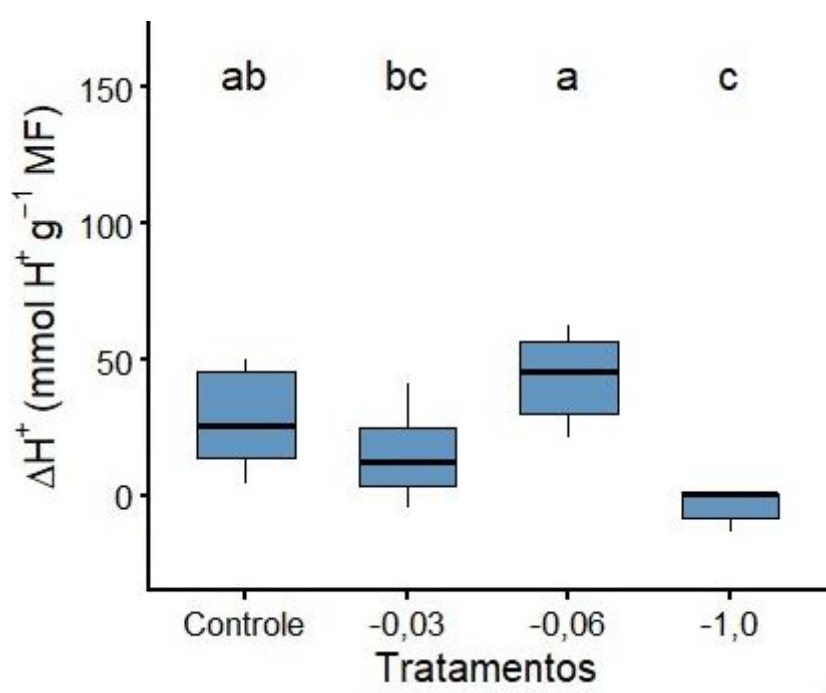


Figura 4: Variação diurna dos ácidos orgânicos tituláveis (ΔH^+ , mmol H^+ g $^{-1}$ MF) em folhas de plântulas aclimatadas de *Cattleya walkeriana* submetidas a diferentes níveis de estresse hídrico induzido por PEG 6000. As letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos, de acordo com ANOVA seguida do teste de Tukey HSD ($p \leq 0,05$).

Dessa forma, embora tenham sido detectadas diferenças pontuais entre os tratamentos, a ausência de um aumento consistente e gradativo da acidez titulável nas plântulas submetidas ao PEG 6000 indica que, nas condições experimentais avaliadas, o déficit hídrico não foi suficiente para induzir ou intensificar a expressão do metabolismo CAM em *C. walkeriana*. Esse comportamento sugere que a ativação dessa via pode estar mais associada a características

fisiológicas e anatômicas específicas da espécie do que exclusivamente à disponibilidade hídrica, uma vez que nem todas as orquídeas epífitas expressam CAM de forma robusta sob estresse, especialmente aquelas com folhas menos suculentas (LÜTTGE, 2004; HERRERA, 2009; ZOTZ & WINKLER, 2013).

CONCLUSÃO:

Os resultados obtidos demonstram que plântulas de *Cattleya walkeriana* apresentam capacidade de ajuste fisiológico frente às mudanças impostas pela aclimação e pelas condições de cultivo, evidenciando plasticidade funcional importante para sua *manutenção ex vitro*. A melhora no desempenho fotoquímico observada após a aclimação indica que esse processo favorece o restabelecimento da atividade fisiológica das plântulas, tornando essa etapa essencial para o sucesso do cultivo e da propagação da espécie.

Embora a hipótese inicial previsse a indução do metabolismo CAM sob estresse hídrico, os resultados mostraram que essa resposta não foi intensificada nas condições experimentais avaliadas. Ainda assim, esse achado é relevante, pois sugere que *C. walkeriana* pode responder ao déficit hídrico por meio de outros mecanismos fisiológicos de tolerância, sem necessariamente recorrer ao aumento da atividade CAM.

Dessa forma, este trabalho contribui para ampliar o entendimento sobre a fisiologia de orquídeas epífitas micropropagadas, especialmente no que se refere às respostas ao estresse hídrico e ao processo de aclimação. Além disso, os resultados fornecem subsídios importantes para o manejo de plântulas em condições de cultivo, com potencial aplicação em estratégias de conservação e produção sustentável de uma espécie nativa, ornamental e ameaçada.

