

JOÃO PAULO ALVES DE BARROS

**EFICIÊNCIA E PLASTICIDADE FOTOSSINTÉTICA EM PLANTAS DE ORA-
PRO-NÓBIS SUBMETIDAS AO DÉFICIT HÍDRICO**

Serra Talhada – PE

2020

**B
A
R
R
O
S**

**A
L
V
E
S**

**P
A
U
L
O**

J

**E
F
I
C
I
Ê
N
C
I
A**

**P
L
A
S
T
I
C
I
D
A
D
E
. . .
2
0
2
0**

JOÃO PAULO ALVES DE BARROS

**EFICIÊNCIA E PLASTICIDADE FOTOSSINTÉTICA EM PLANTAS DE ORA-
PRO-NÓBIS SUBMETIDAS AO DÉFICIT HÍDRICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Sérgio Luiz Ferreira da Silva

Serra Talhada – PE

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

E27e

Barros, João Paulo Alves de
EFICIÊNCIA E PLASTICIDADE FOTOSSINTÉTICA EM PLANTAS DE ORA-PRO-NÓBIS SUBMETIDAS AO
DÉFICIT HÍDRICO / João Paulo Alves de Barros. - 2020.
85 f. : il.

Orientador: Sergio Luiz Ferreira da Silva.
Inclui referências.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal
, Serra Talhada, 2020.

1. Cactaceae. 2. Indução de CAM. 3. Metabolismo do Carbono. 4. Transição Fotossintética. I. Silva, Sergio Luiz
Ferreira da, orient. II. Título

CDD 581.15

EFICIÊNCIA E PLASTICIDADE FOTOSSINTÉTICA EM PLANTAS DE ORA-
PRO-NÓBIS SUBMETIDAS AO DÉFICIT HÍDRICO

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

APROVADO em ___/___/___.

Banca Examinadora

Prof. DSc. Sérgio Luiz Ferreira da Silva – UAST/UFRPE

Orientador

Prof. DSc. André Luiz Alves de Lima – UAST/UFRPE

Examinador Interno

Prof. DSc. Milton Costa Lima Neto – UNESP

Examinador Externo

Aos meus pais: Josefa Ivone Alves da Silva Barros e João Alves de Barros Filho

Dedico

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Josefa Ivone Alves da Silva Barros e João Alves de Barros Filho por me apoiarem e darem suporte durante toda a minha vida.

Às minhas irmãs, Ana Paula Alves de Barros e Ana Cláudia Alves de Barros por todo o apoio durante toda a jornada.

À Maiany Alves Patriota, minha namorada e ‘princesa de porcelana’, uma pessoa maravilhosa que tive o privilégio de conhecer e trabalhar durante o mestrado.

Ao meu Orientador Sérgio Luiz Ferreira da Silva, por ser uma grande pessoa e profissional, pela confiança, e por participar no processo de formação acadêmica durante o mestrado.

Aos meus grandes e verdadeiros amigos João Paulo, Nielson, Rondinelly e Kaylon pela presença e pelos laços de amizade construídos na adolescência e que perduram até hoje.

Aos meus amigos de infância, que pelas circunstâncias precisaram se distanciar, mas as lembranças sempre permanecem.

Aos colegas de Graduação e Pós-graduação pela troca mútua de conhecimento e experiência.

Ao grupo de pesquisa agrícola do semiárido (GPAS), principalmente a Juracy Barroso Neto por tirar dúvidas pontuais; Pedro José Hermínio e a Vítor Gomes Nunes pela ajuda prestada durante as atividades de pesquisa.

A Nielson Dinivan da Silva Brito por auxiliar na obtenção de imagens e de medidas estomáticas, assim como de potencial hídrico foliar.

Aos Pós-Doutorandos Kelem Silva Fonseca e Hugo Bentzen pela orientação prestada quando necessária, como no esclarecimento no manuseio de equipamentos e em questões teóricas.

À Professora Dra Luciana Sandra Bastos de Souza por acreditar nas minhas capacidades e me incentivar a cursar o mestrado.

A todo corpo docente da Graduação e Pós-Graduação pela contribuição na transmissão dos conhecimentos adquiridos.

Aos servidores e terceirizados da UAST pela importância no funcionamento da Universidade e do PGPV.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa.

A FACEPE (Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) por disponibilizar os equipamentos

Ao PGPV (Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal) por conceder essa chance de cursar o mestrado.

Por fim, agradeço a todos que fizeram parte direta ou indiretamente dessa jornada. Obrigado!

Toda decisão acertada é proveniente de experiência. E toda experiência é proveniente de uma decisão não acertada.

Albert Einstein

RESUMO GERAL

Pereskia aculeata Mill (Ora-Pro-Nóbis) Cactaceae, é uma espécie C3 que tem como característica o metabolismo CAM como forma facultativa de assimilação de CO₂. Assim, esta espécie possui ambas as vias fotossintéticas (C3/CAM), que podem ser moduladas em resposta a alguns fatores ambientais, como o estresse hídrico, que exerce controle sobre a fixação de CO₂. Já foi demonstrado que o déficit hídrico pode induzir a mudança do metabolismo C3 para CAM nessas espécies. No entanto, os mecanismos bioquímicos e fisiológicos envolvidos com essa mudança aclimatativa para a assimilação de CO₂ ainda são poucos conhecidos. Assim, o presente estudo teve como objetivo caracterizar fisiologicamente a transição fotossintética C3-CAM e associar esta modulação com a eficiência fotossintética em plantas de *Pereskia aculeata* submetidas ao estresse hídrico. Para tanto, foram realizados dois experimentos em DIC, visando avaliar o efeito do estresse hídrico a longo (experimento I) e curto prazo (experimento II). O experimento I foi montado em câmara de crescimento, enquanto o experimento II em casa de vegetação. Onde, um grupo de plantas foi bem irrigado e outro grupo submetido ao déficit hídrico, com posterior reidratação. Como marcadores fisiológicos e bioquímicos da modulação C3-CAM foram avaliados a fotossíntese, por meios de trocas gasosas e parâmetros fotoquímicos, *status* hídrico, variáveis estomáticas, além de indicadores químicos associados à acidez titulável, carboidratos solúveis, conteúdos de ascorbato e glutatona reduzidos, enquanto os danos foram avaliados pela acumulação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBAR_s). Os resultados mostraram uma pequena indução de CAM em plantas de Ora-Pro-Nóbis submetidas ao déficit hídrico, caracterizada como CAM-Cycling, com trocas gasosas no período diurno e fixação noturna do carbono interno. Além disso, foram constatados um alto grau fotoprotetivo e uma redução significativa da perda líquida de CO₂ noturno. Adicionalmente, foram verificadas mudanças na acidez, no metabolismo de osmólitos, peroxidação de membrana e capacidade antioxidante. Com a reidratação, as plantas retornam aos padrões fisiológicos C3. Essa plasticidade fotossintética diminui prejuízos na eficiência fotossintética, garantindo o estabelecimento da planta nos ambientes com pressões abióticas. Assim, a compreensão desses mecanismos fisiológicos se torna importante no entendimento das estratégias ecofisiológicas das plantas frente às adversidades ambientais. Além disso, essas espécies CAM, por serem produtivas, podem ser

selecionadas para substituir culturas C3, com o objetivo de conservar a produção agrícola em um cenário de agravamento das condições climáticas.

Palavras-Chave: Cactaceae, Indução de CAM, Metabolismo do Carbono, Transição Fotossintética

GENERAL ABSTRACT

Pereskia aculeata Mill (Ora-Pro-Nobis) Cactaceae, is a C₃ species whose characteristic or metabolism is CAM as an optional form of CO₂ assimilation. Thus, this species has both photosynthetic pathways (C₃/CAM), which can be modulated in response to some environmental factors, such as water stress, which exerts control over CO₂ fixation. Water deficit has been shown to induce a change in C₃ to CAM metabolism in these species. However, the biochemical and physiological mechanisms involved with this acclimatization shift to CO₂ assimilation are still poorly understood. Thus, the present study aims to characterize the C₃-CAM photosynthetic transition physiologically and associate this modulation with the photosynthetic efficiency in *Pereskia aculeata* plants subjected to water stress. For that, two DIC experiments were carried out, aiming to evaluate the effect of water stress in the long term (experiment I) and short term (experiment II). Experiment I was mounted in a growth chamber, while Experiment II in a greenhouse. Where, one group of plants was well irrigated and another group submitted to water deficit, with subsequent rewatering. As physiological and biochemical markers of C₃-CAM modulation were evaluated photosynthesis, by means of gas exchange and photochemical parameters, water status, stomatal variables, as well as chemical indicators associated with titratable acidity, soluble carbohydrates, reduced ascorbate and glutathione contents, while damages were evaluated by substances reactive to thiobarbituric acid (TBAR_s) accumulation. The results showed a small induction of CAM in Ora-Pro-Nóbis plants submitted to water deficit, characterized as CAM-Cycling, with daytime gas exchange and nocturnal internal carbon fixation. Additionally, we found changes in acidity, osmolyte metabolism, membrane peroxidation and antioxidant capacity. Starting rewatering, plants return to physiological C₃ standards. This photosynthetic plasticity reduces impairment in photosynthetic efficiency, ensuring plant establishment in environments with abiotic pressures. Thus, the understanding of these physiological mechanisms becomes important in understanding the ecophysiological strategies of plants in the face of environmental adversities. In addition, these CAM species, being productive, can be selected to replace C₃ crops, with the aim of conserving agricultural production in a scenario of worsening climatic conditions.

Keywords: Cactaceae, CAM Metabolism Induction, Carbon Metabolism, Photosynthetic Transition

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AB	Abaxial
ABA	Ácido Abscísico
AD	Adaxial
ANOVA	Análise de Variância
A_o	Abertura do Ostíolo
ASA	Ascorbato Reduzido
ATP	Adenosina Trifosfato
BAM1	Barely Any Meristem 1
BAM3	Barely Any Meristem 3
CAM	Metabolismo Ácido das Crassuláceas
CAM-Cycling	Metabolismo CAM Reciclador
CAM-Idling	Metabolismo CAM Inativador
C_a	Concentração Ambiente de CO ₂
C_i	Concentração Intercelular de CO ₂
C_i/C_a	Eficiência Bioquímica
CO₂	Dióxido de Carbono
CST	Carboidratos Solúveis Totais
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
DFFF	Densidade de Fluxo de Fótons Fotossintéticos
D_e	Densidade Estomática
DTNB	Ácido 5,5'-Ditio-Bis-(2-Nitrobenzóico)
E	Transpiração
ETR	Taxa Relativa de Transporte de Elétrons
F	Fluorescência do estado de equilíbrio dinâmico da clorofila quando submetida à luminosidade
Figura S	Figura Suplementar
F_m	Fluorescência Máxima de Folhas Adaptadas ao Escuro
F_m'	Fluorescência Máxima de Folhas Adaptadas à Luz
F_o	Fluorescência Mínima de Folhas Adaptadas ao Escuro
F_N	Balanço Líquido de CO ₂ Noturno

F_o'	Fluorescência Mínima de Folhas Adaptadas à Luz
F_v/F_m	Eficiência Quântica Máxima do PSII
g_m	Condutância no Mesofilo
g_s	Condutância Estomática
GSH	Glutathiona Reduzida
IC	Curva de Indução Fotossintética
J_{max}	Taxa Máxima de Transporte de Elétrons Fotossintéticos
LCP	Ponto de Compensação de luz
MDA-TBA	Complexo Malondialdeído-Ácido Tiobarbitúrico
MDH	Desidrogenase do Malato
MFC	Massa Fresca do Caule
MFF	Massa Fresca da Folha
MFPA	Massa Fresca da Parte Aérea
MFR	Massa Fresca da Raíz
MFT	Massa Fresca Total da Planta
NPQ	Coefficiente de <i>Quenching</i> Não-fotoquímico
P_N	Assimilação Líquida de CO ₂
P_N max	Fotossíntese Líquida Máxima
P_N/E	Eficiência Instantânea no Uso da Água
P_N/C_i	Nível de Carboxilação Máximo
P_N/g_s	Eficiência Intrínseca no Uso da Água
PS	Pulso de Saturação
RuBP	Ribulose-1,5-Bifosfato
RUBISCO	Ribulose-1,5-Bifosfato Carboxilase/Oxigenase
PEPC	Fosfoenolpiruvato Carboxilase
PPF	Pulso de Fótons Fotossintéticos
PSII	Fotossistema II
qL	Quantidade de Centros de Reações Abertos no PSII
qP	Coefficiente de <i>Quenching</i> Fotoquímico
R_d	Respiração em Presença da Luz
R_{dark}	Respiração no Escuro
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBAR_s	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TCA	Ciclo do Ácido Tricarboxílico
TCA	Ácido Tricloroacético
T_f	Temperatura da Folha
V_{cmáx}	Taxa Máxima de Carboxilação da RUBISCO
Y(II)	Eficiência Quântica Atual do PSII
δ¹³C	Composição do Isótopo do Carbono 13
[H⁺]	Acidez Titulável
Δ[H⁺]	Variação na Acidez
Ψ_{leaf}	Potencial Hídrico Foliar

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

- Figura 1.** Mecanismo de modulação estomática via ácido abscísico (ABA) em plantas de *Arabidopsis thaliana* por sinalização de um peptídeo à longa distância em resposta à seca. Fonte: Christmann e Grill (2018). 4
- Figura 2.** Reações metabólicas que participam do ciclo de Calvin-Benson (C3). Fonte: Adaptado de Michelet et al. (2013). 5
- Figura 3.** Esquema geral do sistema de fotossíntese encontrado em plantas C4. Fonte: Adaptado de Leegood (2002). 6
- Figura 4.** Esquema geral do sistema de fotossíntese do tipo CAM (Metabolismo Ácido das Crassuláceas). Fonte: Adaptado de Ming et al. (2015). 8
- Figura 5.** Comportamento estomático, assimilação líquida de CO₂ atmosférico e acúmulo de ácidos orgânicos diários durante o período diurno e noturno em plantas operando em modo C3, CAM, CAM-Cycling e CAM-Idling. Fonte: Adaptado de Kerbauy et al. (2012). 12
- Figura 6** – Exemplos de Cactáceas encontradas no estado de Sergipe. Fonte: Filho et al. (2018). Onde: *Melocactus sergipensis* (a), *M. zehntneri* (b) e *M. violaceus* (c), informalmente denominada de coroa-de-frade (Cactoideae), respectivamente; *Tacinga inamoena* ou quipá (Opuntioideae) (d); *Nopalea cochenillífera* (Opuntioideae) ou palma doce (e); *Brasiliopuntia brasiliensis* ou palma miúda (Opuntioideae) (f); *Pilosocereus gounellei* ou xique-xique (Cactoideae) (g); *Opuntia dillenii* ou palma santa (Opuntioideae) (h); *Pilosocereus catingicola* ou facheiro (Cactoideae) (i); *Cereus jamacaru* ou mandacaru (Cactoideae) (j) e *Hylocereus undatus*, ou pitáia (Cactoideae) (l). 13
- Figura 7.** Eventos relativos à evolução dos cactos. Onde: informações dentro de retângulos brancos são mais precisas; informações de retângulos cinzas são mais especulativas; triângulos pretos invertidos grandes indicam a grande diversidade de espécies em relação aos triângulos invertidos pequenos. Fonte: Adaptado de Edwards e Donoghue (2006). 14
- Figura 8.** Cladograma envolvendo a filogenia de espécies da família Cactaceae. Onde, estrelas brancas significam espécies em que foi estudada a plasticidade da fotossíntese; estrelas pretas significam espécies que apresentam o sistema CAM reciclador e quadrados negros relativos às espécies que possuem o sistema CAM inativador. Fonte: Adaptado de Edwards e Diaz (2006). 15
- Figura 9.** Plantas de Ora-Pro-Nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) cultivadas em vasos e sujeitas às condições de casa de vegetação em uma região semiárida no município de Serra Talhada, PE. Fonte: O Autor. 17

Capítulo II

Figura 1. Curva IC para os parâmetros fotoquímicos: eficiência quântica atual do PSII (Y(II)) (a), coeficiente de *quenching* fotoquímico (qP) (b), taxa relativa de transporte de elétrons (ETR), e o coeficiente de *quenching* não-fotoquímico (NPQ) (d) em plantas de Ora-Pro-Nóbis bem irrigadas e submetidas 46 dias de déficit hídrico em uma câmara de crescimento, em resposta ao tempo e expostas a uma intensidade de luz actínica fixa de $190 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 38

Figura 2. Evolução diária da fotossíntese líquida (P_N), transpiração (E), condutância estomática (g_s), concentração intercelular de CO_2 (C_i), eficiência no uso da água (P_N/E), eficiência intrínseca no uso da água (P_N/g_s), nível de carboxilação máximo (P_N/C_i) e a razão C_i/C_a em plantas de Ora-Pro-Nóbis bem irrigadas, submetidas a 46 dias de déficit hídrico e 16 dias de reidratação em uma câmara de crescimento. A seta preta representa o início da reidratação. 41

Figura 3. Evolução horária da fotossíntese líquida (P_N), transpiração (E), condutância estomática (g_s) e concentração intercelular de CO_2 (C_i), eficiência no uso da água (P_N/E), eficiência intrínseca no uso da água (P_N/g_s), nível de carboxilação máximo (P_N/C_i) e a razão C_i/C_a em plantas de Ora-Pro-Nóbis bem irrigadas e submetidas a 44 dias de déficit hídrico em uma câmara de crescimento PE. Onde, as barras abertas representam o período diurno e as barras fechadas o período noturno. Além disso, o gráfico menor representa a o balanço noturno horário de CO_2 43

Figura S1. Representação da densidade e abertura estomática presentes nas epidermes Abaxiais (AB) e Adaxiais (AD) em plantas de Ora-Pro-Nóbis bem irrigadas e submetidas à seca por 46 dias. As imagens relativas à densidade foram obtidas através de microscopia óptica com uso de lente 10x em resolução $150 \mu\text{m}$. Para abertura do ostíolo foi utilizada a lente de 40x. As setas pretas localizam um estômato para referência. 62

Figura S2. Curva de resposta à luz ($P_N \times \text{DFFF}$) e CO_2 ($P_N \times C_i$) para as variáveis fotossíntese líquida (P_N) (a e b), transpiração (E) (c e d), condutância estomática (g_s) (e e f), concentração intercelular de CO_2 (C_i) (g) e temperatura da folha (T_f) (h) em plantas de Ora-Pro-Nóbis bem irrigadas e submetidas a 46 dias de déficit hídrico em uma câmara de crescimento. 63

Figura S3. Conteúdo de carboidratos solúveis (CST) (a), dano de membrana por peroxidação de membrana (TBARs) (b), conteúdo de ascorbato reduzido (ASA) (c) e conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) em plantas de Ora-Pro-Nóbis bem irrigadas e submetidas a sete dias de suspensão da rega e mais sete dias de reidratação realizados às 18h00min e 06h00min. 64

LISTAS DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1. Traços do uso hídrico ecológico de ancestral de <i>Pereskia</i> e o grupo dos cactos. Fonte: Adaptado de Edwards e Donoghue (2006).	16
--	----

Capítulo II

Tabela 1. Valores de matéria fresca folha (MFF), caule (MFC), raiz (MFR), parte aérea (MFPA) e total (MFT) em plantas de Ora-Pro-Nóbis bem irrigadas e sob as condições de seca integral por sete dias cultivadas em casa de vegetação.	36
---	----

Tabela 2. Parâmetros fotoquímicos eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m), eficiência quântica atual do PSII ($Y(II)$), taxa relativa de transporte de elétrons (ETR), coeficiente de <i>quenching</i> fotoquímico (qP), fração do número de centro de reações abertos (qL) e o coeficiente de <i>quenching</i> não-fotoquímico (NPQ) em plantas de Ora-Pro-Nóbis bem irrigadas, expostas à sete dias de seca integral e reidratação por sete dias em presença de luz actínica $620 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 20 segundos cultivadas em condições de casa de vegetação.	37
--	----

Tabela 3. Parâmetros fotossintéticos relativos à respiração no escuro (R_{dark}), Ponto de compensação de luz (LCP) e fotossíntese líquida máxima ($P_N \text{ max}$) derivados da curva de resposta à luz ($P_N \times DFFF$), taxa de carboxilação máxima da RUBISCO (V_{cmax}), taxa de transporte de elétrons fotossintéticos (J_{max}), Respiração na presença da luz (R_d) e Condutância do mesofilo derivados da curva de CO_2 ($P_N \times C_i$) durante o período diurno e noturno realizada em plantas de Ora-Pro-Nóbis sob condições bem irrigadas e de déficit hídrico por 46 dias.	45
---	----

Tabela 4. Valores de potencial hídrico (Ψ), assimilação noturna de CO_2 acumulada (F_N) e da composição do isótopo do carbono 13 ($\delta^{13}\text{C}$) em plantas de Ora-Pro-Nóbis sob as condições bem irrigadas, expostas à seca por 46 dias e com posterior reidratação por 16 dias.	46
---	----

Tabela 5. Valores de densidade estomática e nível de abertura do ostíolo obtidos em plantas de Ora-Pro-Nóbis bem irrigadas e sob as condições de seca por 46 dias, na epiderme Abaxial (AB) e Adaxial (AD) da folha, durante o período diurno.	47
--	----

Tabela 6. Acidez titulável $[\text{H}^+]$ no fim do período diurno e noturno e variação diurna da acidez $\Delta[\text{H}^+]$ em plantas de Ora-Pro-Nóbis bem irrigadas e submetidas à suspensão da rega por sete dias e posterior reidratação por mais sete dias cultivadas em casa de vegetação.	48
--	----

SUMÁRIO

1 Capítulo I – Revisão de Literatura: Impactos Fisiológicos e Bioquímicos de Variáveis Abióticas na Fotossíntese de Plantas CAM	1
1.1 Introdução Geral	1
1.2 Impactos de Variáveis Abióticas na Biologia Vegetal	2
1.3 Modelos Vegetais C3, C4 e CAM	4
1.4 Plasticidade CAM em Plantas Sujeitas a Estresses Abióticos	7
1.5 Família Cactaceae como uma Potencial Moduladora C3-CAM	11
1.6 Características de Ora-Pro-Nóbis	15
1.7 Referências	18
2 Capítulo II – Indução de CAM-Cycling reduz perdas noturnas de CO₂ e mantém a integridade do PSII em plantas de Ora-Pro-Nóbis sujeitas ao déficit hídrico	25
2.1 Introdução	27
2.2 Material e Métodos	30
2.2.1 Material Vegetal e Tratamentos	30
2.2.2 Medidas de Matéria Fresca	31
2.2.3 Medidas de Fluorescência da Clorofila a	31
2.2.4 Medidas de Trocas Gasosas e Curvas de Resposta da Fotossíntese em Relação à Luz e CO₂	32
2.2.5 Composição do Carbono 13 ($\delta^{13}\text{C}$) e o Balanço Líquido de CO₂ Noturno (F_N)	33
2.2.6 Potencial Hídrico Foliar	33
2.2.7 Imagens e Biometria dos Estômatos	34
2.2.8 Conteúdo de Carboidratos Solúveis Totais (CST)	34
2.2.9 Determinação do Conteúdo de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBAR_s), Ascorbato Reduzido (ASA) e Glutationa Reduzida (GSH)	34
2.2.10 Determinação da Acidez Titulável	35
2.2.11 Análise Estatística	36
2.3 Resultados	36
2.3.1 Crescimento, Atividade Fotoquímica e Trocas Gasosas	36
2.3.2 Parâmetros Derivados das Curvas P_N x DFFF e P_N x C_i	45
2.3.3 Relações Hídricas, Balanço Líquido Noturno de CO₂ e $\delta^{13}\text{C}$	46
2.3.4 Biometria e Imagens dos Estômatos	47
2.3.5 Acidez Titulável	47
2.3.6 Metabolismo Oxidativo, Açúcares e Peroxidação de Membrana	47
2.4 Discussão	48
2.4.1 Impactos do Déficit Hídrico no Crescimento, na Atividade do PSII e na Plasticidade do Metabolismo do Carbono Diário em Plantas de Ora-Pro-Nóbis	48
2.4.2 Plantas de Ora-Pro-Nóbis apresentam Tolerância e Operam em Modo CAM-Cycling em Baixa Disponibilidade Hídrica	51
2.4.3 Metabolismo de Açúcares e Antioxidante é intensificado Durante o Período Noturno em Plantas de Ora-Pro-Nóbis Crescidas em Regimes Reduzidos de Água	52
2.5 Conclusão	53
2.6 Referências	54
2.7 Material Suplementar	62

1 Capítulo I – Revisão de Literatura: Impactos Fisiológicos e Bioquímicos de Variáveis Abióticas na Fotossíntese de Plantas CAM

1.1 Introdução Geral

As plantas estão sujeitas a diversas variáveis bióticas e abióticas no ambiente que podem acarretar alterações nos padrões fisiológicos normais, ocasionando distúrbios celulares que podem resultar em estresses. Dentre esses fatores, a baixa disponibilidade de água está entre as principais causas de prejuízos no crescimento de plantas (Ortiz et al. 2015), seguido pelo excesso de luz (calor) (Casaroli et al. 2007). Nos ambientes semiáridos, essas condições de seca e excesso de luz (isolados ou combinados) são intensificadas principalmente em ambientes mais perturbados pela ação antrópica, como aqueles em processo de desertificação (Symeonakis e Drake 2004). Embora esses fatores abióticos representem um desafio para o crescimento vegetal, as plantas podem induzir mudanças metabólicas para se ajustar a dinâmica ambiental (Hoffmann et al. 2015).

Em ambientes limitantes, os vegetais podem ativar processos metabólicos e fisiológicos que resultem em uma homeostase ideal para seu estabelecimento, logo, é notável que esses organismos ao longo do tempo evolutivo tenham sofrido modificações nas suas atividades biológicas em função dos parâmetros ambientais (Basu et al. 2016). Por exemplo, existem três modos de fixação de carbono pelas plantas, classificados em C3, C4, ou CAM (Metabolismo Ácido das Crassuláceas) (Borland et al. 2011). Em condições extremas, o sistema CAM leva as plantas a metabolizarem ácido para manter a fixação de carbono e cessar a abertura estomática, com o objetivo de maximizar a eficiência do uso da água (Borland et al., 2011; Borland et al., 2014).

Além dos sistemas de fotossíntese C3, C4 e CAM, existem espécies C3-CAM, que se caracterizam por modificar a rota do metabolismo do carbono dependendo de condições abióticas (Matsuoka et al. 2018). Desta forma, parece que uma condição de estresse induz o metabolismo CAM em algumas famílias (Habibi 2016). Por exemplo, a espécie *Mesembryanthemum crystallinum* (Aizoaceae) permuta o metabolismo C3 para CAM em função da salinidade (Matsuoka et al. 2018). Por isso, essas informações sugerem que esse sistema duplo alternado de metabolismo do carbono aparentemente aumenta a chance do estabelecimento desses vegetais em ambientes em diferentes condições.

Assim, é necessário que mais estudos dessa natureza sejam realizados a fim de compreender os fatores específicos que levam a plasticidade na fixação do carbono, culminando na compreensão mais precisa na indução do metabolismo CAM e o respectivo processo reversível para C3 (Winter e Holtum 2014). Desta forma, essas informações podem ser úteis no cultivo/manejo de espécies agrícolas tipo C3-CAM, assim como para obtenção e aprimoramento de novas tecnologias que maximizem a produção mesmo em condições limitantes (Yang et al. 2015; Brilhaus et al. 2016).

Embora muitas espécies de plantas tenham unicamente o mecanismo fotossintético do tipo CAM (Habibi 2016), é conhecido que, há espécies de Cactaceae (subfamília Pereskeoideae) que tenham potenciais significativos de modulação da mudança da condição fisiológica C3 para CAM em regiões semiáridas, como por exemplo, o modelo vegetal *Pereskia aculeata* Mill, conhecida popularmente como Ora-Pro-Nóbis (Edwards e Donoghue 2006; Edwards e Diaz 2006). Esta espécie é conhecida por ser tolerante a seca, estando agrupada no grupo das cactáceas que possuem folhas verdadeiras (Queiroz et al. 2015) e ocorre naturalmente no semiárido brasileiro (Zappi e Taylor 2015).

Desta forma, estudos sobre fotossíntese utilizando essa planta como modelo vegetal podem auxiliar na identificação das estratégias metabólicas (bioquímicas e fisiológicas) efetivamente relacionadas à adaptação e aclimatação frente a restrições severas de água no solo e atmosfera, condições ambientais típicas do semiárido. Portanto, o estudo que foi executado nessa proposta pode revelar marcadores celulares associados com a plasticidade metabólica necessária para a transição da assimilação do carbono C3-CAM em plantas de *Pereskia aculeata* Mill, os quais poderão ser previstos de ocorrência ampla na biologia vegetal.

1.2 Impactos de Variáveis Abióticas na Biologia Vegetal

O déficit hídrico, atribuído à baixa disponibilidade de água no solo, representa o principal fator abiótico limitante para o crescimento vegetal em regiões áridas e semiáridas no mundo (Mofokeng et al. 2015). Nessas regiões do globo, essa condição hídrica está sempre associada com temperaturas elevadas e com o excesso de radiação solar, fatores que atuando isoladamente ou combinados afetam severamente processos metabólicos essenciais para o crescimento e rendimento vegetal, como a assimilação de carbono, comprometendo dessa forma a atividade agrícola (Perdomo et al., 2017). Mathur et al. (2014) e Singh et al. (2014) apontam que a fotossíntese é altamente

afetada em função dessas variáveis ambientais.

A alta concentração de energia advinda da radiação solar, principalmente em ambientes semiáridos pode causar distúrbios fisiológicos nos vegetais, como a fotoinibição, porém, há algumas espécies que integram o grupo das cactáceas que podem suportar essa condição (Arroyo-Pérez et al. 2017). Dependendo da intensidade da luz, características biológicas das plantas são impulsionadas, por exemplo, um diodo emissor de luz na região do vermelho propicia um aumento no comprimento foliar (Anuchai e Hsieh 2017). Altas luminosidades resultam em acréscimo de temperatura, podendo causar um estresse térmico. Nessa linha, Krause et al. (2016) afirmam que, em espécies CAM, a concentração elevada de malato no vacúolo pode ocasionar prejuízos à estruturas pertencentes ao citoplasma. Adicionalmente, Chaves et al. (2015) estudando a bromeliácea *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B.Sm observaram que a baixa tolerância ao estresse térmico estava relacionada à grande concentração de Malato nessa organela.

A seca, causada por déficit hídrico significativo, é responsável por diminuir a produtividade e a atividade biológica das espécies vegetais, assim prejudicando a economia de setores agrícolas. Logo, é conveniente conhecer os mecanismos de tolerância e resistência, assim como a expressão de genes chaves em resposta a esse componente abiótico a fim de compreender a sua ecofisiologia em ecossistemas naturais e agroecossistemas (Fang e Xiong 2015). A partir disso, é possível elaborar novas tecnologias que culminem no aumento da produção agrícola e na manutenção do estabelecimento vegetal nesses ambientes (Fang e Xiong 2015).

A exemplo disso, Takahashi et al. (2018) perceberam que plantas de *Arabidopsis* conseguem antecipar a seca através da síntese de um hormônio peptídico transportador de longa distância denominado CLE25, que se liga a um receptor BAM1-BAM3, resultando na modulação da atividade estomática através de ácido Abscísico (ABA) (Christmann e Grill 2018) (Figura 1). Por outro lado, Oliveira et al. (2018), estudando a Aroeira do Sertão (*Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae)), uma espécie do semiárido Brasileiro, constataram uma tolerância moderada à seca quando inoculada com uma bactéria promotora do crescimento *Azospirillum lipoferum*.

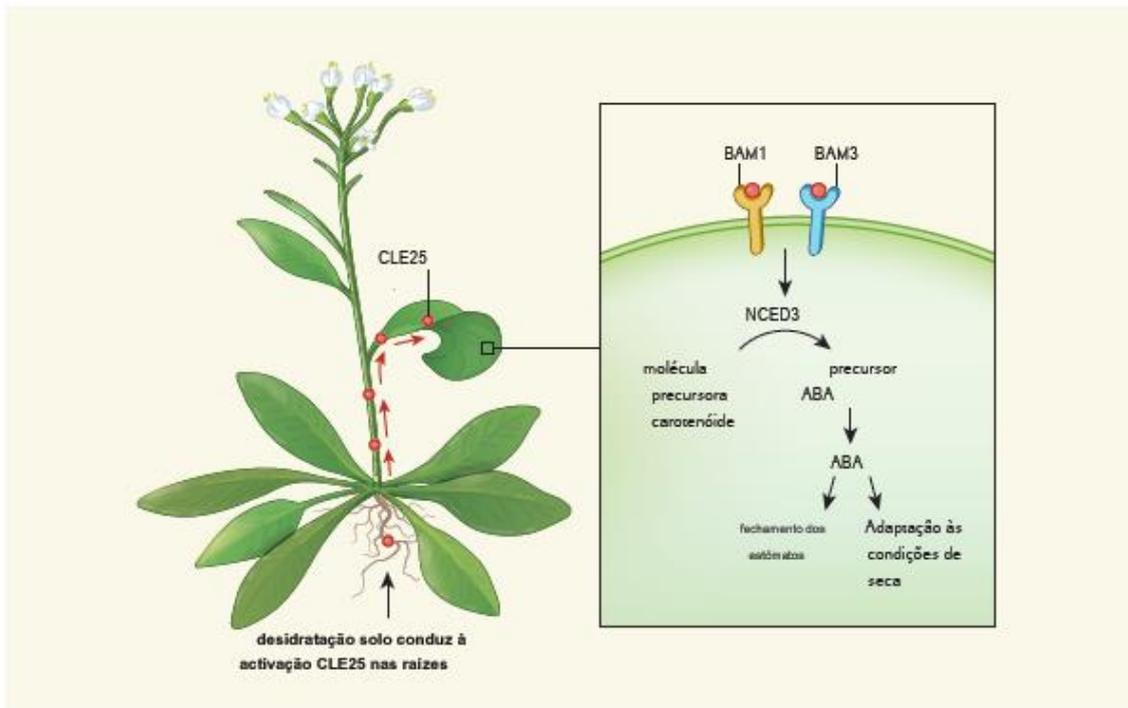


Figura 1 – Mecanismo de modulação estomática via ácido abscísico (ABA) em plantas de *Arabidopsis thaliana* por sinalização de um peptídeo à longa distância em resposta à seca. Fonte: Christmann e Grill (2018).

1.3 Modelos Vegetais C3, C4 e CAM

O processo fotossintético engloba as reações luminosas, as quais estão compreendidas na fase fotoquímica, enquanto que as reações que dependem indiretamente da luminosidade localizam-se na etapa bioquímica. Adicionalmente, as plantas superiores possuem três tipos de sistemas fotossintéticos quanto à fixação de carbono: C3, C4 e CAM (Aubry et al. 2011; Yamori et al. 2013; Habibi 2016). Plantas conhecidas fisiologicamente como C3 realizam a etapa bioquímica clássica da fotossíntese conhecida como ciclo de Calvin-Benson, onde o CO₂ reage com um açúcar de 5 carbonos, a Ribulose-1,5-Bifosfato (RuBP), reação catalisada pela enzima Ribulose-1,5-Bifosfato Carboxilase/Oxigenase (RUBISCO), resultando em uma triose fosfato (Gliceraldeído-3-Fosfato) (Michelet et al. 2013; Sharkey e Weise 2016) (Figura 2).

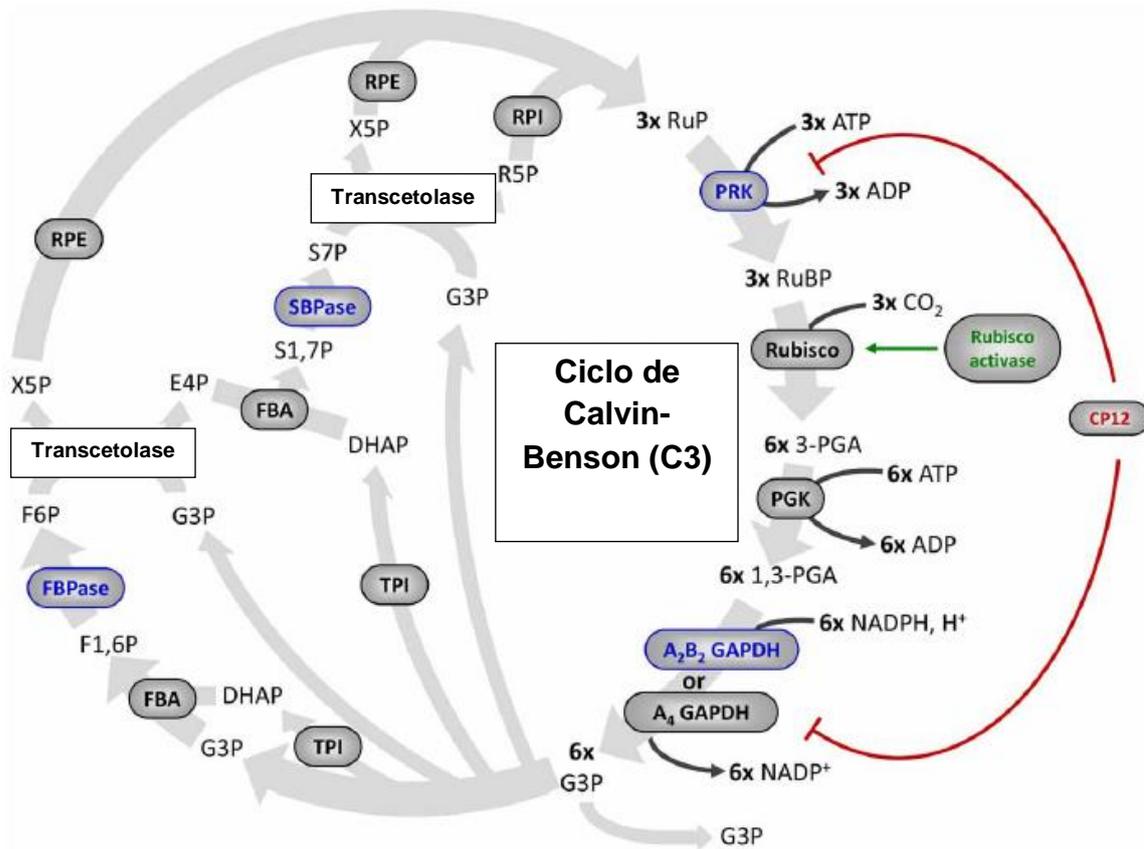


Figura 2 – Reações metabólicas que participam do ciclo de Calvin-Benson (C3). Fonte: Adaptado de Michelet et al. (2013).

Por outro lado, plantas do tipo C4 fixam carbono primariamente por ação da enzima Fosfoenolpiruvato Carboxilase (PEPC) (Stata et al. 2014) e possuem uma anatomia foliar peculiar com dois tipos de células mais especializadas: células do mesófilo e células da bainha do feixe vascular (Leegood, 2002; Aubry et al. 2011). Nesse processo, o CO₂ é metabolizado em Oxaloacetato e posteriormente a Malato ou Aspartato, ácidos de quatro carbonos (Aubry et al. 2011) (Figura 3). Esse fenótipo morfofisiológico faz com que esses vegetais minimizem o processo fotorrespiratório. Assim, plantas com esse sistema de metabolismo do carbono conseguem maximizar a fotossíntese mesmo em regiões de climas com temperaturas elevadas (Aubry et al. 2011).

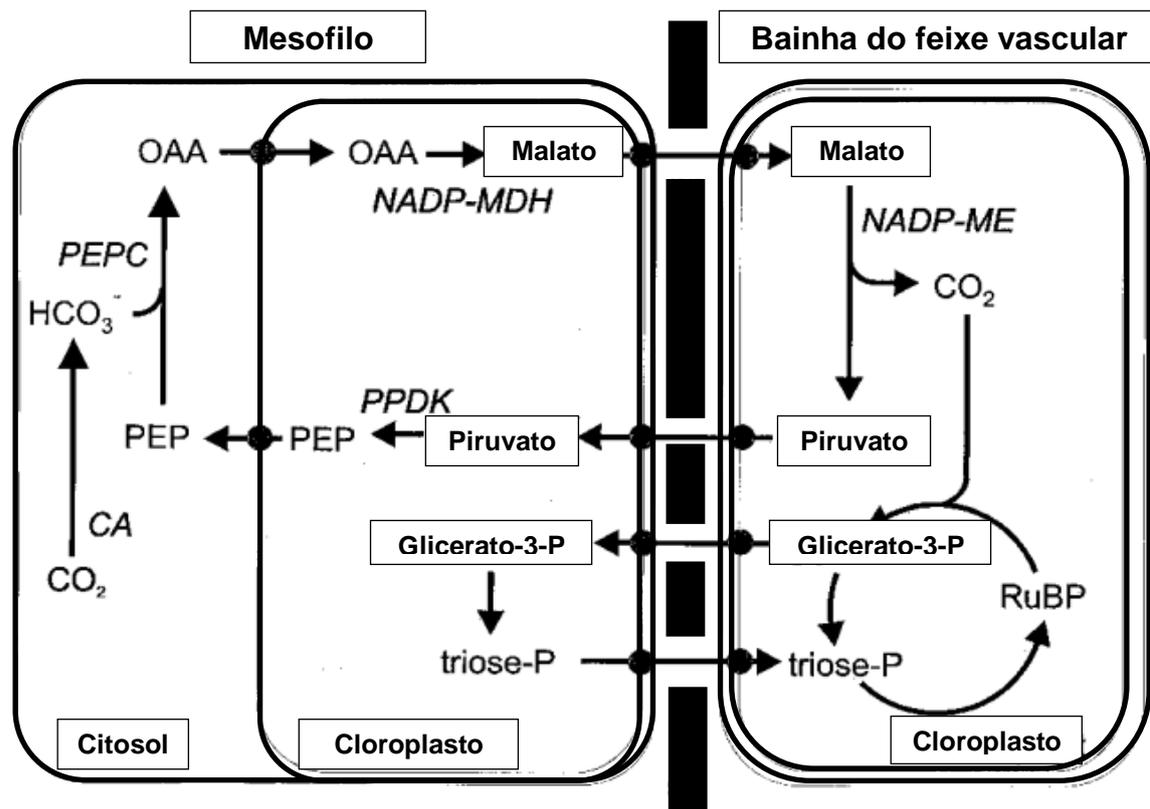


Figura 3 – Esquema geral do sistema de fotossíntese encontrado em plantas C4. Fonte: Adaptado de Leegood (2002).

Devido às condições peculiares em ecossistemas semiáridos, a flora local tende a apresentar novas características adaptativas ou um ajustamento fisiológico em resposta ao estresse abiótico, como o déficit hídrico, assim potencializando a sua maquinaria bioquímica. Esse comportamento pode ser observado em plantas que apresentam o sistema fotossintético do tipo metabolismo ácido das crassuláceas (CAM), fechando os estômatos em decorrência da alta luminosidade (Black e Osmond 2003), o que diminui a transpiração (perda de vapor d'água por gradiente de déficit de pressão de vapor) e a fotorrespiração, culminado no aumento da eficiência no uso da água (Borland et al. 2014; Hartwell et al. 2016).

A assimilação fotossintética pelo sistema CAM pode operar em situações em que o ambiente limita as condições normais da planta. Em baixa disponibilidade hídrica, o metabolismo ácido moderado atenua a fotossíntese líquida em resposta a esse estresse, porém, preserva os centros de reação do fotossistema II (PSII), oferecendo uma fotoproteção (Pikart et al. 2018). Em contrapartida, os vegetais que possuem esse tipo

de fotossíntese conseguem manter um potencial hídrico celular aceitável, por possuir tecidos especializados, contendo parênquima aquífero no cladódio e em folhas verdadeiras (ex: agaváceas e cactáceas) (Owen et al. 2016). Fisiologicamente, o ciclo CAM (Figura 4) é similar ao ciclo C4 (Figura 4). No entanto, na rota CAM, as trocas gasosas ocorrem no período noturno, onde o carbono atmosférico é fixado pela enzima Fosfoenolpiruvato Carboxilase (PEPC), que catalisa a reação de carboxilação adicionando carbono ao Fosfoenolpiruvato (PEP) e gerando um ácido orgânico de quatro carbonos, o ácido Oxaloacético, na forma desprotonada (Oxaloacetato). Posteriormente, através da reação catalisada pela enzima Desidrogenase do Malato (MDH), o oxaloacetato é transformado em ácido Málico, outro ácido de quatro carbonos que é produzido na forma de Malato no citosol com consumo de NADPH (Matsuoka et al. 2018). Na etapa seguinte, o malato é convertido em ácido Málico que se acumula nos vacúolos no período noturno (fase I). No entanto, durante o dia, esse composto é translocado para os cloroplastos onde é descarboxilado, formando novamente Malato e liberando CO₂, que reage com a RuBP por meio da RUBISCO (fase II), o que inicia o ciclo de Calvin (C3) normalmente (Figura 3) (fase III). (Christin et al. 2014; Matsuoka et al. 2018; Pikart et al. 2018). Na fase IV, as plantas CAM voltam a assimilar carbono atmosférico devido à abertura estomática no final da tarde, ocasionada pela deficiência de CO₂ interno e de Malato (Matusoka et al. 2018). Uma das justificativas do metabolismo CAM é sua capacidade de neutralizar quase que completamente a atividade Oxigenase da RUBISCO, devido à alta concentração de CO₂ intercelular, diminuindo assim a fotorrespiração e, conseqüentemente aumentando a eficiência na fixação de carbono (Wolfe e Tonsor 2014). No entanto, baixas concentrações impulsionam as reações fotorrespiratórias (Wolfe e Tonsor 2014).

1.4 Plasticidade CAM em Plantas Sujeitas a Estresses Abióticos

O ambiente tem a capacidade de modular o modo de assimilação e fixação do carbono nas plantas (Habibi 2016; Holtum et al. 2017; Winter e Holtum, 2017). Em outras palavras, as plantas que se comportam como C3 ou C4 também podem metabolizar carbono pela via CAM (Winter e Holtum 2017). Nesse contexto, podem-se classificar as plantas CAM em diversos tipos quanto à plasticidade fotossintética (Habibi 2016). Essa classificação é baseada em medidas de atividade estomática, assimilação líquida de carbono e variações na acidez dos tecidos foliares (Figura 5).