REFERÊNCIAS:

- BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology*, v. 59, p. 89–113, 2008. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759>
- BANKS, J. M. Chlorophyll fluorescence as a tool to identify drought stress in *Acer* genotypes. *Environmental and Experimental Botany*, v. 155, p. 118–127, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.07.003>
- BRAGA, P. I. S. Aspectos biológicos das Orchidaceae de uma campina da Amazônia Central. *Acta Amazonica*, v. 7, n. 2, supl. 1, p. 5–89, 1977. <https://doi.org/10.1590/1809-43921977072s005>
- CARPITA, N.; GIBEAUT, D. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, v. 3, p. 1–30, 1993.

CARVALHO, M. H. C. Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. *Plant Signaling & Behavior*, v. 3, n. 3, p. 156–165, 2008. <https://doi.org/10.4161/psb.3.3.5536>

CHASE, M. W.; CAMERON, K. M.; FREUDENSTEIN, J. V.; PRIDGEON, A. M.; SALAZAR, G.; VAN DEN BERG, C.; SCHUITMAN, A. An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 177, p. 151–174, 2015.

COMEX STAT. Sistema oficial para extração das estatísticas do comércio exterior brasileiro de bens, versão 3.0.4, 2025. Disponível em: <www.comextstat.mdic.gov.br>. Acesso em: 24 jun. 2025.

DU, J.; ANDERSON, C. T.; XIAO, C. Dynamics of pectin homogalacturonan in cellular morphogenesis and adhesion, wall integrity sensing and plant development. *Nature Plants*, v. 8, p. 332–340, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41477-022-01120-2>

FLORA E FUNGA DO BRASIL. *Cattleya walkeriana*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, s.d. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB31789>. Acesso em: 2025.

GALDIANO, R. F.; MACEDO LEMOS, E. G.; FARIA, R. T. de; VENDRAME, W. A. Seedling development and evaluation of genetic stability of cryopreserved *Dendrobium* hybrid mature seeds. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 172, n. 5, p. 2521–2529, 2014.

GENTY, B.; BRIANTAIS, J. M.; BAKER, N. R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 990, p. 87–92, 1989. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(89\)80016-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(89)80016-9)

GILMAN, I. S.; EDWARDS, E. J. Crassulacean acid metabolism. *Current Biology*, v. 30, n. 2, p. R57–R62, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.11.073>

GOVAERTS, R.; BERNET, P.; KRATOCHVIL, K.; GERLACH, G.; CARR, G.; ALRICH, P.; PRIDGEON, A. M.; et al. *World Checklist of Orchidaceae*. Kew: Royal Botanic Gardens, 2021. Disponível em: <https://wcsp.science.kew.org>.

HARTSOCK, T. L.; NOBEL, P. S. Watering converts a CAM plant to daytime CO₂ uptake. *Nature*, v. 262, p. 574–576, 1976.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 125, n. 1, p. 189–198, 1968. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)

HERRERA, A. Crassulacean acid metabolism and fitness under water deficit stress: if not for carbon gain, what is facultative CAM good for? *Annals of Botany*, v. 103, n. 4, p. 645–653, 2009. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn145>

HODGES, D. M.; DELONG, J. M.; FORNEY, C. F.; PRANGE, R. K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, v. 207, p. 604–611, 1999.

ISAH, T. Adjustments to in vitro culture conditions and associated anomalies in plants. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, v. 57, n. 2, p. 9–28, 2015. <https://doi.org/10.1515/abcsb-2015-0026>

IUCN. *The IUCN Red List of Threatened Species*. 2025. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/>. Acesso em: 2025.

JAMET, E.; CANUT, H.; BOUDART, G.; PONT-LEZICA, R. F. Cell wall proteins: a new insight through proteomics. *Trends in Plant Science*, v. 11, n. 1, p. 33–39, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.11.006>

JARDIM BOTÂNICO DO RECIFE. Jardim Botânico do Recife instrui sobre cuidados necessários ao cultivo de orquídeas. Prefeitura do Recife, 2021. Disponível em: <https://www2.recife.pe.gov.br/noticias/10/08/2021/jardim-botanico-do-recife-instrui-sobre-cuidados-necessarios-ao-cultivo-de>. Acesso em: 2025.

LIANG, X.; SU, D.; YIN, S.; WANG, Z. Leaf water absorption and desorption functions for three turfgrasses. *Journal of Hydrology*, v. 376, p. 243–248, 2009.