É demonstrado que a plasticidade na rota CAM pode ocorrer em função do

CAM dependendo das condições ambientais (Holtum et al. 2017; Winter e Holtum 2017). Por exemplo, em situações onde o balanço hídrico do ecossistema é muito positivo, ou seja, com grande disponibilidade de água, foi verificado que algumas espécies realizavam o metabolismo do carbono na rota C3/C4, enquanto que, com a chegada da época da estiagem, essas mesmas plantas realizavam a rota CAM. Logo, espécies com essas características podem ser classificadas como plantas intermediárias C3-CAM, C4-CAM ou plantas CAM facultativas (Facultative CAM) (Holtum et al. 2017; Winter e Holtum 2017).

Esse mecanismo de assimilação de carbono permite que as espécies maximizem sua produtividade via rota C3/C4 quando a disponibilidade hídrica é significativa, enquanto que, na rota CAM, há a maximização da eficiência do uso da água (EUA) no período de escassez hídrica, através da diminuição da transpiração (Holtum et al. 2017; Winter e Holtum, 2017). No entanto, Holtum e Winter (2014) submeteram plantas de *Agave angustifolia* Haw., (Asparagaceae), uma espécie do caribe, à diferentes níveis de temperatura e verificaram que, a partir de dados de acidez titulável, a capacidade de transição no sistema fotossintético dessas plantas é limitada. Em um estudo mais recente, Rodríguez-Escriba et al. (2015) montaram um experimento de campo e em casa de vegetação com plantas de abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merr.) e conseguiram induzir nessa espécie o metabolismo CAM sob efeito da alta densidade de fluxo de fótons ($PPF=800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), com condições de temperatura e umidade monitoradas ao longo do dia.

Recentemente, Matsuoka et al. (2018) estudando a espécie halófila *Mesembryanthemum crystallinum* L., pertencente a família Aizoaceae, conseguiram estimar a indução do metabolismo CAM em substrato salino contendo concentração específica de cloreto de sódio (NaCl) a partir de valores de coeficiente de *quenching* não-fotoquímico (NPQ) durante o período noturno. Essa variável quântica reflete o quanto a planta está dissipando energia proveniente dos fótons em forma de calor (Baker 2008). Em *Mesembryanthemum crystallinum*, espécie modelo C3-CAM, a indução do metabolismo CAM ocorre por influência da salinidade (Matusoka et al. 2018). Nesse contexto, em modo C3, a concentração do pigmento zeaxantina causa a abertura estomática sob a influência da radiação na região do azul. Todavia, em modo CAM, o aumento do pigmento é bloqueado, causando o fechamento estomático sob o efeito da radiação supracitada (Murchie e Niyogi 2017).

Habibi e Hajiboland (2012) analisaram a CAM facultativa *Sedum album* L.

(Crassulaceae) e constataram uma ascendente na acidez dos tecidos com aumento da escassez hídrica, especificamente, após quadro dias de tratamento de estresse hídrico. Holtum et al. (2017) usando um sistema contínuo de trocas gasosas e dados de acidez titulável avaliaram a transição em plantas de *Calandrinia* (Montiaceae) em uma região árida da Austrália e verificaram a predominância da fotossíntese CAM com suspensão integral da irrigação, e que quando são reidratadas, essas espécies transitam novamente para a rota C3, processo denominado de reversão. Em relação a plantas facultativas do tipo C4-CAM, acredita-se que esse comportamento ocorre somente em espécies da família Portulacaceae (Edwards e Ogburn 2012; Christin et al. 2014; Winter e Holtum 2017).

As espécies CAM facultativas apresentam uma grande variação diurna da acidez e funcionam como organismos híbridos intermediários C3-CAM ou C4-CAM (Cushman 2001). Em contrapartida, foram identificadas espécies com características distintas das plantas CAM facultativas. Nesse caso, algumas destas podem ser denominadas de plantas CAM-*Cycling*, ou seja, plantas com padrões de trocas gasosas similares a plantas C3 no período diurno, enquanto comportam-se como CAM no período noturno quando sujeitas a condições abióticas adversas (Cushman 2001; Habibi 2016; Scarano et al. 2016). Além, disso, plantas CAM-*Cycling* possuem uma baixa variação diurna da acidez em comparação às plantas CAM facultativas e são mais similares a plantas C3 fisiologicamente (Cushman 2001).

Adicionalmente, vegetais com essas características mantêm os estômatos fechados durante a noite e assimilam CO₂ noturno advindo da respiração celular para síntese dos orgânicos típicos do ciclo CAM (Scarano et al. 2016). Em relação a esse conceito de reaproveitamento do CO₂ eliminado na respiração, essas plantas podem ser também denominadas de plantas CAM recicladoras. Além disso, o mecanismo CAM-*Cycling* pode operar em ecossistemas em tempos de seca com o intuito de minimizar a perda de CO₂ durante a noite e garantir a máxima atividade da RUBISCO durante o dia em modo C₃ (Sipes e Ting 1985; Ting 1985; Lüttge 2004; Scarano et al. 2016). Acredita-se também que esse modo CAM diminua os impactos impostos pela fotoinibição causados pela alta luminosidade, preservando a integridade do aparato fotossintético (Sacarano et al. 2016).

Talinum triangulare (Jacq.) Willd., Talinaceae, é outra espécie com CAM induzível bastante estudada (Winter e Holtum 2014; Brilhaus et al. 2016; Montero et al. 2018). Por exemplo, Montero et al. (2018) induziram o metabolismo CAM nessa

espécie no modo reciclador aplicando tratamento salino, enquanto Brillhaus et al. (2016) verificaram a transição C3-CAM por meio do déficit hídrico. Nesse segundo caso o estudo envolveu análise de transcriptoma dessa espécie quando submetida à seca, ou seja, como é modulada a sinalização e síntese de compostos chave envolvidos na transcrição de enzimas que participam de rotas relacionadas com a indução do metabolismo CAM, como a do ácido Abscísico (ABA), nessa condição. Além disso, Scarano et al. (2016) constataram o metabolismo CAM-Cycling em plantas epífitas de *Clusia arrudae* Planchon & Triana (Clusiaceae) em uma região de cerrado no Brasil durante uma estação seca. Paralelamente, Habibi e Hajiboland (2012) estudaram a espécie CAM-Cycling *Sedum stoloniferum* L. (Crassulaceae) e verificaram um aumento na acidez dos tecidos após 12 dias aplicação de tratamento de seca.

Em alguns trabalhos, foi constatado que algumas famílias de plantas quando estão expostas a condições ambientais extremas, como lugares que enfrentam secas longas, acionam um mecanismo de metabolismo CAM que mantém os estômatos fechados permanentemente (Rayder e Ting 1983; Cushman 2001). Esses vegetais são denominados de CAM-Idling, plantas que não realizam trocas gasosas e possuem baixíssima variação diurna da acidez dos tecidos (Sipes e Ting 1985; Cushman 2001).

Como a assimilação de CO₂ atmosférico é quase nula, é necessária a reciclagem do CO₂ liberado no ciclo do ácido Tricarboxílico (TCA) (Sipes e Ting 1985; Habibi 2016). Devido à inativação da atividade estomática, as plantas CAM-Idling podem ser denominadas de plantas CAM inativadoras ou inativantes. Além disso, em condições ótimas esses vegetais podem operar em modo C3 ou em modo CAM constitutivo/obrigatório (Rayder e Ting 1983). Os vegetais CAM-Idling possuem um padrão de acidez diurna semelhante a plantas CAM obrigatórias, e pode-se observar uma semelhança entre esses dois grupos fisiologicamente (Rayder e Ting 1983). CAM-Idling foi verificado nas famílias Cactaceae (Nobel 1977; Szarek et al. 1973; Rayder e Ting 1981) Piperaceae (Hanscom e Ting 1978), Agavaceae (Nobel 1976), Curcubitaceae (Szarek e Ting 1973) e Asclepiadaceae (Rayder e Ting 1983).

1.5 Família Cactaceae como uma Potencial Moduladora C3-CAM

As Cactáceas integram o grupo das plantas superiores (angiospermas) e distribuem-se por diversos tipos de fitofisionomias, dentre elas, florestas tropicais secas, savanas, campos rupestres e as vegetações restingas. Além disso, diversos gêneros compõem essa família, com aproximadamente 127 representantes desse táxon, segundo

o International Cactaceae Systematics Group, os quais contem cerca de 1500 (Filho et al. 2018) a 1816 espécies (Menezes et al. 2013). Esse grupo de plantas reproduzem-se de maneira sexuada e assexuada (Abud et al. 2010), logo, podem ser propagadas manualmente via estaquia (Telles et al. 2016). As Cactaceae agrupam 4 subfamílias: Maihuenoideae, Pereskeoideae, Opuntioideae e Cactoideae (Filho et al. 2018), sendo que a primeira não ocorre no Brasil (Zappy et al. 2015).

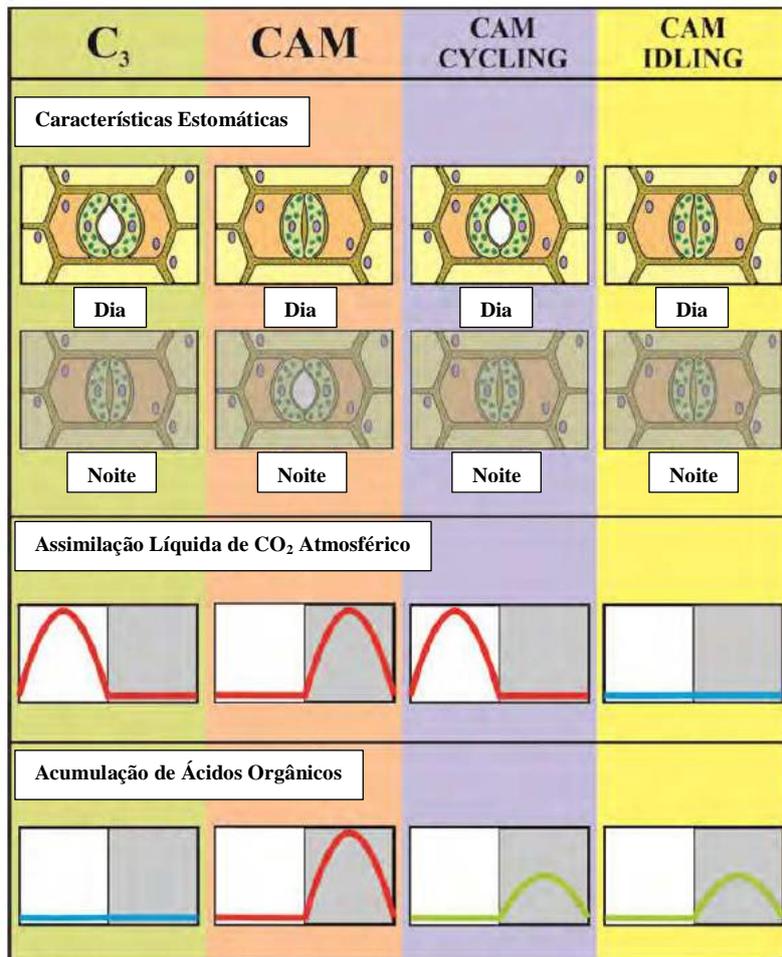


Figura 5 – Comportamento estomático, assimilação líquida de CO₂ atmosférico e acúmulo de ácidos orgânicos diários durante o período diurno e noturno em plantas operando em modo C₃, CAM, CAM-Cycling e CAM-Idling. Fonte: Adaptado de Kerbauy et al. (2012).

Indivíduos dessa família estão presentes direta ou indiretamente no dia a dia do povo brasileiro, principalmente na região nordeste, representando de maneira peculiar à realidade do semiárido nacional e a cultura daquela região, como por exemplo, nas músicas de artistas consagrados locais e nacionalmente (Filho et al. 2018). Enfatizando

a distribuição dessa família pelo semiárido brasileiro, Filho et al. (2018) apresentam alguns exemplares de Cactáceas da flora sergipana (Figura 6).



Figura 6 – Exemplares de Cactáceas encontradas no estado de Sergipe. Fonte: Filho et al. (2018). Onde: *Melocactus sergipensis* (a), *M. zehntneri* (b) e *M. violaceus* (c), informalmente denominada de coroa-de-frade (Cactoideae), respectivamente; *Tacinga inamoena* ou quipá (Opuntioideae) (d); *Nopalea cochenillífera* (Opuntioideae) ou palma doce (e); *Brasiliopuntia brasiliensis* ou palma miúda (Opuntioideae) (f); *Pilosocereus gounellei* ou xique-xique (Cactoideae) (g); *Opuntia dillenii* ou palma santa (Opuntioideae) (h); *Pilosocereus cattingicola* ou facheiro (Cactoideae) (i); *Cereus jamacaru* ou mandacaru (Cactoideae) (j) e *Hylocereus undatus*, ou pitaia (Cactoideae) (l).

Todos os indivíduos apresentados contém uma característica marcante em comum: caules fotossintetizantes, com presença de cladódios e folhas modificadas em espinhos, com exceção de indivíduos das subfamílias Pereskeoideae (gênero *Pereskia*) e aparentemente algumas espécies de Opuntioideae (gênero *Quiabentia*), que apresentam espinhos e limbos expandidos (Zappy et al. 2015) (Figura 7). Devido à presença de folhas não modificadas, a subfamília Pereskeoideae, especificamente as espécies do gênero *Pereskia* (popularmente conhecidas como Ora-Pro-Nóbis), podem estar

relacionadas com os ancestrais evolutivos das primeiras Cactáceas (Andrade 2008) (Figura 8).

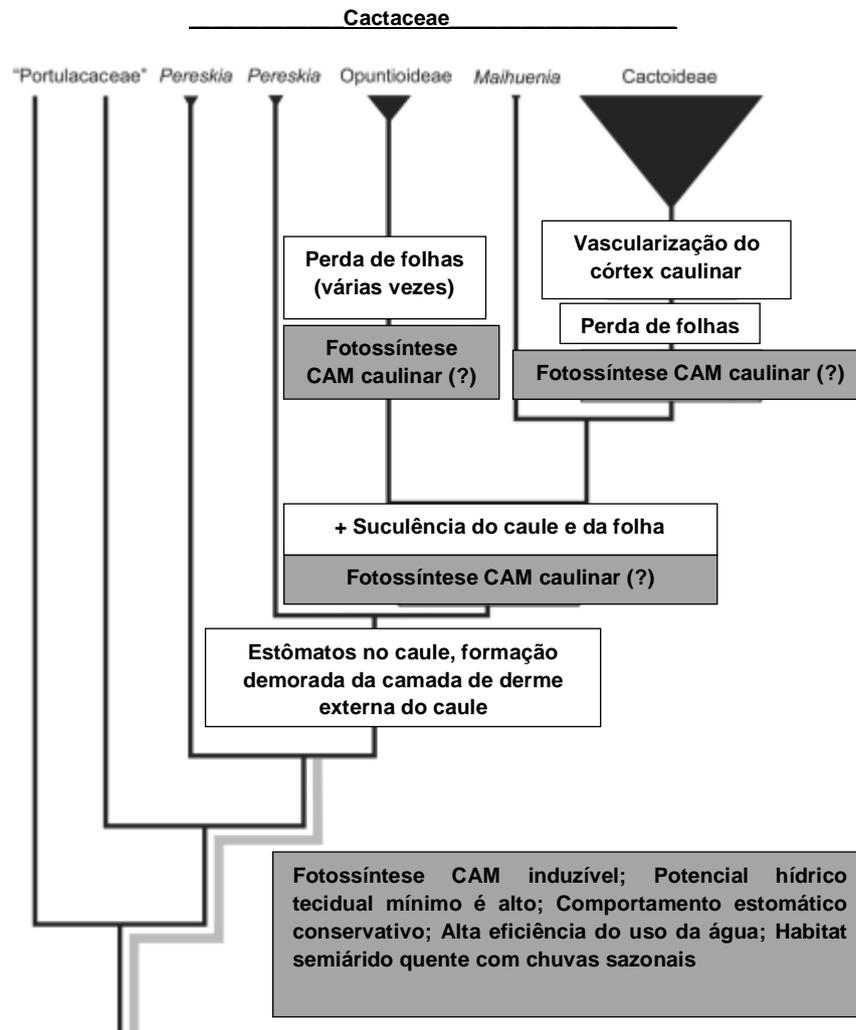


Figura 7 – Eventos relativos à evolução dos cactos. Onde: informações dentro de retângulos brancos são mais precisas; informações de retângulos cinzas são mais especulativas; triângulos pretos invertidos grandes indicam a grande diversidade de espécies em relação aos triângulos invertidos pequenos. Fonte: Adaptado de Edwards e Donoghue (2006).

A plasticidade na fotossíntese CAM parece ser mais comum do que se imaginava (Holtum et al. 2017). Por exemplo, são relatadas várias características CAM em espécies de *Pereskia* (Edwards e Diaz 2006; Edwards e Donoghue 2006) (Tabela 1). Paralelamente, Edwards e Diaz (2006) apresentaram a indução de CAM em espécies da subfamília Pereskeoideae: *Pereskia guamacho*, *P. aureiflora*, *P. zinniiflora*, *P.*

quisqueyana, *P. aculeata*, *P. horrida*, *P. sacharosa* e *P. grandifolia*. Em *P. guamacho* a transição C3 para CAM foi observada quando a planta foi submetida aos efeitos da seca (Edwards e Diaz 2006).

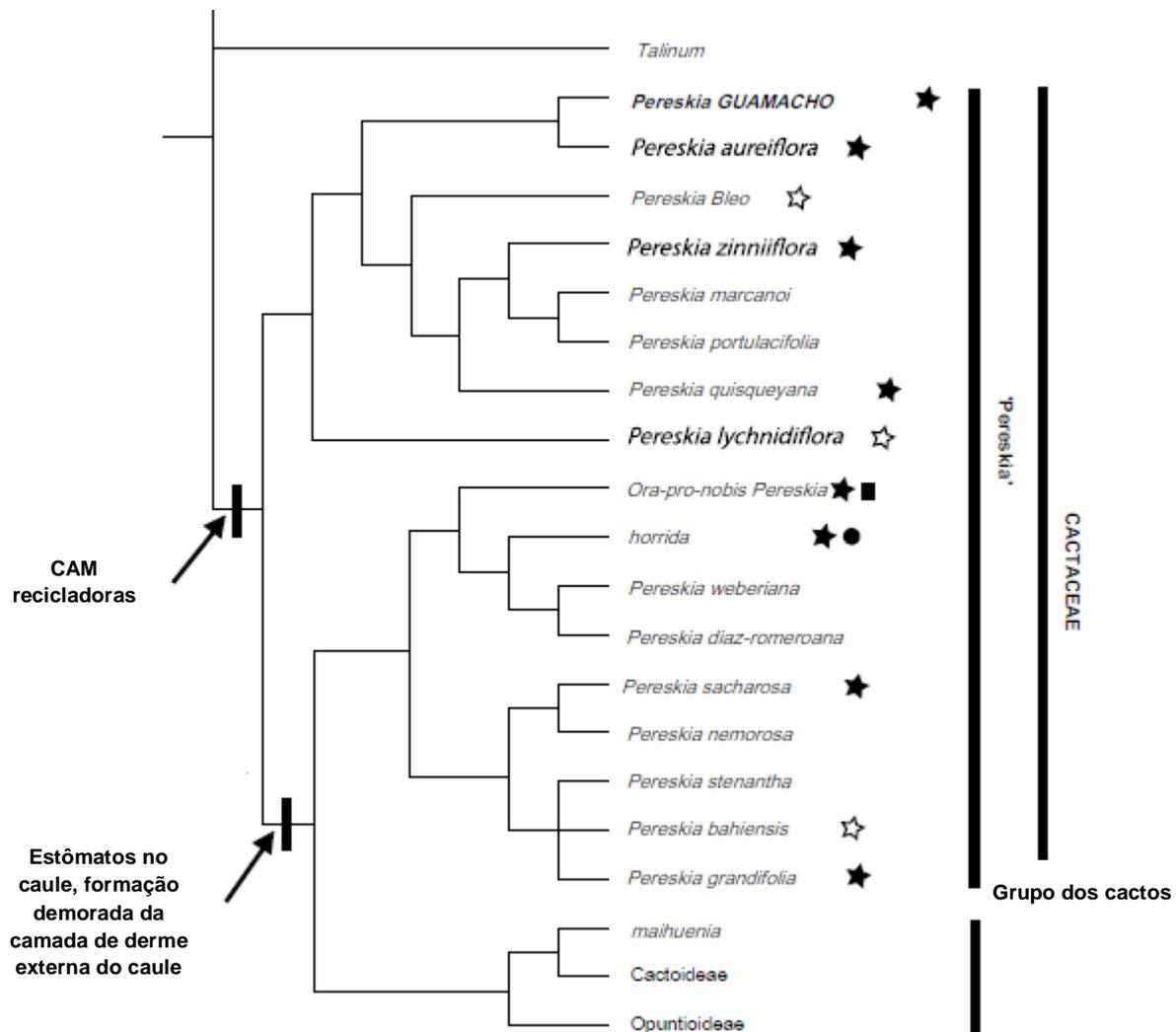


Figura 8 – Cladograma envolvendo a filogenia de espécies da família Cactaceae. Onde, estrelas brancas significam espécies em que foi estudada a plasticidade da fotossíntese; estrelas pretas significam espécies que apresentam o sistema CAM reciclador e quadrados negros relativos às espécies que possuem o sistema CAM inativador. Fonte: Adaptado de Edwards e Diaz (2006).

1.6 Características de Ora-Pro-Nóbis

Pereskia aculeata Mill., (Figura 9) informalmente denominada de Azedinha, Espinho preto, Surucucú, Cipó Santo, Lobolôbô, Espinho de Santo Antônio ou mais conhecida como Ora-Pro-Nóbis, é uma planta de médio porte que compõe a família

Cactaceae, subfamília Pereskeoideae a qual possui hábito de liana (trepadeira) e distribui-se, nacionalmente, nas florestas tropicais secas, úmidas e savanas (Zappi e Taylor 2015).

Tabela 1 – Traços do uso hídrico ecológico de ancestral de *Pereskia* e o grupo dos cactos. Fonte: Adaptado de Edwards e Donoghue (2006).

Informações ecofisiológicas	<i>Pereskia A</i>	<i>Pereskia B</i>	Grupo dos cactos
Habitat	semiárido	semiárido	Várias regiões, mais diversa no semiárido
Profundidade de enraizamento	raso	raso	raso
Resposta aos eventos de chuva	rápida	rápida	-
Potencial hídrico tecidual mínimo	alto	alto	alto
Comportamento estomático	conservativo	conservativo	conservativo
Taxa de Transpiração máxima	baixa	baixa	baixa
Eficiência do uso da água fotossintética	alta	alta	alta
Armazenamento hídrico tecidual	levemente suculenta	levemente suculenta	muito suculenta
Metabolismo de carbono fotossintético	C3 com CAM induzível	C3 com CAM induzível	CAM

Em termos organográficos, apresenta folhas verdadeiras totalmente expandidas, embora seja uma cactácea. Além disso, os limbos foliares são ovais com nervuras principais acródomas, caule com presença de acúleos, inflorescência cimosa e frutos globulares, chegando a ter cinco sementes. (Zappi e Taylor 2015). Por outro lado, não há informações na literatura a respeito de características da raiz desse vegetal. A *Ora-Pro-Nóbis* é bastante tolerante à seca, podendo se estabelecer em ambientes semiáridos, logo, há a possibilidade desta planta se tornar fonte de recurso alimentício (nutricional) e medicinal para a população, já que suas folhas são ricas em proteínas, fenóis e outros compostos antioxidantes (Silva et al. 2017). Entretanto, é relatado que essa espécie

prejudica a biodiversidade de espécies de plantas nativas em regiões da África do sul, sendo preciso estudos de controle biológico dessa planta (Pikart et al. 2017).



Figura 9 – Plantas de Ora-Pro-Nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) cultivadas em vasos e sujeitas às condições de casa de vegetação em uma região semiárida no município de Serra Talhada, PE. Fonte: O Autor.

Além disso, a espécie tem uma importância relevante quando se trata de alimentos e nutrientes, pois, as folhas possuem grandes quantidades de ferro e cálcio e podem ser adicionadas a outros ingredientes para preparos de diversos pratos (Kazama et al. 2012). Dentre os alimentos, a Ora-Pro-Nóbis pode ser utilizada para confecção de farinhas, saladas e macarrão (Telles et al. 2016). A Ora-Pro-Nóbis, devido ao alto teor proteico foliar e de aminoácidos como lisina e fibras são denominadas de carne de pobre, chegando a superar hortaliças que são usadas frequentemente (Telles et al. 2016). Portanto, se reforça a ideia dessa espécie se tornar fundamental para vários estudos botânicos com a finalidade de aproveitamento do seu alto potencial produtivo (Silva-Júnior et al. 2010).

1.7 Referências

- Abreu, M. E. et al. Antioxidant capacity along the leaf blade of the C3-CAM facultative bromeliad *Guzmania monostachia* under water deficit conditions. **Functional Plant Biology**, v. 45, n. 6, p. 620-629, 2018.
- Abud, H. F. et al. Germinação e expressão morfológica de frutos, sementes e plântulas de *Pilosocereus pachycladus* Ritter. **Revista Ciências Agronômica**, v. 41, n. 3, p. 468-474, 2010.
- Anuchai, J; Hsieh, C-H. Effect of change in light quality on physiological transformation of *in vitro Phalaenopsis* 'Fortune Saltzman' seedlings during the growth period. **The Horticulture Journal**, v. 86, n. 3, p. 395-402, 2017.
- Arroyo-Perez, E. et al. High tolerance to high-light conditions for protected species *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Cactaceae). **Conservation Physiology**, v. 5, p. 1-7, 2017.
- Aubry, S. et al. The role of proteins in C3 plants prior to their recruitment into C4 pathway. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 9, p. 3049-3059, 2011.
- Baker, N. R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 89-113, 2008.
- Basu, S. et al. Plant adaptation to drought stress. **F1000 Research**, v. 5, p. 1-10, 2016.
- Black, C. C.; Osmond, C. B. Crassulacean acid metabolism photosynthesis: 'working the night shift'. **Photosynthesis Research**, v. 76, n. 1-3, p. 329-341, 2003.
- Borland, A. M. et al. Engineering crassulacean acid metabolism to improve water-use efficiency. **Trends Plant Science**, v. 19, n. 5, p. 327-338, 2014.
- Borland, A, M. et al. The photosynthetic plasticity of crassulacean acid metabolism: an evolutionary innovation for sustainable productivity in a changing world. **New Phytologist**, v. 191, n. 3, p. 619-633, 2011.
- Brilhaus, D. et al. Reversible burst of transcriptional changes induction of crassulacean acid metabolism (CAM) in *Talinum triangulare*. **Plant Physiology**, v. 170, n. 1, p.102-122, 2016.

- Casaroli, D. et al. Radiação solar e aspectos fisiológicos na cultura de soja – uma revisão. **Revista da FZVA**, v. 14, n. 12, p. 102-120, 2007.
- Chaves, C. J. N. et al. Temperature modulation of thermal tolerance of a CAM-tank bromeliad and the relationship with acid accumulation in diferente leaf regions. **Physiologia Plantarum**, v. 154, p. 500-510, 2015.
- Christmann, A.; Grill, E. Peptide signal alerts plants to drought. **Nature**, v. 556, n. 7700, p. 178-179, 2018.
- Christin, P-A. et al. Shared origins of a key enzyme during the evolution of C4 and CAM metabolism. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 13, p. 3609-3621, 2014.
- Cushman, J. C. Crassulacean acid metabolism. A plastic photosynthetic adaptation to arid environments. **Plant Physiology**, v. 12, n. 4, p. 1439-1448, 2001.
- Edwards, E. J.; Diaz, M. Ecological physiology of *Pereskia guamacho*, a cactus with leaves. **Plant, Cell and Environmet**, v. 29, n. 2, p. 247-259, 2006.
- Edwards, E. J.; Donoghue, M. J. *Pereskia* and the origin of the cactus life-form. **The American Naturalist**, v. 167, n. 6, p. 777-793, 2006.
- Edwards, E. J.; Ogburn, R. M. Angiosperm responses to a low-CO2 world: CAM and C4 photosynthesis as parallel evolutionary trajectories. **International Journal of Plant Sciences**, v. 173, n. 6, p. 724-733, 2012.
- Fang, Y.; Xiong, L. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, p. 673-689, 2015.
- Filho, B. et al. Levantamento etnobotânico da família Cactaceae no estado de Sergipe. **Revista Fitos**, v. 12, n. 1, p. 41-53, 2018.
- Habibi, G.; Hajiboland, R. Comparison of photosynthesis and antioxidative protection in *Sedum album* and *Sedum stoloniferum* (Crassulaceae) under water stress. **Photosynthetica**, v. 50, n. 4, p. 508-518, 2012.

Habibi, G. The role of crassulacean acid metabolism induction in plant adaptation to water deficit. In: AHMAD, P. (Ed.). **Water stress and crop plants: a sustainable approach**. 1. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2016. p. 12-23.

Hanscom, Z. III.; Ting, I. P. Responses of succulents to plant water stress. **Plant Physiology**, v. 63, n. 3, p. 327-330, 1978.

Hartwell, J. et al. Emerging model systems for functional genomics analysis of crassulacean acid metabolism. **Current Opinion in Plant biology**, v. 31, p. 100-108, 2016.

Hoffmann, A. M. et al. Acclimations to light quality on plant and leaf level affect the vulnerability of pepper (*Capsicum annuum* L.) to water deficit. **Journal of Plant Research**, v. 128, n. 2, p. 295-306, 2015.

Holtum, J. A. M. et al. Facultative CAM photosynthesis (crassulacean acid metabolism) in four species of *Calandrinia*, ephemeral succulents of arid Australia. **Photosynthesis Research**, v. 134, n. 1, p. 17-25, 2017.

Holtum, J. A. M.; Winter, K. Limited photosynthetic plasticity in the leaf-succulent CAM plant *Agave angustifolia* grown at different temperatures. **Functional Plant Biology**, v. 41, n. 8, p. 843-849, 2014.

Kazama, C. C. et al. Involvement of arginine-vasopressin in the diuretic and hypotensive effects of *Pereskia grandifolia* Haw. (Cactaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 1, p. 86-93, 2012.

Kerbauy, G. B. et al. Crassulacean Acid Metabolism in Epiphytic Orchids: Current Knowledge, Future Perspectives. In: NAJAFPOUR, M. M. (Ed.). **Applied Photosynthesis**. 1. ed. Rijeka: IntechOpen, 2012. p. 82-104.

Krause, G. H. et al. Protection by light against heat stress in leaves of tropical crassulacean acid metabolism plants containing high acid levels. **Functional Plant Biology**, v. 43, n. 11, p. 1061-1069, 2016.

Leegood, R. C. C₄ photosynthesis: principles of CO₂ concentration and prospects for its introduction into C₃ plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 369, p. 581-590, 2002.

- Lüttge, U. Ecophysiology of crassulacean acid metabolism (CAM). **Annals of Botany**, v. 93, n. 6, p. 629-652, 2004.
- Lüttge, U. Photosynthetic flexibility and ecophysiological plasticity: questions and lessons from *Clusia*, the only CAM tree, in the neotropics. **New Physiologist**, v. 171, n. 3, p. 7-25, 2006.
- Mathur, S. et al. Photosynthesis: response to high temperature stress. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 137, p. 116-126, 2014.
- Matsuoka, T. et al. Crassulacean acid metabolism induction in *Mesembryanthemum crystallinum* can be estimated by non-photochemical quenching upon actinic illumination during the dark period. **Plant and Cell Physiology**, v. 0, n. 0, p. 1-7, 2018.
- Menezes, M. O. T. et al. Flora do Ceará, Brasil: Cactaceae. **Rodriguésia**, v. 64, n. 4, 757-774, 2013.
- Michelet, L. et al. Redox regulation of the Calvin-Benson cycle: something old, something new. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. 470, p. 1-21, 2013.
- Mofokeng, M. M. et al. Growth of *Pelargonium sidoides* DC. in response to water and nitrogen level. **South African Journal of Botany**, v. 100, p. 183-189, 2015.
- Murchie, E. H.; Niyogi K. K. Manipulation of photoprotection to improve plant photosynthesis. **Plant Physiology**. v. 155, p. 86-92, 2011.
- Nobel, P. S. Water relations and photosynthesis of a barrel cactus, *Ferocactus acanthodes* in the Colorado Desert. **Oecologia**, v. 27, n. 2, p.117-133, 1977.
- Montero, E. et al. Salinity induction of recycling crassulacean acid metabolism and salt tolerance in plants of *Talinum triangulare*. **Annals of Botany**, v. 121, n. 7, p. 1333-1342, 2018.
- Nobel, P. S. Water relations and photosynthesis of a desert CAM plant, *Agave deserti*. **Plant Physiology**, v. 58, n. 4, p. 576-582, 1976.

Oliveira, D. M. et al. Inoculation of plant-growth-promoting rhizobacteria in *Myracrodruon urundeuva* Allemão supports in tolerance to drought stress. **Journal of Plant Interactions**, v. 13, n. 1, p. 91-99, 2018.

Ortiz, N. et al. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi and/or bacteria to enhancing plant drought tolerance under natural soil conditions: Effectiveness of autochthonous or allochthonous strains. **Journal of Plant Physiology**, v. 175, p. 87-96, 2015.

Owen, N. A. et al. Crassulacean acid metabolism (CAM) offers sustainable bioenergy production and resilience to climate change, **Global Change Biology Bioenergy**, v. 8, p. 737-749, 2016.

Pikart, T. G. et al. A survey for potential biological control agents of *Pereskia aculeata* Miller (Cactaceae) in Brazil reveals two new species of *Horismenus* Walker (Hymenoptera: Eulophidae). **Zootaxa**, v. 4272, n. 3, p. 430-438, 2017.

Pikart, F. C. et al. The contribution of weak CAM to the photosynthetic metabolic activities of a bromeliad species under water deficit. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 123, p. 297-303, 2018.

Rayder, L.; Ting, I. P. CAM-idling in *Hoya carnosae* (Asclepiadaceae). **Photosynthesis Research**, v. 4, n. 3, p. 203-211, 1983.

Rayder, L.; Ting, I. P. Carbon metabolism in two species of *Pereskia* (Cactaceae). **Plant Physiology**, v. 68, n.1, p.139-142, 1981.

Rodríguez-Escriba, R. C. et al. High light intensity increases the CAM expression in “MD-2” micro-propagated pineapple plants at the end of the acclimatization stage. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, n. 19, p. 3109-3118, 2015.

Scarano, F. R. et al. Features of CAM-cycling expressed in dry season by terrestrial and epiphytic plants of *Clusia arrudae* Planchon & Triana in two rupestrian savannas of southeastern Brazil in comparison to the C3-species *Eremanthus glomerulatus* Less. **Trees**, v. 30, n. 3, p. 913-922, 2016.

Sharkey, T. D.; Weise, S. E. The glucose 6-phosphate shunt around the Calvin-Benson cycle. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 14, p. 4067-4077, 2016.

Silva, D. O. et al. Acute toxicity and citotoxicity of *Pereskia aculeata*, a highly nutritious cactaceae plant. **Journal of Medicinal Food**, v. 20, n. 4, p. 1-7, 2017.

Silva-Júnior, A. A. et al. Pão de ora-pro-nóbis - um novo conceito de alimentação funcional. **Agropecuária Catarinense**, v. 23, n. 1, p. 35-37, 2010.

Singh, J et al. Enhancing C3 photosynthesis: an outlook on feasible interventions for crop improvement. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, p. 1217-1230, 2014.

Sipes, D. L.; Ting, I. P. Crassulacean acid metabolism and crassulacean acid metabolism modifications in *Peperomia camptotricha*. **Plant Physiology**, v. 77, n. 1, p. 59-63, 1985.

Stata, M. et al. Mesophyll cells of C4 plants have fewer chloroplasts than those of closely related C3 plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 37, n. 11, p. 2587-2600, 2014.

Symeonakis, E.; Drake, N. Monitoring desertification and land degradation over sub-Saharan Africa. **International Journal of Remote Sensing**, v. 25, n. 3, p. 573-592, 2004.

Szarek, S. R. et al. Drought adaptation in *Opuntia basilaris*. Significance of recycling carbon through crassulacean acid metabolism. **Plant Physiology**, v. 52, n. 5, p. 539-541, 1973.

Szarek, S. R.; Ting, I. P. The occurrence of crassulacean acid metabolism among plants. **Photosynthetica**, v. 11, p. 330-342, 1973.

Takahashi, F. et al. A small peptide modulates stomatal control via abscisic acid in long-distance signaling. **Nature**, v. 556, n. 7700, p. 235-238, 2018.

Telles, C. C. et al. *Pereskia aculeata* (ora pro nobis). In: VIEIRA, F. R. et al. (Ed.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial. Plantas para o futuro – região centro-oeste**. 1. ed. Ministério do Meio Ambiente, 2016. p. 208-289.

Winter, K. et al. Drought-stress-induced up-regulação of CAM in seedlings of a tropical cactus, *Opuntia elatior*, operating predominantly in the C3 mode. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 11, p. 4037-4042, 2011.

Winter, K.; Holtum, J. A. M. Facultative crassulacean acid metabolism (CAM) in four small C3 and C4 leaf-succulents. **Australian Journal of Botany**, v. 65, n. 2, p. 103-108, 2017.

Winter, K.; Holtum, J. A. M. Facultative crassulacean acid metabolism (CAM) plants: powerful tools for unravelling the functional elements of CAM photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, p. 3425-3441, 2014.

Winter, K.; Holtum, J. A. M. How closely do the $\delta^{13}\text{C}$ values of crassulacean acid metabolism plants reflect the proportion of CO_2 fixed during day and night?. **Plant Physiology**, v. 129, n. 4, p. 1843-1851, 2002.

Wolfe, M. D.; Tonsor, S. J. Adaptation to spring heat and drought in northeastern Spanish *Arabidopsis thaliana*. **New Phytologist**, v. 201, n. 1, p. 323-324, 2014.

Yamori, W. et al. Temperature response of photosynthesis in C3, C4, and CAM plants: temperature acclimation and temperature adaptation. **Photosynthesis Research**, v. 119, v. 1-2, p. 101-117, 2014.

Yang, X. et al. A roadmap for research on crassulacean acid metabolism (CAM) to enhance sustainable food and bioenergy production in a hotter, drier world. **New Phytologist**, v. 207, n. 3, p. 491-504, 2015.

Zappi, D. et al. 2015. Cactaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB70>>. Acesso em: 02 Set. 2018

Zappi, D.; TAYLOR, N. 2015. Cactaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB1633>>. Acesso em: 05 Ago. 2018.

2 Capítulo II – Indução de CAM-Cycling reduz perdas noturnas de CO₂ e mantém a integridade do PSII em plantas de Ora-Pro-Nóbis sujeitas ao déficit hídrico

Resumo

Ora-Pro-Nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) é uma espécie com atividade predominante da rota C3 para assimilação de carbono sob as condições hídricas ótimas, porém apresenta potencial genético de plasticidade para induzir o metabolismo CAM sob o déficit hídrico. Essa transição C3/CAM representa uma importante estratégia de aclimação a seca, porém os mecanismos responsáveis pela transição são pouco conhecidos nessa espécie. O objetivo desse estudo foi caracterizar mudanças específicas no processo fotossintético durante a transição C3/CAM em plantas de Ora-Pro-Nóbis quando expostas ao déficit hídrico gradual com base nas trocas gasosas, atividade fotoquímica e acidez foliar. Foram realizados dois estudos, nos quais as plantas foram expostas ao déficit hídrico gradual seguido de reidratação sob as condições controladas (câmara de crescimento) e em casa de vegetação. Medidas de trocas gasosas e curva de indução fotoquímica foram realizadas associadas a medidas diurnas de acidez. Foi verificado um alto grau de fotoproteção e um declínio significativo da assimilação de CO₂ em plantas estressadas e baixa fixação noturna quando os estômatos estavam fechados, com pequena variação da acidez. Além disso, não foram constatadas diferenças nos valores de $\delta^{13}\text{C}$. Em plantas reidratadas, observaram-se padrões fisiológicos característicos de C3 similarmente às plantas controladas. Os dados mostram que plantas de Ora-Pro-Nóbis quando estão sujeitas ao déficit hídrico, podem realizar CAM-Cycling, uma forma de CAM de baixa intensidade caracterizada pela refixação de CO₂ respiratório noturno e retornar à rota C3 quando reidratadas. Essas mudanças metabólicas garantem um maior ganho líquido de carbono em relação às plantas quando mantem exclusivamente a via C3 de assimilação de carbono.

Palavras-Chave: Cactaceae, CAM-Cycling, Estresse Hídrico, Fixação Noturna, Metabolismo do carbono, Transição C3-CAM.

Abstract

Ora-Pro-Nobis (*Pereskia aculeata* Mill.) is a species with predominant activity of the C3 route for carbon assimilation under optimal water conditions, but it has the potential for genetic plasticity to induce or metabolize CAM under water deficit. This C3/CAM transition represents an important drought acclimatization strategy, but the mechanisms responsible for the transition are little known in this species. The aim of this study was to characterize specific changes in the photosynthetic process during the C3/CAM transition in Ora-Pro-Nobis plants when exposed to a gradual water deficit based on gas exchange, photochemical activity and leaf acidity. Two studies were carried out, in which the plants were exposed to a gradual water deficit followed by rewatering under controlled conditions (growth chamber) and in a greenhouse. Gas exchange measurements and photochemical induction curve were performed associated with daytime acidity measurements. There was a high degree of photoprotection and a significant decline in CO₂ assimilation in stressed plants and low nocturnal fixation when the stomata were closed, with little variation in acidity. In addition, no differences were found in the $\delta^{13}\text{C}$ values. In rewatered plants, physiological patterns characteristic of C3 were observed similarly to controlled plants. The data show that Ora-Pro-Nobis plants, when subjected to water deficit, can perform CAM-Cycling, a form of low-intensity CAM characterized by the re-fixation of nocturnal respiratory CO₂ and return to route C3 when rewatered. These metabolic changes guarantee a greater net carbon gain compared to plants when they exclusively maintain the C3 pathway of carbon assimilation.

Keywords: Cactaceae, C3-CAM shift, CAM-Cycling, Carbon Metabolism, Dark Fixation, Drought, Water Stress.

2.1 Introdução

O déficit hídrico é a principal causa da redução do crescimento e da produtividade de espécies agrícolas (Fathi e Tari 2016). Esse fator abiótico além de influenciar no menor acúmulo de biomassa na folha e raízes da planta, reduz significativamente a condutância estomática e a eficiência fotossintética (Blum 1997). No entanto, o nível de tolerância e resistência ao estresse hídrico é bastante variável entre as espécies vegetais (Kaiser 1987). Em lugares desérticos, onde predomina a escassez hídrica, habitam espécies onde a rota CAM (metabolismo ácido das crassuláceas) é determinada por esse parâmetro ambiental (Winter e Holtum 2017; Holtum et al. 2017). Esse estabelecimento é possível devido essas espécies possuírem características adaptativas (Herrera, 2009), como por exemplo a baixa taxa transpiratória, o que maximiza a eficiência do uso da água comparado as plantas C3 (Dunn et al. 2013; Edwards e Donoghue 2013),

A rota CAM permite às plantas a assimilação de carbono pelo ciclo de Calvin-Benson em ambientes extremamente secos e quentes ao diminuir a fotorrespiração (Lüttge, 2002). As plantas CAM englobam aproximadamente 7% das plantas vasculares (Cushman et al. 2008), entretanto, há espécies que apresentam variações no metabolismo conforme influência do ambiente (Winter e Holtum 2014). A progressão evolutiva da fotossíntese C3 para CAM não são claros, sendo necessária a comparação de espécies C3, CAM e os fisiotipos, a melhor compressão da indução de CAM e sua fisiologia, além de sua contribuição para fixação noturna de carbono (Heyduk et al. 2016). No entanto, a expressão C3-CAM em função de um fator ambiental é considerada um fenômeno comum (Winter e Holtum 2014; Winter e Holtum, 2017; Holtum et al. 2017). Logo, o entendimento desses processos torna-se fundamental para o estudo da engenharia da fotossíntese CAM, resultando em alternativas para o melhoramento da eficiência do uso da água de culturas C3 (Winter 2019) de potencial alimentício, além do aumento da produtividade (Yang et al. 2015). Assim, é necessária a aquisição de novas tecnologias associadas ao comportamento plástico de CAM as quais desvendam o arranjo biológico que conferem aos vegetais essa característica (Winter e Holtum 2014; Brilhaus et al. 2016).

Em termos ambientais, o estudo da plasticidade fornece subsídios para o entendimento dos mecanismos que garantem tolerância das plantas CAM a certos estresses específicos, como salinidade e seca (Niewiadomska et al. 2004; Holtum et al.

2017). Nesse sentido, tem crescido o número de trabalhos concentrados nessa área da ecofisiologia vegetal, com uso de diversos modelos vegetais, tais como *Clusia pratensis*, *Calandrina polyandra*, *Mesembrianthemum crystalinum*, *Talinum triangulare*, *Portulaca oleracea* e *Isoetes howellii* (Winter e Holtum, 2014). Além disso, boa parte dos experimentos com plantas com plasticidade na rota CAM são realizados em potes localizados em câmaras de crescimento (Winter et al. 2011; Kuźniak et al. 2016; Holtum et al. 2017). Porém, há pesquisas concentradas em condições de casa de vegetação (Herrera et al. 2015) ou de campo (Holtum et al. 2017), as quais são essenciais por representar com maior precisão o ambiente natural da planta.

A fixação líquida de CO₂ e a acidez dos tecidos foliares no período noturno (ΔH^+) juntamente à suculência são as principais evidências do metabolismo CAM (Osmond, 1978; Herrera 2009; Herrera et al. 2015). Na maioria dos trabalhos, destacam-se principalmente variáveis de trocas gasosas como ferramentas marcadoras dessa rota fotossintética, paralelamente com a acidez titulável (Winter e Holtum 2014; Habibi e Ajory, 2015; Holtum et al. 2017; Winter e Holtum 2017). Dentre elas, são destacadas a assimilação líquida de CO₂ (P_N), transpiração (E) e a condutância estomática (g_s). Além disso, a eficiência no uso da água costuma também ser bastante utilizada (Habibi e Ajory, 2015; Herrera et al. 2015). Outro parâmetro bastante usado para estudar plasticidade CAM é a composição do carbono 13 ($\delta^{13}C$), calculado indiretamente em função da eficiência bioquímica (C_i/C_a) (Flanagan e Farquhar 2014), traduzindo as diferentes capacidades de discriminação do carbono 13 pela RUBISCO (Ribulose 1,5 Bi-fosfato Carboxilase-Oxigenase) e a PEPC (Fosfoenol Piruvato Carboxilase) (Herrera et al. 2015). Por outro lado, Matsuoka et al. (2018) estimaram a indução de CAM na halófito *Mesembrianthemum crystalinum* a partir de valores de NPQ (*quenching* não-fotoquímico) com tratamento salino.