LICHTENTHALER, H. K.; MIEHE, J. A. Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends in Plant Science*, v. 2, p. 316–320, 1997. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)89954-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)89954-2)

LIMA, J. F.; BOANARES, D.; COSTA, V. E.; MOREIRA, A. S. F. P. Do photosynthetic metabolism and habitat influence foliar water uptake in orchids? *Plant Biology*, v. 25, n. 2, p. 257–267, 2023. <https://doi.org/10.1111/plb.13499>

LÜTTGE, U. Ecophysiology of crassulacean acid metabolism (CAM). *Annals of Botany*, v. 93, n. 6, p. 629–652, 2004. <https://doi.org/10.1093/aob/mch087>

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence — a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, v. 51, n. 345, p. 659–668, 2000. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659>

MICHEL, B. E.; KAUFMANN, M. R. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology*, v. 51, n. 5, p. 914–916, 1973. <https://doi.org/10.1104/pp.51.5.914>

MORALES, M.; MUNNÉ-BOSCH, S. Malondialdehyde: facts and artifacts. *Plant Physiology*, v. 180, p. 1246–1250, 2019. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00405>

OGBURN, R. M.; EDWARDS, E. J. Quantifying succulence: a rapid, physiologically meaningful metric of plant water storage. *Plant, Cell & Environment*, v. 35, p. 1533–1542, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2012.02503.x>

OXBOROUGH, K. Imaging of chlorophyll a fluorescence: theoretical and practical aspects of an emerging technique for the monitoring of photosynthetic performance. *Journal of Experimental Botany*, v. 55, p. 1195–1205, 2004. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh145>

PAN, Z. L.; GUO, W.; ZHANG, Y. J.; SCHREEL, J. D.; GAO, J. Y.; LI, Y. P.; YANG, S. J. Leaf trichomes of *Dendrobium* species in relation to foliar water uptake, leaf surface wettability, and water balance. *Environmental and Experimental Botany*, v. 190, p. 104568, 2021.

PEAUCELLE, A.; BRAYBROOK, S. A.; LE GUILLOU, L.; BRON, E.; KUHLEMEIER, C.; HÖFTE, H. Pectin-induced changes in cell wall mechanics underlie organ initiation in Arabidopsis. *Current Biology*, v. 21, n. 20, p. 1720–1726, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.08.057>

REITER, W. D. Biosynthesis and properties of the plant cell wall. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 5, p. 536–542, 2002.

SCHNEIDERS, D.; PESCADOR, R.; BOOZ, M. R.; SUZUKI, R. M. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). *Revista Ceres*, v. 59, n. 2, p. 185–191, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2012000200006>

SOMERVILLE, C.; BAUER, S.; BRININSTOOL, G.; FACETTE, M.; HAMANN, T.; MILNE, J.; OSBORNE, E.; PAREDEZ, A.; PERSSON, S.; RAAB, T.; VORWERK, S.; YOUNGS, H. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science*, v. 306, n. 5705, p. 2206–2211, 2004. <https://doi.org/10.1126/science.1102765>

STANCATO, G. C.; MAZZAFERA, P.; BUCKERIDGE, M. S. Growth, biomass partitioning and carbohydrate content of *Cattleya* seedlings grown *in vitro* as affected by different carbohydrate sources. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v. 14, n. 3, p. 165–174, 2002.

TURNER, N. C.; BEGG, J. E. Plant-water relations and adaptation to stress. *Plant and Soil*, v. 58, n. 1–3, p. 97–131, 1981. <https://doi.org/10.1007/BF02180051>

VILLELA, F. A.; DONI FILHO, L.; SEQUEIRA, E. L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6.000 e da temperatura. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 26, n. 11/12, p. 1957–1968, 1991.

VITT, P.; TAYLOR, A.; RAKOSY, D.; KREFT, H.; MEYER, A.; WEIGELT, P.; KNIGHT, T. M. Global conservation prioritization for the Orchidaceae. *Scientific Reports*, v. 13, p. 6718, 2023.

ZHANG, Y.; LUAN, Q.; JIANG, J.; LI, Y. Prediction and utilization of malondialdehyde in exotic pine under drought stress using near-infrared spectroscopy. *Frontiers in Plant Science*, v. 12, p. 735275, 2021. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.735275>

ZOTZ, G.; WINKLER, U. Aerial roots of epiphytic orchids: the velamen radicum and its role in water and nutrient uptake. *Oecologia*, v. 171, n. 3, p. 733–741, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00442-012-2575-6>