Na espécie modelo *Talinum triangulare* é relatado à indução de CAM por déficit hídrico (Herrera et al. 2015; Brillhaus et al., 2016) ou salinidade (Montero et al. 2018). Holtum et al. (2017) trabalharam com espécies de *Calandrinia* e perceberam comportamento C3 quando bem irrigadas, e padrões de trocas gasosas e acidez CAM com a desidratação do substrato. Além disso, com o início da reidratação (remoção do estresse), as plantas voltaram a exibir fotossíntese C3. Nesse caso, ocorreu o processo de reversão, o qual é pouco testado e prova que o metabolismo CAM é verdadeiramente opcional (facultativo) (Winter e Holtum 2014; Holtum et al. 2017; Winter e Holtum 2017).

A plasticidade da rota CAM, em vários grupos de plantas pode ser caracterizada em quatro fisiotipos, descritos como: obrigatório (Lüttge 2002; Niewiadomska et al. 2004; Black e Osmond 2003; Matsuoka et al., 2018), facultativo (intermediário C3-CAM), reciclador (CAM-Cycling) e inativador (CAM-Idling) (Lüttge, 2004; Herrera, 2009). As plantas CAM facultativas exibem metabolismo C3 em condições ótimas e alternam para CAM quando aplicado um estresse ambiental (Borland et al. 2011; Winter e Holtum 2014; Holtum et al., 2017). Na forma CAM-Cycling, a expressão de CAM é baixa (Herrera, 2009) e padrões de trocas gasosas C3 são observados durante o dia, enquanto que, no período noturno, os estômatos estão fechados com simultânea refixação do CO₂ respiratório (Sipes e Ting 1985; Cushman 2001). CAM-Idling é considerado a forma mais intensa de CAM, ocorrendo quando o estresse é extensivo (Rayder e Ting, 1983; Cushman 2001). Nesse modo, não há atividade estomática, apenas refixação do carbono endógeno durante o período noturno (Rayder e Ting 1983; Winter e Holtum, 2002; Lüttge 2010). Além disso, CAM-Idling é a forma mais desconhecida de CAM, no entanto, é ressaltado o seu papel na estratégia de sobrevivência da planta (Hanscom e Ting 1978; Winter, 2019). Dentre as famílias que operam CAM, destacam-se as cactáceas, com algumas espécies que apresentam folhas verdadeiras, como a Ora-Pro-Nóbis (*Pereskia* spp) (Edwards et al. 2005).

Ora-Pro-Nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) família Cactaceae, subfamília Pereskioideae, é um vegetal com hábito de liana e de porte arbustivo, com folhas coriáceas simples e nervuras elípticas, podendo atingir aproximadamente 10 metros de altura. Além disso, apresenta espinhos na base da folha (Edwards et al. 2005), sendo uma planta rica em mucilagem e proteína, além de possuir potencial alimentício e farmacêutico (POMPEU et al. 2014). A Ora-Pro-Nóbis é uma planta nativa de regiões tropicais da América, com distribuição nas demais regiões tropicais do planeta (Morton 1978; Weed Management Guide 2003; Olckers 2004).

Nesse estudo, é hipotetizado que Ora-Pro-Nóbis é uma espécie com metabolismo fotossintético predominante do tipo C3, porém a assimilação de carbono pode ocorrer pela via CAM quando expostas ao déficit hídrico como mecanismo compensatório as perdas de CO₂ típicas do metabolismo C3 nessas condições. No entanto, os processos moleculares que encadeiam essa transição são ainda pouco entendidos (Yang et al. 2015). Assim, o presente estudo teve como objetivo caracterizar a modulação de mecanismo associados com a eficiência fotossintética com base em parâmetros de trocas gasosas, atividade fotoquímica, mudança de acidez celular e

comportamento estomático, durante a transição C3-CAM em plantas de Ora-Pro-Nóbis expostas ao estresse hídrico.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Material Vegetal e Tratamentos

O estudo foi realizado com base em dois experimentos, um em câmara de crescimento (Experimento I) e outro em casa de vegetação (Experimento II). As plantas de Ora-Pro-Nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) foram obtidas por propagação vegetativa a partir de estacas (comprimento 15 cm/diâmetro de 10 mm e 4 a 6 gemas), crescidas em vasos de 5 litros com areia e vermiculita 1:1 (v/v) irrigadas diariamente com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), por 67 dias em casa de vegetação.

Para o experimento I as plantas foram transferidas para câmara de crescimento (Fitotron SGC 120) com condições controladas de temperatura (25 °C dia/20 °C noite), umidade relativa (55% dia/65% noite), luminosidade (400 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e fotoperíodo (12 horas). Nessas condições, um grupo de plantas recebeu irrigação diariamente (controle) e outro foi submetido ao déficit hídrico durante 46 dias, recebendo 25% do volume aplicado no controle (déficit de 75%). As plantas expostas ao déficit hídrico foram reidratadas por um período de 16 dias. (Para o critério de 46 dias de déficit hídrico foi adotado o momento em que a P_N atingiu valores mínimos e estáveis no tempo).

Para o experimento II, um grupo de plantas foi bem irrigado diariamente enquanto o outro foi submetido à suspensão da rega por sete dias (sintomas de perda da turgescência foliar), seguido de reidratação por mais sete dias. Em plantas bem irrigadas, sob o déficit hídrico e reidratadas foram realizadas medidas de crescimento, potencial hídrico, trocas gasosas, atividade fotoquímica e coletadas folhas para mensurações de acidez titulável e indicadores de danos e proteção oxidativa, como dano de membrana por peroxidação de membrana (TBAR_S) e Ascorbato (ASA) e Glutathiona (GSH) reduzidos.

Os experimentos descritos em seguida foram realizados em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Nos experimentos I e II os tratamentos consistiram de

três plantas bem irrigadas (controle), três plantas submetidas ao déficit hídrico (seca) e posteriormente recuperadas (reidratação). A parcela experimental consistiu de um vaso contendo uma planta cada e todos os tratamentos foram representados por três repetições. Os dados das variáveis foram analisados por meio de análise de variância (5%) seguidos por teste de média (Tukey 5%) ou comparados por meio de médias \pm desvio padrão da média.

2.2.2 Medidas de Matéria Fresca

Ao fim de sete dias após da imposição do tratamento de estresse hídrico no experimento II, as plantas de Ora-Pro-Nóbis foram coletadas e separadas em raízes, caules e folhas, para determinação da massa fresca, em balança semianalítica, obtendo as variáveis de massa fresca da folha (MFF), massa fresca do caule (MFC), massa fresca das raízes (MFR), massa fresca da parte aérea (MFPA) e a massa fresca total (MFT). Os dados foram expressados em g MF planta⁻¹.

2.2.3 Medidas de Fluorescência da Clorofila a

Os dados de fluorescência da clorofila a foram obtidos por meio de um fluorímetro modulado analisador de eficiência fotossintética, tipo MINI-PAM-II da Walz (Germany), através da metodologia de pulso de saturação (PS). As coletas de dados foram realizadas em uma folha verde totalmente expandida próxima a região mediana do ramo foliar, às 10h00min da manhã (período diurno) e às 22h00min da noite (período noturno). Através de pinças (Dark Leaf Clip) as folhas selecionadas foram aclimatadas ao escuro por um período de 1 hora durante o período diurno, para obtenção dos seguintes parâmetros fotoquímicos (F_o , F_m e F_v/F_m), sendo $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$ (Kitajima e Butler 1975).

Em seguida, as folhas foram aclimatadas ao claro para determinação das variáveis fotoquímicas: $F_o' = F_o / (((F_m - F_o)/F_m) + (F_o/F_m'))$ (Oxborough e Baker, 1997); $Y(II) = (F_m' - F)/F_m'$ (Genty et al. 1989), $qP = (F_m' - F)/(F_m' - F_o')$ (Schreiber et al. 1986; Kooten e Snel 1990), $qL = qP * (F_o'/F)$ (Kramer et al. 2004) $NPQ = (F_m'/F_m) - 1$ (Bilger e Björkman 1990). Onde, F_o : Fluorescência mínima de folhas adaptadas ao escuro, F_o' : Fluorescência mínima de folhas adaptadas à luz, F : Fluorescência do estado de equilíbrio dinâmico da clorofila quando submetida à luminosidade, F_m : Fluorescência máxima de folhas adaptadas ao escuro, F_m' : Fluorescência máxima de folhas adaptadas

à luz, F_v/F_m : eficiência quântica máxima do PSII, $Y(II)$: Eficiência quântica atual do PSII, qP : Coeficiente de *quenching* fotoquímico qL : quantidade de centros de reações abertos no PSII, e NPQ: coeficiente de *quenching* não-fotoquímico.

Paralelamente, foi determinada a taxa relativa de transporte de elétrons (ETR, $\mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), onde $\text{ETR}=\text{DFFF}*0,84*0,5*Y(II)$. Assim, foram feitas leituras de curvas de indução fotossintética (IC) 46 dias após aplicação do tratamento hídrico (experimento I) e realizadas leituras pontuais na intensidade luminosa intermediária de $630 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ durante 20 segundos e pulso de saturação $\text{PS}=5000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ em plantas controle, submetidas à seca e reidratação por sete dias (experimento II). Na curva IC, as plantas foram submetidas a um $\text{PS}=5000$ e a uma luz actínica fixa de $190 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ durante 400 segundos, com 20 segundos entre cada pulso/DFFF.

2.2.4 Medidas de Trocas Gasosas e Curvas de Resposta da Fotossíntese em Relação à Luz e CO_2

As trocas gasosas foram avaliadas em folhas verdes totalmente expandidas na região mediana do ramo, às 10h00min da manhã (período diurno) e às 22h00min da noite (período noturno), por meio de um sistema de fotossíntese portátil a infravermelho, modelo GFS-3000FL da Walz (Germany), onde, determinaram-se os seguintes parâmetros: Fotossíntese líquida (P_N , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), transpiração (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mm H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), concentrações intercelular (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$) e ambiente (C_a , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$) de CO_2 e temperatura da folha (T_f , $^\circ\text{C}$). De posse dos dados acima foram calculados os seguintes parâmetros ecofisiológicos: Eficiência instantânea no uso da água (P_N/E), eficiência intrínseca no uso da água (P_N/g_s), nível de carboxilação máximo (P_N/C_i) e a eficiência bioquímica C_i/C_a .

As folhas foram alocadas na cuveta com as seguintes condições controladas: $\text{DFFF}=1500 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Dia) e $0 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Noite), $T_{\text{cuv}}=25^\circ\text{C}$, $\text{H}_2\text{O}_{\text{abs}}=1700 \mu\text{mol H}_2\text{O mol}^{-1} \text{ ar}$, $\text{CO}_{\text{abs}}=400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$ e um fluxo de gases equivalente a $750 \mu\text{mol de ar s}^{-1}$. Onde, T_{cuv} : temperatura na cuveta, $\text{H}_2\text{O}_{\text{abs}}$: umidade de entrada na cuveta e CO_{abs} : concentração de CO_2 aplicado na cuveta. Na curva P_N x DFFF , as plantas foram submetidas às intensidades luminosas (DFFF) descritas por Coe e Lin (2018), enquanto que para a curva P_N x C_i , as plantas foram aclimatadas as

quantidades de CO_{abs} descritas por Busch (2018). As leituras pontuais foram realizadas nos dias 0, 3, 6, 10, 16, 19, 26, 46 de déficit hídrico e nos nove e 16 dias de reidratação. Finalmente, as leituras pontuais horárias foram realizadas durante 6h00min, 9h00min, 12h00min, 15h00min (período diurno), 18h00min, 21h00min, 00h00min e 3h00min da manhã (período noturno) aos 44 dias após aplicação do estresse.

Além disso, a partir de ajustes matemáticos realizados nas curvas diurnas e noturnas $P_N \times \text{DFFF}$ (Marshall e Biscoe 1980; Thornley e Johnson 2002) e $P_N \times C_i$ (Ellsworth et al., 2018), foram calculadas as seguintes variáveis: Respiração no escuro (R_{dark} , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), ponto de compensação de luz (LCP, $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), fotossíntese líquida máxima ($P_N \text{ max}$, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), taxa máxima de carboxilação da RUBISCO (V_{cmax} , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), respiração em presença da luz (R_d , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), taxa máxima de transporte de elétrons fotossintéticos (J_{max} , $\mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e condutância no mesofilo (g_m , $\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

2.2.5 Composição do Carbono 13 ($\delta^{13}\text{C}$) e o Balanço Líquido de CO_2 Noturno (F_N)

A variável $\delta^{13}\text{C}$ (‰) foi obtida indiretamente a partir de dados de C_i/C_a , conforme Flanagan e Farquhar (2014), segundo a fórmula: $\delta^{13}\text{C} = -12,44 - 26,2 * (C_i/C_a)$. Adicionalmente, o cálculo da F_N ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ dias) em plantas estressadas foi realizado a partir do produto dos valores de P_N noturnos médios pelo intervalo de tempo em dias, com início no momento em que se verificou o início do decaimento dessa variável durante o dia (o mesmo procedimento foi realizado para obtenção de $\delta^{13}\text{C}$, porém foram considerados apenas os valores médios no tempo) em relação à P_N diurna de plantas bem irrigadas. Ao final do período de reidratação, as variáveis foram calculadas novamente.

2.2.6 Potencial Hídrico Foliar

O potencial hídrico foliar (ψ_{leaf}) foi obtido a partir de folhas verdes saudáveis da região mediana do ramo excisadas durante o final do período noturno, 5h00min da manhã (*pré-dawn*), com auxílio de uma câmara de pressão do tipo Scholander (Scholander et al. 1965). Para tanto, as folhas foram inseridas dentro da câmara e foi aplicada uma pressão máxima necessária para ocasionar a saída de seiva xilemática do pecíolo, equivalente a ψ_{leaf} . As análises foram realizadas aos 44 dias após aplicação dos tratamentos e ao final do período de reidratação.

2.2.7 Imagens e Biometria dos Estômatos

As impressões dos estômatos durante o dia e a noite e sobre diferentes condições hídricas foram obtidas pressionando as faces abaxial (AB) e adaxial (AD) da folha contra gotas de Cianocrilato ($C_5H_5NO_2$) em lâminas de vidro 44 dias após aplicação do tratamento. Posteriormente, as imagens foram processadas com auxílio de um microscópio óptico do tipo LX 500 acoplado a uma câmera digital. De posse das imagens, foram determinadas a densidade estomática (D_e , est./mm²) e abertura do ostíolo (A_o , μm), por meio do software Image-Pro Plus 4.5.0.29. As leituras de densidade estomática foram feitas numa resolução de 150 μm , com uma lente de 10x, enquanto que, para determinação da abertura do ostíolo, foi usada a lente de aproximação de 40x.

2.2.8 Conteúdo de Carboidratos Solúveis Totais (CST)

0,1 g de massa fresca foliar de plantas do experimento II coletadas às 18h00min (fim do dia) e as 6h00min (fim da noite) foram macerados em presença de N_2 com auxílio de almofariz e pistilo e adição de 2,5 ml de água destilada. O extrato obtido foi submetido ao banho maria a 98 °C por 1 hora. A variável CST foi determinada conforme o método fenol-sulfúrico descrito por Dubois et al. (1956). Para tanto, foram coletadas alíquotas de 250 μl do extrato, 250 μl de Fenol 5% (C_6H_5OH), 1,75 ml de ácido Sulfúrico 97% (H_2SO_4) e adicionadas a tubos de ensaio nessa ordem. As leituras foram feitas em temperatura ambiente em espectrofotômetro a 490 nm. A variável CST foi determinada com base em curva padrão de d-glicose e dados foram expressos em mmol de carboidratos solúveis g^{-1} MF.

2.2.9 Determinação do Conteúdo de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBAR_S), Ascorbato Reduzido (ASA) e Glutathiona Reduzida (GSH)

Amostras contendo 0,1 g de peso fresco foliar de plantas do experimento II coletadas às 18h00min (fim do dia) e 6h00min (fim da noite) foram maceradas em almofariz na presença de nitrogênio líquido, até obtenção da farinha, seguido da adição de 750 μl de ácido Tricloroacético 6% (TCA). O extrato será centrifugado a 10000 x g por 15 min em temperatura de 4 °C e alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para reação. O sobrenadante foi coletado e foram feitas leituras de TBAR_S, ASA e GSH.

O conteúdo de TBAR_S foi determinado com base em Heath e Packer (1968).

Foram coletadas alíquotas de 250 µl de extrato e adicionados a 1 ml em solução contendo TCA 20% e 0,5 % de ácido Tiobarbitúrico (TBA). Posteriormente, as amostras foram alocadas em tubos com tampas rosqueadas e submetidas ao banho maria a 95 °C por 1 hora. As leituras foram realizadas em temperatura ambiente em espectrofotômetro a 532 nm e 600 nm. Para determinação do completo MDA-TBA Foi utilizado um coeficiente de extinção molar igual a 155 mM⁻¹ cm⁻¹. Os dados foram expressos em nmol MDA-TBA g⁻¹ MF.

A determinação de ASA foi realizada segundo Kampfenkel et al. (1995). Para tanto, 50 µl de extrato foram coletados e adicionados a 150 µl tampão Fosfato de Potássio 200 mM (pH 7,5) (KH₂PO₄), 50 µl de água destilada, 250 µl TCA (10%), 200 µl de ácido Fosfórico 45% (H₃PO₄), 200 µl de Bpiridil (4%) (C₁₀H₈N₂) e 100 µl de Cloreto Ferro III 3% (FeCl₃). As amostras foram alocadas em banho maria a 42 °C por 30 minutos. As leituras de absorbância foram feitas 525 nm. O conteúdo de ASA foi determinado com base em curva padrão e expresso em µmol g⁻¹ MF.

A determinação do conteúdo de GSH foi realizada de acordo com Griffith (1980). 100 µl de extrato foram coletados e adicionados ao meio de reação contendo 1300 µl de tampão Fosfato de Sódio 150 mM (pH 7,5) (NaH₂PO₄), 500 µl de tampão NaH₂PO₄ 100 mM (pH 7,0) e 100 µl de ácido 5,5'-Ditio-Bis-(2-Nitrobenzóico) (DTNB) (C₁₄H₈N₂O₈S₂) 30 mM em tampão NaH₂PO₄ 100 mM (pH 7,0). O meio de reação foi alocado em banho maria a 30 °C por 10 minutos. As leituras de absorbância foram realizadas em 412 nm. O conteúdo de GSH foi determinado com base m curva padrão e expresso em µmol g⁻¹ MF.

2.2.10 Determinação da Acidez Titulável

Folhas de plantas bem irrigadas, submetidas à seca e reidratação por 7 dias (experimento II) foram coletadas às 18:00h (fim do dia) e às 6:00h (fim da noite) e armazenadas em ultra freezer a -80°C para determinação da acidez titulável [H⁺] pelo método de Cushman et al. (2008) com modificações. Para tanto, 0,3 g de massa fresca foram pesados e em seguida macerados com auxílio de almofariz e pistilo na presença de N₂ líquido e Etanol 80% (v/v) (C₂H₆O). Posteriormente, o extrato foi alocado em tubos de rosca e transportado para banho-maria para aquecimento a 80°C durante 30 minutos. Após essa etapa, os extratos foram titulados com 0,1 M de Hidróxido de Sódio (NaOH) usando como indicador 3 gotas de fenolftaleína 1%. Os resultados foram expressos em µmol [H⁺] g⁻¹ MF.

2.2.11 Análise Estatística

Para interpretação de gráficos de barras e tabelas, foi realizada a análise de variância (ANOVA), através do teste F a 5% para verificar efeito de tratamento. Nesse caso, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a nível 5%, com auxílio do software Sisvar.

2.3 Resultados

Resistência à fotoinibição, redução da eficiência fotossintética, baixa fixação noturna de CO₂ intercelular, assim como pequena variação da acidez foram constadas em plantas de Ora-Pro-Nóbis submetidas à seca. Além disso, foram verificados aumento na eficiência do uso da água noturna assim como impactos no status hídrico da planta e variações noturnas na estabilidade da membrana, metabolismo oxidativo e de açúcares submetidas ao déficit hídrico.

2.3.1 Crescimento, Atividade Fotoquímica e Trocas Gasosas

Pode-se notar que, a massa fresca da folha (MFF), raiz (MFR), parte aérea (MFPA) e total da planta (MFT) foi reduzida significativamente em plantas expostas à suspensão integral da rega, enquanto que, a variável MFC não foi afetada pelo déficit hídrico durante o experimento II (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores de matéria fresca folha (MFF), caule (MFC), raiz (MFR), parte aérea (MFPA) e total (MFT) em plantas de Ora-Pro-Nóbis bem irrigadas e sob as condições de seca integral cultivadas em casa de vegetação.

Condição	MFF	MFC	MFR	MFPA	MFT
Controle	88,06±9,87a	71,57±12,06a	35,79±10,35a	159,64±17,87a	195,43±25,77a
Seca	56,52±0,86b	58,05±10,52a	16,65±4,31b	114,57±9,72b	131,23±11,14b

Médias nas mesmas colunas com letras iguais representam que não diferença entre os tratamentos hídricos pelo teste de Tukey a 5%.

Não foram constatadas diferenças estatísticas nas variáveis fotoquímicas entre plantas bem irrigadas, expostas à seca e reidratação (experimento II) (Tabela 2). Todavia, é conveniente notar uma leve redução da ETR e um aumento do NPQ dessas variáveis em plantas estressadas, com uma pequena recuperação quando as plantas são

reidratadas.

Em plantas controle durante a noite, foram verificadas maiores diferenças para as variáveis Y(II), qP e ETR (Figuras 1a, 1b e 1c), apresentando uma faixa de saturação após 120 segundos de exposição à luz paralelo ao pulso de saturação. Logo, para Y(II), plantas bem irrigadas apresentaram uma assíntota horizontal de 0,5, enquanto que, plantas bem irrigadas durante o dia e estressadas durante a noite estabilizaram em aproximadamente em 0,4. Plantas estressadas durante o dia diferiram do controle após aproximadamente 280 segundos, saturando na faixa de 0,3.

Tabela 2 – Parâmetros fotoquímicos eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m), eficiência quântica atual do PSII (Y(II)), taxa relativa de transporte de elétrons (ETR), coeficiente de *quenching* fotoquímico (qP), fração do número de centro de reações abertos (qL) e o coeficiente de *quenching* não-fotoquímico (NPQ) em plantas de Ora-Pro-Nóbis bem irrigadas, expostas à sete dias de seca integral e reidratação em presença de luz actínica $620 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 20 segundos cultivadas em condições de casa de vegetação.

Condição	F_v/F_m	Y(II)	ETR	qP	qL	NPQ
Controle	0,82±0,01a	0,06±0,00a	18,3±2,51a	0,1±0,02a	0,03±0,00a	1,06±0,30a
Seca	0,79±0,01a	0,04±0,00a	10,8±1,27a	0,06±0,01a	0,03±0,00a	1,74±0,34a
Reidratação	0,81±0,00a	0,05±0,01a	13,9±3,63a	0,07±0,01a	0,02±0,00a	1,28±0,05a

Médias nas mesmas colunas com letras iguais representam que não diferença entre os tratamentos hídricos pelo teste de Tukey a 5%.

A ETR estabilizou numa faixa superior a $40 \mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em plantas bem irrigadas durante a noite, estabilizando de maneira similar em plantas estressadas durante a noite e plantas controle durante o dia (Figura 1b). Plantas estressadas durante o dia sofreram uma redução significativa da ETR em relação a plantas controle após 280 segundos, estabilizando numa faixa 28,58% menor. Assim como em Y(II), os valores de qP estabilizam em 0,7 em plantas noturnas bem irrigadas, enquanto que, nos demais tratamentos, não foi possível verificar uma diferença significativa para qP, com plantas estressadas durante à noite e plantas controle durante o dia, estacionando na faixa de 0,6, enquanto que plantas expostas à seca durante o dia saturaram em 0,5.

Com relação a variável NPQ (Figura 1d), percebe-se que, após aproximadamente 120 segundos, plantas controle e estressadas durante o dia,

apresentam um comportamento ascendente nos valores de NPQ, saturando em 1,5, enquanto que, no período noturno, os valores de NPQ apresentaram uma redução em função do tempo, estacionado em valores entre 0,5 e 1. Paralelamente, após 160 segundos, foi possível ver que a diferença nos valores de NPQ diurnos e noturnos foi significativa, independentemente do tratamento hídrico.

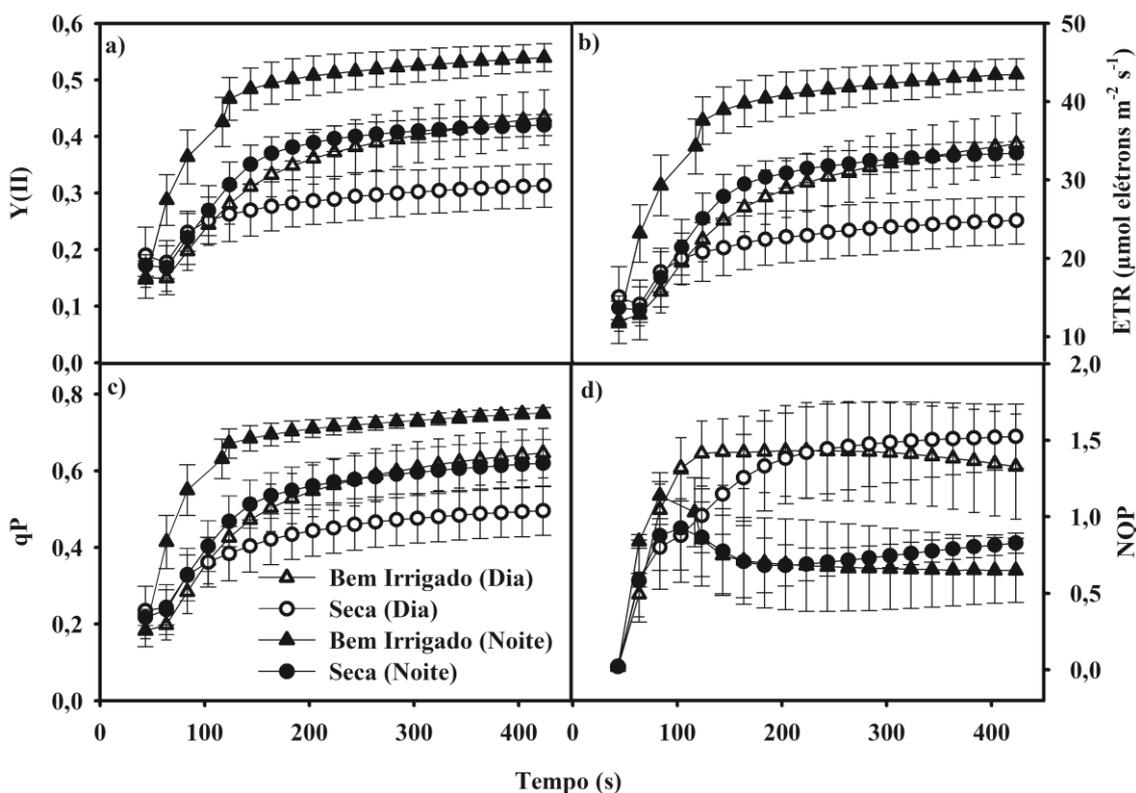


Figura 1 – Curva IC para os parâmetros fotoquímicos: eficiência quântica atual do PSII (Y(II)) (a), coeficiente de *quenching* fotoquímico (qP) (b), taxa relativa de transporte de elétrons (ETR), e o coeficiente de *quenching* não-fotoquímico (NPQ) (d), em plantas de Ora-Pro-Nóbis bem irrigadas e submetidas a 46 dias de déficit hídrico em uma câmara de crescimento, em resposta ao tempo e expostas a uma intensidade de luz actínica fixa de $190 \mu\text{mol f}ó\text{tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Após 10 dias de déficit hídrico, os valores de P_N , E, g_s e C_i foram afetados em plantas estressadas em relação às plantas irrigadas durante o dia no experimento I (Figuras 2a, 2b, 2c e 2d). A P_N diurna decaiu em uma escala de 75% até os 46 dias de déficit hídrico (Figura 2a). De maneira similar, os valores de E decaíram 75% (Figura 2b), enquanto g_s sofreu uma redução 81,25% (Figura 2c). Nas plantas controle durante o

dia, a P_N variou de $8 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para $5 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, enquanto as variáveis E e g_s permaneceram aproximadamente constantes

As plantas foram reidratadas no dia 46, logo, duas leituras foram realizadas: nove e 16 dias após o início do ciclo de recuperação. A P_N diurna retornou ao valor de inicial no dia nove, sofrendo uma redução de 37,5% no dia 16 (Figura 2a). A variável E beirou o valor de $2 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ no dia 9, decaindo pela metade no dia 16 (Figura 2b). A g_s foi quadruplicada na primeira leitura, decaindo significativamente na segunda (Figura 2c). As plantas bem irrigadas apresentaram valores de P_N noturnos negativos durante todo o ciclo, enquanto que, plantas estressadas obtiveram uma P_N levemente positiva entre 10 e 46 dias. Adicionalmente, os valores de E e g_s em ambos os tratamentos foram aproximadamente nulos durante à noite (Figuras 2b e 2c). Após o período de reidratação, a P_N noturna de plantas estressadas retornou a valores negativos, enquanto que os valores E e g_s não foram alterados (Figuras 2a, 2b e 2c).

Os valores de C_i nos dois tratamentos hídricos foram similares durante todo ciclo, variando entre 450 e 300 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$, com exceção dos valores compreendidos entre 19 e 26 dias de aplicação do estresse (Figura 2d). Durante o dia, os valores de C_i se apresentaram mais reduzidos e similares durante todo o ciclo, variando entre 300 e 200 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$, todavia, verifica-se um aumento significativo da concentração de CO_2 intercelular, após 16 dias de déficit hídrico ($\sim 400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$). Em plantas controle, durante o dia, a P_N/E foi reduzida ao final do ciclo, enquanto que, em plantas estressadas, houve uma redução nessa variável após os 10 dias de aplicação do tratamento de déficit hídrico (1,5). Após esse período, observa-se um aumento da P_N/E até valores similares aos de plantas controle, assim permanecendo também fase de reidratação (Figura 2e).

Durante a noite, ambos os grupos de plantas apresentaram comportamento similar até os 15 dias de aplicação do estresse, com valores de P_N/E próximos de zero ou negativos. Decorrido esse período, percebe-se uma diferença significativa entre os valores de P_N/E em plantas estressadas e controle até aos 46 dias de aplicação do estresse. Com o início do tratamento de reidratação, os valores de P_N/E retornaram a valores negativos em ambos os tratamentos. Com relação à variável P_N/g_s , plantas controle diurnas apresentaram valores aproximadamente constantes durante todo o ciclo, próximos de 0,1 (Figura 2f). Plantas submetidas ao déficit hídrico, durante o período diurno, se comportaram de maneira similar às plantas controles, com exceção do intervalo entre 10 e 26 dias após aplicação do tratamento, onde se observou uma

redução numérica máxima para 0,05 e posterior crescimento até valores de plantas controle.

No período noturno, plantas controle e estressadas apresentaram valores negativos de P_N/g_s similares até os 16 dias após aplicação do estresse. Após 16 dias, plantas expostas à seca apresentaram valores ligeiramente positivos de P_N/g_s até os 46 dias, enquanto plantas controle valores negativos. Durante o período de reidratação, os valores de P_N/g_s em plantas estressadas retornam aos valores negativos. Em plantas controle durante o dia, os valores de P_N/C_i variaram decaíram 50% durante todo o ciclo (Figura 2g). Em plantas estressadas, após 10 dias de aplicação do tratamento, observa-se um decaimento significativo de P_N/C_i para aproximadamente zero em 16 dias, com posterior aumento aos 19 dias e redução pela metade nos 46 dias, com diferenças significativas nesse ponto. Após o período de reidratação, os valores de P_N/C_i em plantas retornaram aos valores próximos de plantas bem irrigadas.

Durante o período noturno, plantas bem irrigadas apresentaram valores de P_N/C_i negativos durante todo o ciclo, enquanto plantas estressadas apresentaram valores positivos entre 10 e 46 dias após aplicação do estresse (Figura 2g). Adicionalmente, em plantas bem irrigadas durante o dia, os valores de C_i/C_a permaneceram aproximadamente constantes durante todo o ciclo, enquanto que em plantas estressadas, após 10 dias de aplicação do estresse, nota-se um aumento significativo desse parâmetro, com posterior decaimento aos 19 dias (Figura 2h). Posteriormente, após 19 dias, observa-se um aumento dessa variável aos 26 dias, porém, sem diferir de plantas controles. Aos 46 dias, o valor de C_i/C_a foi reduzido nessas plantas.

Após o período de reidratação, os valores C_i/C_a convergiram para 0,6, assim como plantas controles (Figura 2h). No período noturno, plantas bem irrigadas e expostas à seca apresentaram valores muito superiores da razão C_i/C_a . Adicionalmente, notam-se diferenças significativas sutis entre 10 e 46 após aplicação do estresse, com valores mais reduzidos em plantas estressadas. No período de reidratação, ambos os grupos de plantas apresentaram valores de C_i/C_a similares.

Em plantas controle, a P_N horária durante o dia oscilou entre 10 e 8 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, enquanto que, em plantas estressadas, houve uma redução para 4 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ às 6h00min, com posterior decaimento para aproximadamente 2 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ às 15h00min (Figura 3a). Durante o período noturno, o balanço acumulado líquido de CO_2 foi negativo em plantas controle e levemente positivo em plantas submetidas ao déficit hídrico, o que caracteriza uma baixa fixação noturna (Figura 3a). Para a variável E, é

visível perceber um decréscimo de 33,33% durante o período diurno entre as 6h00min e 15h00min. Comportamento semelhante é observado nas plantas estressadas, com diminuição de 60% as 6h00min (Figura 3b). Tanto plantas estressadas quanto bem irrigadas não transpiraram no período noturno.

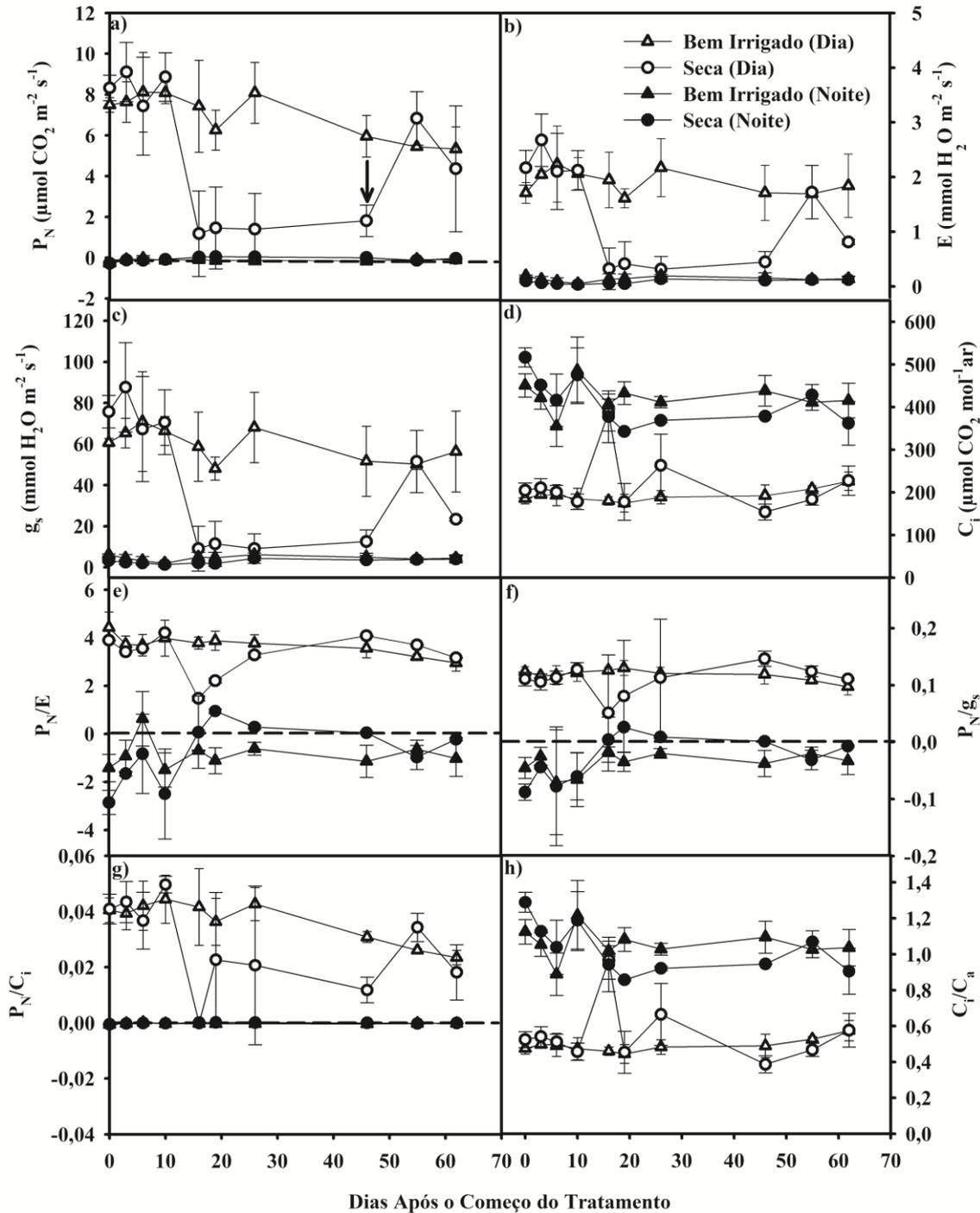


Figura 2 – Evolução diária da fotossíntese líquida (P_N), transpiração (E), condutância estomática (g_s), concentração intercelular de CO_2 (C_i), eficiência no uso da água (P_N/E),

eficiência intrínseca no uso da água (P_N/g_s), nível de carboxilação máximo (P_N/C_i) e a razão C_i/C_a em plantas de Ora-Pro-Nóbis bem irrigadas, submetidas a 46 dias de déficit hídrico e 16 dias de reidratação em uma câmara de crescimento. A seta preta representa o início da reidratação.

A g_s oscilou no intervalo de 80 e 60 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em plantas bem irrigadas durante o dia, todavia, em plantas estressadas, a atividade estomática decaiu para 30 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no início do dia e posterior redução até o final do dia, se aproximando de 20 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 3c). Ambas as plantas estressadas e bem irrigadas apresentaram condutância aproximadamente nula durante a noite. Em plantas bem irrigadas, os valores de C_i foram similares aos de plantas estressadas, apresentando também comportamento constante durante o dia (200 $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1} \text{ar}$) (Figura 3d). No período noturno, plantas bem irrigadas performaram uma maior quantidade C_i em relação às plantas estressadas partir das 21h00min, com oscilação de 500 para 600 $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1} \text{ar}$.

A P_N/E horária em plantas bem irrigadas se manteve constante entre às 6h00min e às 9:00h, com um aumento no restante do período diurno. Durante o período noturno, a P_N/E se apresentou negativa, das 18h00min às 00h00min, com um decaimento máximo no fim do período noturno (Figura 3e). Em plantas estressadas, a P_N/E foi reduzida às 12h00min e 15h00min, enquanto que à noite foram constatados valores positivos. Por outro lado, a P_N/g_s de plantas controle se manteve aproximadamente constante no período diurno (Figura 3f). Em contrapartida, a P_N/g_s de plantas bem irrigadas foi ligeiramente negativa, principalmente no fim do período noturno. Em plantas estressadas, o comportamento da P_N/g_s foi similar ao de plantas controle durante o dia, todavia, durante a noite, nota-se uma grande diferença, apresentando valores negativos.

A variável P_N/C_i decaiu de 6h00min as 9h00min, com posterior crescimento linear no restante do dia (Figura 3g). Em plantas estressadas o nível de carboxilação foi significativamente reduzido, com decaimento às 15h00min. Durante a noite, os valores de P_N/C_i foram ligeiramente negativos em plantas bem irrigadas e positivos em plantas estressadas. Os valores da razão C_i/C_a foram similares entre plantas bem irrigadas e estressadas durante o dia, com exceção às 9h00min em plantas controle (Figura 3h). No período noturno, os valores da razão C_i/C_a , foram maiores em plantas bem irrigadas em

relação a plantas controle, com diferenças significativas a partir das 21h00min. Em plantas com déficit de irrigação, a razão C_i/C_a se manteve constante.

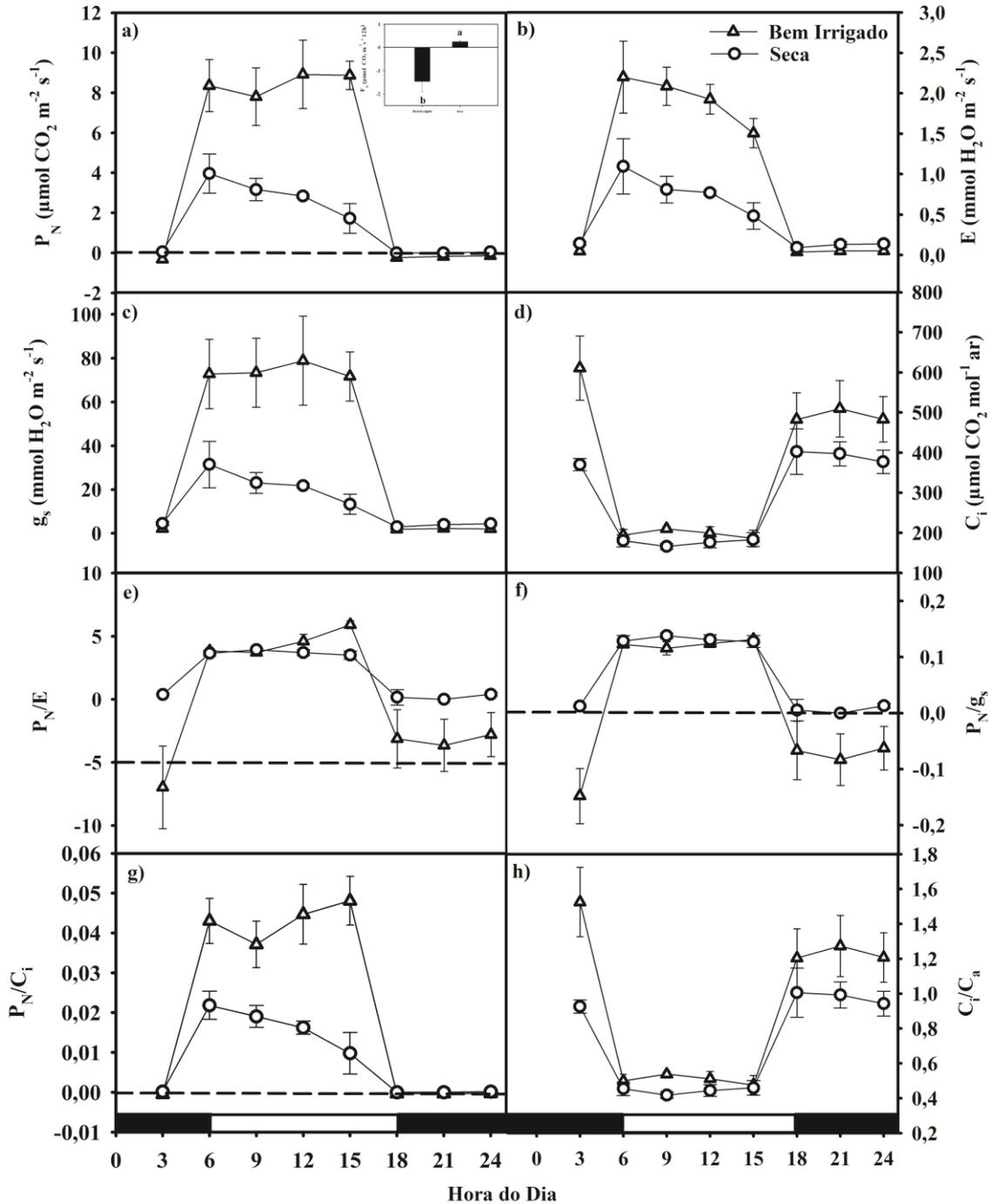


Figura 3 – Evolução horária da fotossíntese líquida (P_N), transpiração (E), condutância estomática (g_s) e concentração intercelular de CO_2 (C_i), eficiência no uso da água (P_N/E), eficiência intrínseca no uso da água (P_N/g_s), nível de carboxilação máxima (P_N/C_i) e a razão C_i/C_a em plantas de Ora-Pro-Nóbis bem irrigadas e submetidas a 44

dias de déficit hídrico em uma câmara de crescimento PE. Onde, as barras abertas representam o período diurno e as barras fechadas o período noturno. Além disso, o gráfico menor representa a o balanço noturno horário de CO₂.

Em relação à curva P_N x DFFF, podemos observar que, houve um decaimento na assimilação de carbono em plantas sob o déficit hídrico em comparação às plantas bem irrigadas, tanto no período diurno como noturno (Figura S2a). Aparentemente, em 2500 μmol fótons m⁻² s⁻¹, a fotossíntese de plantas bem irrigadas não saturou. Plantas sob a seca saturaram a P_N em 1000 μmol fótons m⁻² s⁻¹.

Para a variável E, nota-se uma diferença em plantas bem irrigadas diurnas e noturnas entre 500 e 2000 μmol fótons m⁻² s⁻¹, enquanto que uma enorme diferença é encontrada em relação a plantas sob a seca (Figura S2c). Verifica-se também que a transpiração parece ter saturado em plantas diurnas bem irrigadas em 2000 μmol fótons m⁻² s⁻¹, enquanto em plantas estressadas em 1000 μmol fótons m⁻² s⁻¹, com decaimento logo em seguida. De maneira semelhante, os valores de g_s em plantas diurnas bem irrigadas saturaram em 2000 μmol fótons m⁻² s⁻¹ assim como também, plantas bem irrigadas durante o dia e noite diferiram entre 250 e 1000 μmol fótons m⁻² s⁻¹ (Figura S2e). Em plantas estressadas, os valores de g_s durante o dia e noite saturaram em 1000 μmol fótons m⁻² s⁻¹ e, posteriormente apresentaram decaimento. Adicionalmente, foi encontrada uma grande diferença significativa para os valores de g_s com o aumento da luminosidade entre tratamentos hídricos.

Entre períodos, constata-se uma diferença no comportamento de evolução da P_N, E e g_s provavelmente, devido à perturbação do ciclo circadiano das plantas. Com relação à variável C_i, verifica-se redução dos valores em função do aumento da luminosidade até 250 μmol fótons m⁻² s⁻¹, assim como diferenças durante o dia entre plantas controle e estressadas a partir desse ponto, enquanto que, plantas noturnas não apresentaram diferenças (Figura S2g). No entanto, em plantas estressadas, durante o dia, nota-se um aumento do C_i de 2000 μmol fótons m⁻² s⁻¹ para 2500 μmol fótons m⁻² s⁻¹.

Para a curva P_N x C_i foram observadas diferenças significativas nos valores de P_N, E, g_s e T_f, entre plantas bem irrigadas e sob o estresse durante o dia e à noite (Figuras 2Sb, 2Sd, 2Sf e 2Sh), com exceção da E mensurada durante a noite. Em relação à P_N, a concentração máxima de CO₂ de 2000 μmol CO₂ mol⁻¹ ar não limitou o aumento desse parâmetro nas plantas diurnas e noturnas e em plantas estressadas durante o dia (Figura 2Sb). A P_N de plantas sob estresse mensurada durante a noite

alcançou um valor máximo saturante abaixo de $5 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e foi o tratamento que apresentou uma maior quantidade de CO_2 subestomático, assim como para as outras variáveis ($>600 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$).

Plantas bem irrigadas diurnas e noturnas e plantas estressadas diurnas apresentaram menores valores de C_i , respectivamente para a P_N e as demais variáveis. Adicionalmente, os valores iniciais de C_i foram maiores em plantas estressadas durante a noite e dia, seguida de plantas bem irrigadas noturnas e diurnas. Plantas controle e estressadas durante o dia diferiram quanto aos valores de E , diferentemente de plantas noturnas que diferiram em apenas alguns pontos da curva, com plantas estressadas tendo aproximadamente transpiração nula com aumento de CO_{abs} (Figura S2d). Para os valores de g_s , não foi constatada diferença entre plantas controles e plantas estressadas diurnas, enquanto que plantas estressadas noturnas tiveram sua condutância diminuída significativamente em relação aos demais tratamentos, com valores próximos de zero (Figura S2f). Finalmente, a T_f de todos os tratamentos apresentaram comportamento aproximadamente constante com o aumento dos valores de C_i (Figura S2h).

2.3.2 Parâmetros Derivados das Curvas P_N x DFFF e P_N x C_i

Tabela 3 – Parâmetros fotossintéticos relativos à Respiração no escuro (R_{dark}), Ponto de compensação de luz (LCP) e fotossíntese líquida máxima ($P_N \text{ max}$) derivados da curva de resposta à luz (P_N x DFFF), taxa de carboxilação máxima da RUBISCO (V_{cmax}), Taxa de transporte de elétrons fotossintéticos (J_{max}), Respiração na presença da luz (R_d) e Condutância do mesofilo derivados da curva de CO_2 (P_n x C_i) durante o período diurno e noturno realizadas em plantas de Ora-Pro-Nóbis sob condições bem irrigadas e de déficit hídrico.

Variável	Período Diurno		Período Noturno	
	Bem Irrigado	Seca	Bem Irrigado	Seca
R_{dark}	0,67±0,10a	0,21±0,11b	0,55±0,08a	0,05±0,06b
LCP	18,9±2,03a	18,53±12,36a	12,91±0,76a	5,99±7,69a
$P_N \text{ max}$	11,87±0,6a	3,49±1,09b	10,97±1,86a	2,13±0,42b
V_{cmax}	67,5±4,21a	39,12±7,24b	65,43±2,08a	15,13±9,33b
J_{max}	90,62±5,66a	47,35±9,50b	95,89±25,34a	23,58±5,40a
R_d	0,38±0,37b	2,11±0,00a	1,85±0,16a	0,6±0,11b
g_m	0,07±0,00a	0,04±0,00b	0,07±0,00a	0,01±0,01b

Médias nas mesmas linhas com letras diferentes representam que não diferença entre os tratamentos hídricos pelo teste de Tukey a 5%.

Pode-se observar que, durante o dia e a noite houve redução significativa nos valores de R_{dark} e $P_n \text{ max}$ em plantas em estresse hídrico em relação a plantas bem irrigadas, enquanto nenhuma diferença foi constatada para variável LCP para os dois períodos. Nota-se também uma redução significativa em plantas estressadas nas variáveis V_{cmax} e g_m durante o dia e à noite. Para a variável J_{max} foram encontradas diferenças durante o dia, com grande redução em plantas estressadas diurnas e noturnas, no entanto, essa redução observada durante o período noturno não foi significativa estatisticamente. Plantas em estresse hídrico apresentaram uma maior taxa respiratória em presença da luz durante o dia, enquanto no período noturno, nota-se o comportamento inverso, com plantas bem irrigadas apresentando maiores valores de R_d (Tabela 3).

2.3.3 Relações Hídricas, Balanço Líquido Noturno de CO_2 e $\delta^{13}\text{C}$

Plantas bem irrigadas exibiram um Ψ_{leaf} quase nulo, enquanto que, com a aplicação do estresse hídrico, esse valor se tornou significativamente mais negativo. Ao final do período de reidratação, o status hídrico da folha retornou a níveis próximos de plantas bem irrigadas. Por outro lado, as plantas bem irrigadas apresentaram valores de F_N significativamente negativos, ao contrário de plantas submetidas ao estresse, que reduziram drasticamente a perda líquida de CO_2 . Após o período de reidratação, as plantas que estavam expostas à seca apresentaram valores de F_N mais negativos, porém, não o suficiente para diferir de quando estavam desidratadas. Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ foram similares entre os tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores de potencial hídrico (Ψ), assimilação noturna de CO_2 acumulada (F_N) e da composição do isótopo do carbono 13 ($\delta^{13}\text{C}$) em plantas de Ora-Pro-Nóbis sob as condições bem irrigadas, expostas à seca por 46 dias e com posterior reidratação por 16 dias.

Condição	$\Psi(\text{MPa})$	$F_N (\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ dias})$	$\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$
Bem Irrigado	-0,03±0,00a	-3,67±0,1b	-24,73±1,01a
Seca	-0,65±0,23b	-0,03±0,05a	-26,81±1,68a
Reidratação	-0,10±0,01a	-0,56±0,34a	-27,07±1,32a

Médias nas mesmas colunas com letras diferentes representam diferença entre tratamentos hídricos pelo teste de Tukey a 5%.

2.3.4 Biometria e Imagens dos Estômatos

Na região AB da folha, percebem-se maiores valores de D_e nas plantas estressadas, ao contrário da região AD em plantas controle que, numericamente, apresentaram mais estômatos por área. Os maiores valores de A_o foram verificados durante o dia em plantas bem irrigadas, em ambas as regiões foliares, sendo nenhuma abertura verificada em plantas estressadas na região AB em plantas estressadas. No período noturno, não foi verificada nenhuma abertura estomática, independentemente das regiões foliares e dos tratamentos hídricos (Tabela 5). Ver também Figura S1.

Tabela 5 – Valores de densidade estomática e Nível de abertura do ostíolo obtidos em plantas de Ora-Pro-Nóbis bem irrigadas e sob as condições de seca, na epiderme Abaxial (AB) e Adaxial (AD) da folha, durante o período diurno.

Condição	Densidade Estomática (D_e)		Abertura do Ostíolo (A_o)			
			Dia		Noite	
	AB	AD	AB	AD	AB	AD
Controle	3,33±0,3b	1,28±0,44a	3,01±1a	2,62±0,07a	0,00±0,00a	0,00±0,00a
Seca	4,50±0,26a	1,16±0,26a	0,00±0,00b	1±0,19b	0,00±0,00a	0,00±0,00a

Médias nas mesmas colunas com letras diferentes representam diferença entre tratamentos hídricos pelo teste de Tukey a 5%.

2.3.5 Acidez Titulável

Não houve diferenças significativas entre tratamentos hídricos e no horário de coleta, no entanto, é notado que em plantas submetidas à seca obtiveram os maiores valores de acidez ao fim do período noturno, numericamente. Da mesma forma, foi constatada uma elevada acidez em plantas controle ao fim do período diurno (Tabela 6).

2.3.6 Metabolismo Oxidativo, Açúcares e Peroxidação de Membrana

Os valores de CST e de $TBAR_S$ não diferiram entre os tratamentos durante o fim do período diurno (Figuras S3a e S3b). No entanto, ao amanhecer, os maiores valores foram constatados em plantas estressadas, porém, com valores de não diferindo estatisticamente após a reidratação. Além disso, no fim da noite os níveis de $TBAR_S$

reduziram após a reidratação a valores equivalentes a plantas controles (Figura S3b). Em relação ao parâmetro GSH, foram verificados valores elevados em ambos os períodos após aplicação do estresse (Figura S3d). Após a reidratação, os níveis de GSH foram reduzidos significativamente nos períodos que antecedem o dia e a noite, sendo em níveis similares a plantas bem hidratadas ao final da tarde. Quanto às variações de ASA, não foram verificados efeitos de tratamentos nos dois períodos analisados (Figura S3c).

Tabela 6 – Acidez titulável $[H^+]$ no fim do período diurno e noturno e variação diurna da acidez $\Delta[H^+]$ em plantas de Ora-Pro-Nóbis bem irrigadas e submetidas à suspensão da rega por sete dias e posterior reidratação por mais sete dias cultivadas em casa de vegetação.

Condição	$[H^+]$		$\Delta[H^+]$
	Fim do Período Diurno	Fim do Período Noturno	
Controle	100,00±47,14a	66,66±0,00a	-33,33±47,14a
Seca	66,66±0,00a	100,00±0,00a	33,33±0,00a
Reidratação	83,33±23,57a	66,66±33,33a	-16,66±23,57a

Médias nas mesmas colunas com letras iguais representam que não diferença entre os tratamentos hídricos pelo teste de Tukey a 5%.

2.4 Discussão

Plantas de Ora-Pro-Nóbis operam no modo C3 quando o suprimento hídrico é adequado. O Metabolismo CAM é induzido nessa planta em baixa escala quando a mesma é sujeita ao déficit hídrico. Através dos dados analisados, o tipo de plasticidade encontrada nessa espécie converge para *CAM-Cycling*, mecanismo que garante menores perdas de carbono noturno e a integridade do PSII. Em curto prazo as plantas retornam à C3 quando são irrigadas novamente, mostrando que essa transição é opcional.

2.4.1 Impactos do Déficit Hídrico no Crescimento, na Atividade do PSII e na Plasticidade do Metabolismo do Carbono Diário em Plantas de Ora-Pro-Nóbis

A massa fresca da folha foi significativamente diminuída em plantas estressadas (Tabela 1), comportamento constatado em diversos trabalhos (De Herralde et al. 1998; Lu e Zhang 1999; Liu e Stützel 2004; Degu et al. 2008). Isso pode estar atribuído também às alterações morfológicas e fisiológicas na planta, como no tamanho da folha e

no metabolismo do carbono e do nitrogênio causadas pela seca (Kluge 1976). Com relação à massa fresca do caule, similaridade entre os tratamentos hídricos pode estar relacionada ao nível de suculência do órgão. Todavia, a diferença de umidade nesse órgão pode ser explicada pelo transporte de água para as folhas, evitando a abscisão foliar. As cactáceas costumam investir em partes aéreas suculentas, aumentando a massa fresca nesse órgão. Além disso, o componente da massa fresca possivelmente contribuiu para a existência de diferenças entre a massa fresca total de plantas irrigadas e expostas à seca, assim como a massa fresca da parte aérea.

Os valores de fluorescência da clorofila *a*, paralelamente aos parâmetros fotoquímicos se apresentaram basicamente iguais nos tratamentos hídricos (Tabela 2), o que garante a integridade do PSII. A eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m) não foi alterada em função da seca, o que não caracteriza a fotoinibição (valores próximos de 0,8) (Björkman e Demmig 1987). Os valores pontuais de NPQ aumentaram ligeiramente em plantas sob o déficit hídrico, embora não haja diferenças estatísticas. É demonstrado que o NPQ é um parâmetro associado à dissipação do excesso de energia em forma de calor em plantas estressadas através do aumento nos pigmentos fotossintéticos zeaxantina e antheraxantina (Murchie e Niyogi 2011). Além disso, a fotoproteção do PSII pode ser explicada pelos sistemas de reparo, assim como o processo da síntese de novo da proteína D1.

As diferenças fotoquímicas puderam ser observadas pela curva IC (Figura 1), onde a eficiência fotossintética decaiu em plantas estressadas. Essa redução no rendimento fotoquímico pode estar associada ao acúmulo de ATP na folha em modo CAM (Niewiadomska et al. 2004) e variações diurnas da acidez (Stemler 2002). No entanto, o NPQ tende a ser mais proeminente à noite em plantas estressadas (Matuoka et al. 2018), o que não foi visto na curva IC noturna.

As análises noturnas, com uso da luminosidade, de fato, interferiram no ciclo circadiano das plantas e se mostraram importantes para verificar a eficiência fotossintética. Pelos dados de trocas gasosas no tempo, o início de decaimento da P_N ocorreu a partir dos 10 dias de aplicação do estresse hídrico até os 46 dias (Figura 2a). Nesse intervalo, as plantas submetidas à seca exibiram fotossíntese e abertura estomática (Tabela 5 e Figura S1) no período diurno, com fixação noturna (sem abertura estomática) (Figura 2a e 2c) e aumento nos parâmetros P_N/E e P_N/g_s (Figuras 2e, 2f, 3e e 3f). Além disso, durante a noite as plantas estressadas não apresentaram atividade estomática e transpiratória, assim como as plantas bem irrigadas, que, no entanto,

assumiram valores negativos de P_N , que é uma característica de padrões de trocas gasosas C3.

Pelas curvas $P_N \times DFFF$ e $P_N \times C_i$ percebe-se que a eficiência fotossintética diária foi intensamente reduzida pela seca (Figura 2S e Tabela 3), pelo fato de interferir intensamente na dinâmica da RUBISCO (Perdomo et al. 2017) e na diminuição da concentração das enzimas chave envolvidas no ciclo de Calvin-Benson (Lawlor e Cornic 2002). Nesse contexto, o alto valor da razão C_i/C_a observado na Figura 2h em plantas estressadas pode ser relacionado à diminuição na eficiência nas reações de carboxilação (Farquhar e Sharkey 1982) e redução na difusão de CO_2 no mesófilo (Tabela 3), interferindo na modulação estomática (Flexas e Medrano 2002).

A fixação noturna de CO_2 , mesmo em baixa intensidade, além do aumento da P_N/E e P_N/g_s (Figuras 2e, 2f, 3e e 3f) é uma clara característica de CAM induzida pela seca (Winter e Holtum 2017; Herrera et al. 2015; Holtum et al. 2017). Adicionalmente, valores significativamente negativos de P_N estão associados ao aumento na respiração mitocondrial, que pode ser reduzida em face ao déficit hídrico (Winter et al. 2008). Com nove dias de reidratação, as plantas submetidas ao déficit hídrico retornam aos padrões de trocas gasosas iniciais, característicos de plantas C3. Esse mesmo fenômeno foi demonstrado em *Calandrinia polyandra* (Montiaceae), uma espécie que habita os desertos da Austrália com fontes efêmeras de água (Winter e Holtum 2011; Holtum et al. 2017). A diminuição da P_N e g_s após o segundo ciclo de reidratação pode estar relacionada à ação do ácido abscísico (ABA) (Kriedemann et al. 1975; Liang et al. 1997) causando fechamento estomático ou pela natureza constitutiva de CAM (Figuras 2a e 2c). No entanto, o ABA não foi mensurado nesse trabalho. Além disso, a dinâmica da g_s está de acordo com os dados de abertura estomática descrita na Tabela 5, uma variável simples, porém bastante importante marcador de CAM.

Nesse caso, podemos inferir que as plantas de Ora-Pro-Nóbis bem irrigadas se comportaram como C3 e alternaram para CAM em déficit hídrico. Como os estômatos se apresentaram fechados durante a noite e houve baixa fixação noturna, essas plantas podem ser caracterizadas como CAM-*Cycling* quando submetidas ao déficit hídrico. Todavia, Winter (2019) disserta que CAM-*Cycling* não é um mecanismo suficiente para a planta exibir valores de assimilação líquida de CO_2 positivos, ao contrário do que ocorreu nesse trabalho. Além disso, a literatura mostra que valores noturnos de P_N abaixo de zero e baixos valores de C_i e C_i/C_a indicam o começo da fase I de CAM (Mashari et al. 2015), o que também não foi observado. É mostrado que esse

mecanismo de CAM além de auxiliar na economia hídrica é uma estratégia adaptativa que minimiza a perda de carbono noturno e evita a fotoinibição em estresse de alta intensidade (Cushman 2001; Scarano et al. 2016).

2.4.2 Plantas de Ora-Pro-Nóbis apresentam Tolerância e Operam em Modo CAM-Cycling em Baixa Disponibilidade Hídrica

CAM-Cycling pôde ser verificado em termos horários de maneira semelhante aos valores diários em plantas de Ora-Pro-Nóbis submetidas ao déficit hídrico (Figuras 2 e 3), indicando que essa característica deve mais comum do que se parece. Em outros estudos, a refixação do CO₂ respiratório foi confirmada em duas espécies de Ora-Pro-Nóbis submetidas ao déficit hídrico, na forma *Idling* (*Pereskia aculeata* e *Pereskia grandifolia*) (Rayder e Ting, 1981), enquanto que, sob as condições hídricas ideais, a planta exibiu fotossíntese C3 (Rayder e Ting, 1981; Nobel e Hartsock, 1986). Adicionalmente, Edwards e Donoghue (2006) caracterizam o gênero *Pereskia* como plantas que realizam CAM-Cycling em baixa intensidade. Nesse contexto, Edwards e Diaz (2006) demonstraram por cladograma a existência de um ancestral que exibia CAM-Cycling e que deu origem a dois tipos de *Pereskia* (com e sem atividade estomática no caule), podendo algumas espécies refixar carbono em modo CAM-*Idling* quando expostas ao déficit hídrico.

Plantas de Ora-Pro-Nóbis apresentaram uma redução significativa das perdas de CO₂ noturno e potencial hídrico quando submetidas ao déficit hídrico e semelhanças nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ (Tabela 4). Após a reidratação, o balanço líquido de carbono voltou a ser significativamente negativo e os valores de ψ_{leaf} retornam aos valores de plantas controle. No entanto, pelos valores de $\delta^{13}\text{C}$ não se encaixa com a hipótese de indução e reversão de CAM. Essas similaridades podem está atribuídas à capacidade reduzida de discriminação da PEPC ao ¹³C (Cushman e Borland 2002), a qual a atividade pode ter sido induzida pela seca, mas em níveis baixíssimos. Valores mais negativos $\delta^{13}\text{C}$ indicam expressão da rota C3. Winter (2019) comenta que plantas com metabolismo CAM geralmente possuem valor de $\delta^{13}\text{C}$ entorno de 20 ‰. Além disso, Herrera et al. (2015) afirmaram que a diminuição de $\delta^{13}\text{C}$ se deve ao fechamento estomático, estando relacionada à variável C_i/C_a , a qual é inversamente proporcional à eficiência no uso da água (Flanagan e Farquhar 2014).

O potencial hídrico é um indicativo do status hídrico da folha. Logo, plantas que estão sujeitas a uma seca extensiva possuem um grande decréscimo nesse parâmetro

(Reinhardt et al. 2015). Sob o déficit hídrico, as células perdem pressão de turgescência, diminuindo ψ da folha. Todavia, a atividade estomática é um importante processo para manutenção do potencial hídrico foliar (Sperry et al. 2002). Após a reidratação, as células restauram o potencial de pressão, recuperando o ψ_{leaf} . Yan et al. (2017) confirmaram esse comportamento em *Amorpha fruticosa* e *Robinia pseudoacacia*. Pode-se perceber também que as plantas de Ora-Pro-Nóbis possuem baixa atividade estomática, e os valores de ψ_{leaf} em plantas estressadas podem reforçar que esse comportamento é um mecanismo adaptativo na conservação do status hídrico da planta.

Nesse experimento, a pequena expressão de CAM também pôde ser verificada pelos dados de acidez (Tabela 6). Os valores de acidez em plantas bem irrigadas podem dar indícios de CAM constitutivo, ou seja, que é expresso independentemente do estresse (Winter e Holtum 2017; Holtum et al. 2017). As espécies CAM possuem uma maior acidez no período noturno, comportamento constatado em *Pereskia* nesse trabalho. Com a reidratação, as plantas retornam aos valores de acidez similar ao controle, evidenciando a reversão de CAM para C3 com a remoção do estresse (Winter e Holtum 2017; Holtum et al. 2017). Além disso, a pequena variação da acidez é característica de plantas CAM-Cycling (Cushman 2001).

2.4.3 Metabolismo de Açúcares e Antioxidante é intensificado Durante o Período Noturno em Plantas de Ora-Pro-Nóbis Crescidas em Regimes Reduzidos de Água

Na Figura 3Sa é notável perceber acréscimo significativo na quantidade de carboidratos em plantas de Ora-Pro-Nóbis submetidas ao déficit hídrico durante à noite. É relatado que o conteúdo de açúcares solúveis nas folhas tende a aumentar em plantas desidratadas (Chaves et al. 2009). No entanto, em condições extremas de déficit hídrico (habitats de plantas CAM-Idling) essa variável pode ser reduzida drasticamente (Magalhães-Filho et al. 2008). Esse fator pode ser explicado pela baixa eficiência de assimilação de carbono nessas condições e a utilização de reservas de carboidratos para garantir o crescimento da planta.

O aumento de carboidratos livres no fim do período noturno pode ser explicado pelas baixas temperaturas frequentes durante a noite (Allen e Ort 2001). Além disso, o grande aumento noturno do conteúdo de TBAR_s sugere que a capacidade de defesa antioxidante dessa planta é limitada pela peroxidação de membrana nesse período (Figura 3Sb). Quanto aos valores de ASA (Figura 3Sc) percebe-se nenhum efeito, ao

contrário dos valores de GSH, com grandes aumentos em ambos períodos analisados (Figura 3Sd). O grande aumento nos valores de GSH possa está relacionados com a alta atividade da enzima glutathione redutase (GR), enquanto o ascorbato, pelas baixas quantidades dos compostos deidroascorbato (DHAR) e monodeidroascorbato (MDHAR) (Das e Roychoudhury 2014).

2.5 Conclusão

Conclui-se que sob o déficit hídrico, as plantas de Ora-Pro-Nóbis apresentam diminuição da eficiência fotossintética, no entanto, uma alta capacidade foto-protetiva no PSII. Paralelamente, as plantas exibiram características *CAM-Cycling*, ou seja, exibindo baixa fixação de carbono, fechamento estomático e acidez no período noturno, garantindo uma menor perda de carbono noturno. Com a reidratação, as plantas apresentaram padrões de trocas gasosas C3, assim como as plantas bem irrigadas, indicando transição fotossintética nessas plantas pode ser inteiramente opcional. Assim, os mecanismos que envolvem mudanças no metabolismo do carbono em plantas CAM podem auxiliar no entendimento do estabelecimento dessas espécies frente aos diversos estresses ambientais.

2.6 Referências

Allen, D. J.; Ort, D. R. Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warmclimate plants. **Trends in Plant Science**, v.6, n. 1, p. 36-41, 2001.

Black, C. C.; Osmond, C. B. Crassulacean acid metabolism photosynthesis: 'working the night shift'. **Photosynthesis Research**, v. 76, n. 1-3, p. 329-341, 2003.

Bilger, W.; Björkman, O. Role of xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. **Photosynthesis Research**, v. 25, n. 3, p. 173-185, 1990.

Björkman, O.; Demmig, B. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. **Planta**, v. 170, n. 4, p. 489-504, 1987.

Blum, A. Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. In: Belhassen, I. (Ed.). **Drought tolerance in higher plants: genetical, physiological and molecular biological analysis**. 1. ed. Dordrecht – Netherlands: Kluwer Academic, 1997. p. 57-70.

Borland, A. M. et al. The photosynthetic plasticity of crassulacean acid metabolism: an evolutionary innovation for sustainable productivity in a changing world. **New Phytologist**, v. 191, n. 3, p. 619-633, 2011.

Brilhaus, D. et al. Reversible burst of transcriptional changes induction of crassulacean acid metabolism (CAM) in *Talinum triangulare*. **Plant Physiology**, v. 170, n. 1, p.102-122, 2016.

Busch, F. A. Photosynthetic gas exchange in land plants at the leaf level. In: Covshoff, S. (Ed.). **Photosynthesis: methods and protocols**. 1. ed. Springer, 2018. p. 25-44.

Chaves, M. M. et al. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, v. 103, n. 4, p. 551- 560, 2009.

Coe, R. A.; Lin, H. C. Light response curves in land plants. In: Covshoff, S. (Ed.). **Photosynthesis: Methods and Protocols**. 1. ed. Springer, 2018. p. 83-94.

- Cushman, J. C.; Borland, A. M. Induction of CAM by water limitation. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, n. 2, p. 295-310, 2002.
- Cushman, J. C. Crassulacean acid metabolism. A plastic photosynthetic adaptation to arid environments. **Plant Physiology**, v. 12, n. 4, p. 1439-1448, 2001.
- Cushman, J. C. et al. Isolation and characterization of mutants of common ice plant deficient in crassulacean acid metabolism. **Plant Physiology**, v. 147, p. 228-238, 2008.
- Das, K.; Roychoudhury, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 2, n. 53, p. 1-13, 2014.
- Degu, H. et al. Drought tolerance of *Eragrostis tef* and development of roots. **International Journal of Plant Science**, v. 169, n. 6, p. 768-775, 2008.
- De Herralde, F. et al. Effect of water and salt stresses on growth, gas exchange and water relations in *Argyranthemum coronopifolium* plants. **Plant Science**, v. 139, p. 9-17, 1998.
- Dubois, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- Dunn, C. W. Agalma: an automated phylogenomics workflow. **BMC Bioinformatics**, v. 14, n. 330, p. 300-315, 2013.
- Edwards, E. J.; Donoghue, M. J. Is it easy to move and easy to evolve? Evolutionary accessibility and adaptation. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 13, p. 4047-4052, 2013.
- Edwards, E. J. et al. Basal cactus phylogeny: implications of *Pereskia* (Cactaceae) paraphyly for the transition to the cactus life form. **American Journal of Botany**, v. 7, n. 92, p. 1177-1788, 2005.
- Ellsworth, P. V. et al. Cell wall properties in *Oryza sativa* influence mesophyll CO₂ conductance. **New Phytologist**, v. 219, n. 1, p. 66-76, 2018.
- Farquhar, G. D, Sharkey T. D. Stomatal conductance and photosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 33, p. 317-345, 1982.

Fathi, A.; Tari, D. B. Effect of drought stress and its mechanism in plants. **International Journal of Life Sciences**, v. 10, n. 1, p. 1-6, 2016.

Flanagan, L. B.; Farquhar G. D. Variation in the carbon and oxygen isotope composition of plant biomass and its relationship to water-use efficiency at the leaf-and ecosystem-scales in a northern Great Plains grassland. **Plant and Cell Environment**, v. 37, n. 2, p. 425-438, 2014.

Flexas, J.; Medrano H. Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. **Annals of Botany**, v. 89, n. 2, p. 183-190, 2002.

Genty, B. et al. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 990, n. 1, p. 87-92, 1989.

Griffith, O. W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. **Analytical Biochemistry**, v. 106, n. 1, p. 207-212, 1980.

Habibi, G.; Ajory, N. The effect of drought of photosynthetic plasticity in *Marrubium vulgare* plants growing at low and high altitudes. **Journal of Plant Research**, v. 128, n. 6, p. 987-994, 2015.

Hanscom, Z.; Ting I. P. Responses of succulents to plant water stress. **Plant Physiology**, v. 61, n. 3, p. 327-330, 1978.

Heath, R. L.; Packer, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, n. 1, p. 189–198, 1968.

Heyduk, K. et al. Gas Exchange and leaf anatomy of a C3-CAM hybrid, *Yucca gloriosa* (Asparagaceae). **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 5, p. 1369-1379, 2016.

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.

Herrera, A. et al. What is the potential for dark CO₂ fixation in the facultative crassulacean acid metabolism species *Talinum triangulare*?. **Journal of Plant Physiology**, v. 174, p. 55-61, 2015.

Hoagland, D. R.; Arnon, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station Circular**, v. 347, p.1-32, 1950.

Holtum, J. A. M. et al. Facultative CAM photosynthesis (crassulacean acid metabolism) in four species of *Calandrinia*, ephemeral succulents of arid Australia. **Photosynthesis Research**, v. 134, n. 1, p. 17-25, 2017.

Lawlor, D. W.; Cornic, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, n. 2, p. 275-294, 2002.

Liang, J. et al. Can stomatal closure caused by xilem ABA explain the inhibition of leaf photosynthesis under soil drying? **Photosynthesis Research**, v. 51, n. 2, p. 149-159, 1997.

Liu, F.; Stützel.; H. Biomass partitioning, specific leaf area, and water use efficiency of vegetable amaranth (*Amaranthus* spp.) in response to drought stress. **Scientia Horticulturae**, v. 102, n. 1, p. 15-27, 2004.

Lu, C.; Zhang, J. Effects of water stress on photosystem II M. BERTAMINI et al. 154 photochemistry and its thermostability in wheat plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, n. 336, p. 1199-1206, 1999.

Lüttge, U. Ability of crassulacean acid metabolism plants to overcome interacting stresses in tropical environments. **AoB Plants**, v. 2010, n. 5, p. 1-15, 2010.

Lüttge, U. CO₂-concentrating: consequences in crassulacean acid metabolism. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 378, p. 2131-2142, 2002.

Lüttge, U. Ecophysiology of crassulacean acid metabolism. **Annals of Botany**, v. 93, n. 6, p. 629-652, 2004.

Kaiser, W. M. Effects of water deficit on photosynthetic capacity. **Physiologia Plantarum**, v. 71, n. 1, p. 142-149, 1987.

Kampfenkel, K. et al. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. **Analytical biochemistry**, v. 225, n. 1, p. 165-167, 1995.

Kitajima, M.; Butler, W. L. Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 376, n. 1, p. 105-115, 1974.

Kluge, M. Carbon and nitrogen metabolism under water stress. In: Lange, O. L. et al. (Ed.). **Water and Plant Life**. Verlag, Berlin – Heidelberg – New York: Springer, 1976. p. 243-252.

Kriedemann, P. E. et al. Internal control of stomatal physiology and photosynthesis. II. Photosynthetic responses to phaseic acid. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 2, n. 4, p. 553-567, 1975.

Kooten, O. V.; Snel, J. F. H. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. **Photosynthesis Research**, v. 25, n. 3, p. 147-150, 1990.

Kramer, D. M. et al. New flux parameters for the determination of Q_A redox state and excitation flux. **Photosynthesis Research**, v. 79, n. 2, p. 209-218, 2004.

Kuźniak, E. et al. Photosynthesis-related characteristics of the midrib and the interveinal lamina in leaves of the C3-CAM intermediate plant *Mesembryanthemum crystallinum*. **Annals of Botany**, v. 117, n. 7, p. 1141-1151, 2016.

Magalhães-Filho, J. R. et al. Deficiência hídrica, trocas gasosas e crescimento de raízes em laranjeira ‘Valência’ sobre dois tipos de porta-enxerto. **Bragantia**, v.67, n. 1, p. 693-699, 2008.

Marshall, B.; Biscoe, P. V. A model for C3 leaves describing the dependence of net photosynthesis on irradiance: II. Application to the analysis of flag leaf photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 31, n. 1, p. 41–48, 1980.

Masrashi, Y. S. et al. Photosynthetic adaptation and survival strategy of *Duvalia velutina* in an extremely arid environment. **Photossynthetica**, v. 53, n. 4, p. 555-561, 2015.

Matsuoka, T. et al. Crassulacean acid metabolism induction in *Mesembryanthemum crystallinum* can be estimated by non-photochemical quenching upon actinic illumination during the dark period. **Plant and Cell Physiology**, v. 0, n. 0, p. 1-7, 2018.

Morton, J. F. **Barbados gooseberry**. In: Fruits of warm climates. Miami: Creative Resource Systems, Inc., 1987. p. 349-351.

Murchie, E. H.; Niyogi K. K. Manipulation of photoprotection to improve plant photosynthesis. **Plant Physiology**. v. 155, p. 86-92, 2011.

Niewiadomska, E. et al. A salinity-induced C3–CAM transition increases energy conservation in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L. **Plant and Cell Physiology**, v. 45, n. 6, p. 789-794, 2004.

Olckers, T. Targeting emerging weeds for biological control in South Africa: the benefits of halting the spread of alien plants at an early stage of their invasion. **South African Journal of Science**, v. 100, n. 1, p. 64-69, 2004.

OSMOND C. B. Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context. **Annu Review of Plant Physiology**, v. 29, n. 1, p. 379-414, 1978.

Oxborough, K.; Baker, N. R. Resolving chlorophyll fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components – calculation of qP and Fv'/Fm' without measuring Fo'. **Photosynthesis Research**, v. 54, p. 135-142, 1997.

Perdomo, J. A. et al. Rubisco and rubiscoactivase play an important role in the biochemical limitations of photosynthesis in rice, wheat and maize under high temperature and water deficit. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. 490, p. 1-15, 2017.

Pompeu, D. G. et al. Anti-nutritional factors and “in vitro” digestibility of leaves of *Pereskia aculeata* Miller. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2014.

Rayder, L.; Ting, I. P. CAM-idling in *Hoya carnosa* (Asclepiadaceae). **Photosynthesis Research**, v. 4, n. 3, p. 203-211, 1983.

Reinhardt, K. et al. Linking carbon and water relations to drought-induced mortality in *Pinus flexilis* seedlings. **Tree Physiology**, v. 35, n. 7, p. 771-782, 2015.

Reyes, L. F. et al. The increase in antioxidant capacity after wounding depends on the type of fruit or vegetable tissue. **Food Chemistry**, v. 101, n. 3, p. 1254-1262, 2007.

Scarano, F. R. et al. Features of CAM-cycling expressed in dry season by terrestrial and epiphytic plants of *Clusia arrudae* Planchon & Triana in two rupestrian savannas of southeastern Brazil in comparison to the C3-species *Eremanthus glomerulatus* Less. **Trees**, v. 30, n. 3, p. 913-922, 2016.

Scholander, P. F. et al. Sap pressure in vascular plants: negative hydrostatic pressure can be measured in plants. **Science**, v. 148, n. 3668, p. 339-346, 1965.

Schreiber, U.; Schliwa, U.; Bilger, W. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. **Photosynthesis Research**, v. 10, n. 1-2, p. 51-62, 1986.

Sipes, D. L.; Ting, I. P. Crassulacean acid metabolism and crassulacean acid metabolism modifications in *Peperomia camptotricha*. **Plant Physiology**, v. 77, n. 1, p. 59-63, 1985.

Sperry, J. S. et al. Water deficits and hydraulic limits to leaf water supply. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, n. 2, p. 251-263, 2002.

Stemler A. J. The bicarbonate effect, oxygen evolution, and the shadow of Otto Warburg. **Photosynthesis Research**, v. 73, n. 1-3, p.177-183, 2002.

Weed Management Guide. Leaf cactus – *Pereskia aculeata*. Canberra, Austrália. 2003. Disponível em: <<http://www.weeds.gov.au/publications/guidelines/alert/pubs/p-aculeata.pdf>>. Acesso em: 21 out. 2013.

Winter, K. Ecophysiology of constitutive and facultative CAM photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, p. 1-14, 2019.

Winter, K. et al. Drought-stress-induced up-regulation of CAM in seedlings of a tropical cactus, *Opuntia elatior*, operating predominantly in the C3 mode. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 11, p. 4037-4042, 2011.

Winter, K.; Holtum, J. A. M. Induction and reversion of crassulacean acid metabolism in *Calandrinia polyandra*: effects of soil moisture and nutrients. **Functional Plant Biology**, v. 38, n. 13, p. 576-582, 2011.

Winter, K. et al. On the nature of facultative and constitutive CAM: environmental and developmental control of CAM expression during early growth of *Clusia*, *Kalanchoe*, and *Opuntia*. **Journal of Experimental Botany**, 59, n. 7, p. 1829-1840, 2008.

Winter, K.; Holtum, J. A. M. Facultative crassulacean acid metabolism (CAM) plants: powerful tools for unravelling the functional elements of CAM photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, p. 3425-3441, 2014.

Winter, K.; Holtum J. A. M. How closely do the $\delta^{13}\text{C}$ values of crassulacean acid metabolism plants reflect the proportion of CO_2 fixed during day and night? **Plant Physiology**, v. 129, n. 4, p. 1843-1851, 2002.

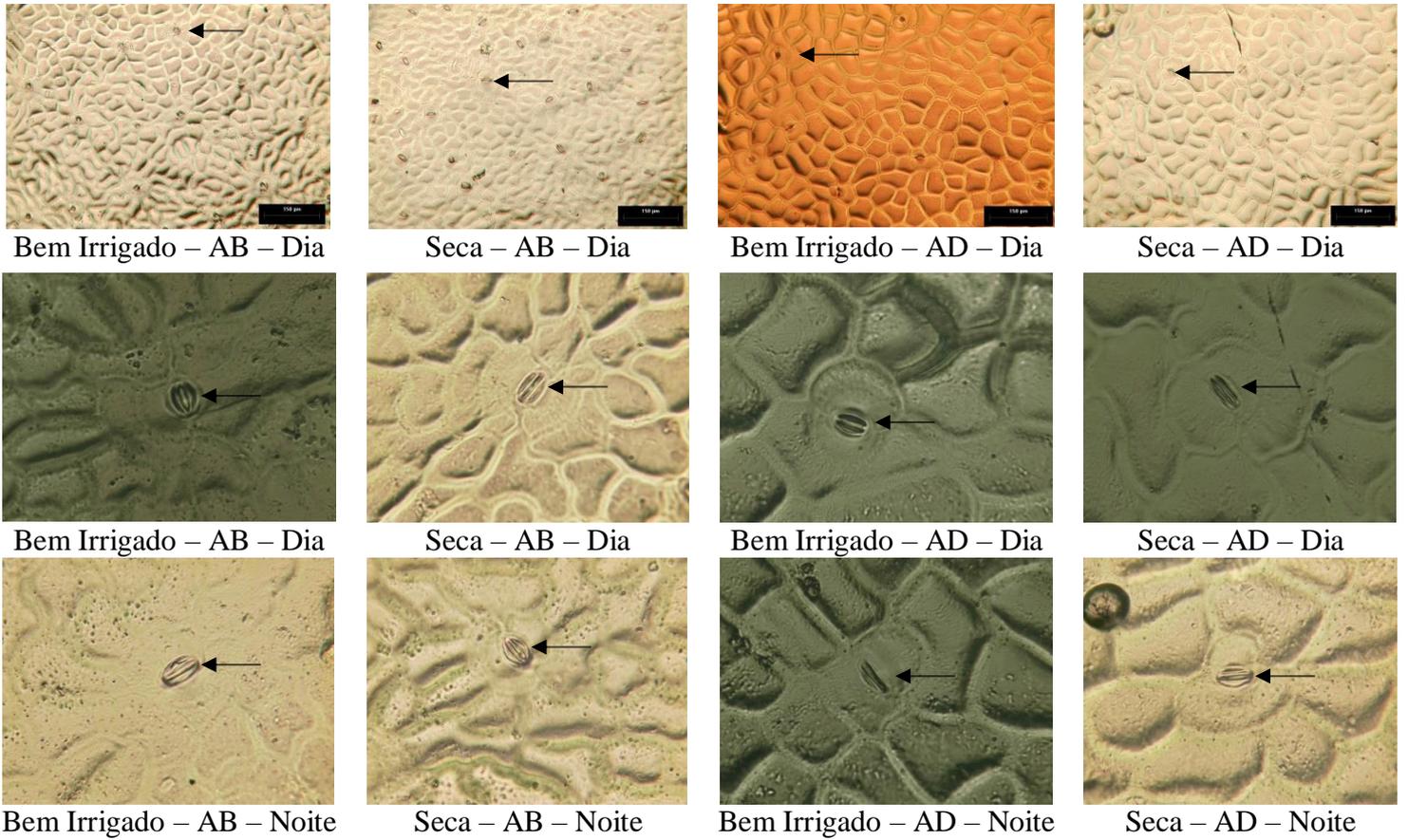
Winter, K.; Holtum, J. A. M. Facultative crassulacean acid metabolism (CAM) in four small C3 and C4 leaf-succulents. **Australian Journal of Botany**, v. 65, n. 2, p. 103-108, 2017.

Thornley, J. H. M.; Johnson, I. R. **Plant and crop modelling: a mathematical approach to plant and crop physiology**. 1 ed. Oxford: The Blackburn Press, 2002. 688p.

Yan, W. et al. Contrasting dynamics of leaf potential and gas exchange during progressive drought cycles and recovery in *Amorphafruticosa* and *Rabinia pseudoacacia*. **Nature**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.

Yang, X. et al. A roadmap for research on crassulacean acid metabolism (CAM) to enhance sustainable food and bioenergy production in a hotter, drier world. **New Phytologist**, v. 207, n. 3, p. 491-504, 2015.

2.7 Material Suplementar



Bem Irrigado – AB – Noite Seca – AB – Noite Bem Irrigado – AD – Noite Seca – AD – Noite

Figura S1 – Representação da densidade e abertura estomática presentes nas epidermes Abaxiais (AB) e Adaxiais (AD) em plantas de ora-pro-nóbis bem irrigadas e submetidas à seca. As imagens relativas à densidade foram obtidas através de microscopia óptica com uso de lente 10x em resolução 150 µm. Para abertura do ostíolo foi utilizada a lente de 40x. As setas pretas localizam um estômato para referência.

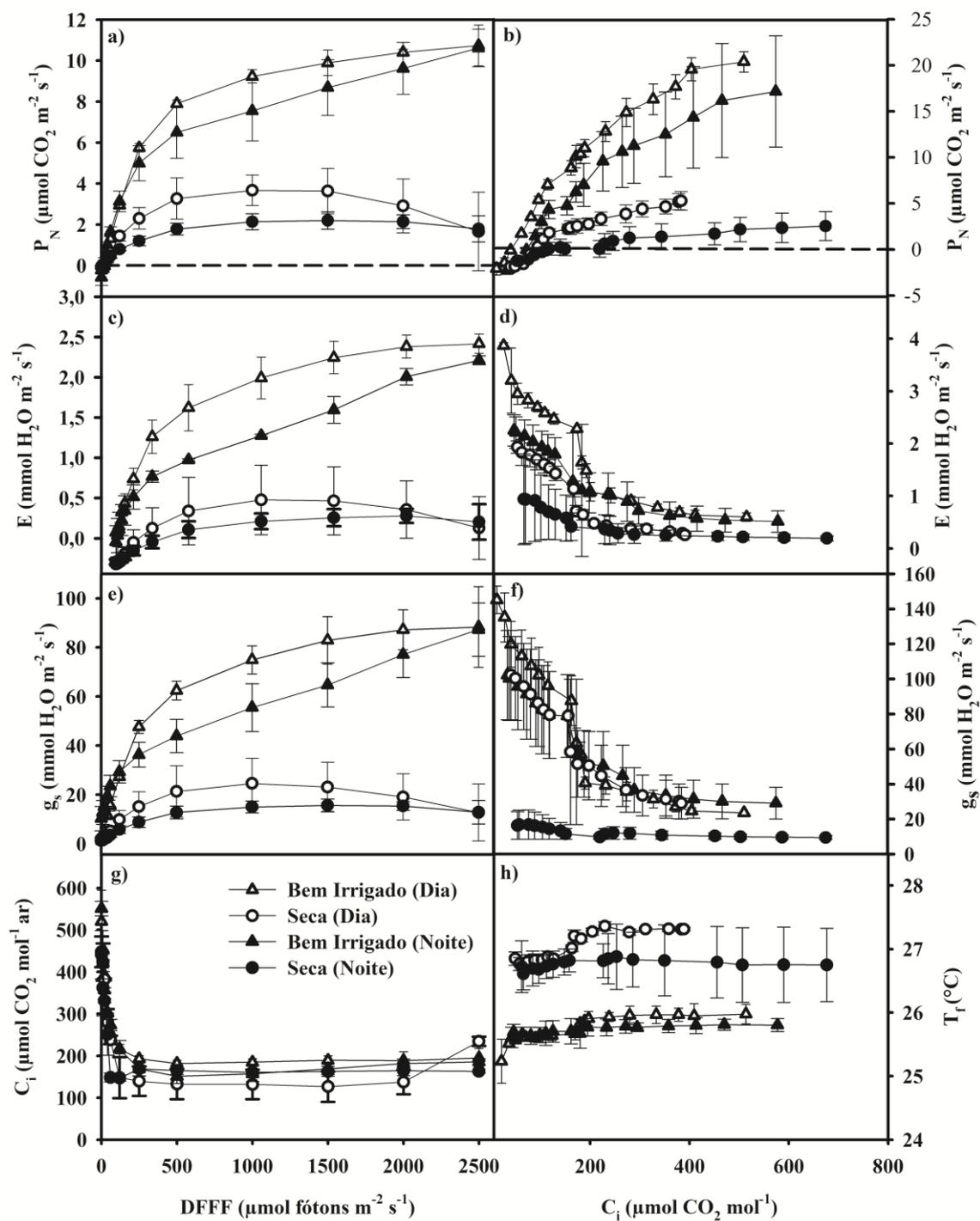


Figura S2 – Curva de resposta à luz ($P_N \times \text{DFFF}$) e CO_2 ($P_N \times C_i$) para as variáveis fotossíntese líquida (P_N) (a e b), transpiração (E) (c e d), condutância estomática (g_s) (e e f), concentração intercelular de CO_2 (C_i) (g) e temperatura da folha (T_f) (h) em plantas de Ora-Pro-Nóbis bem irrigadas e submetidas a 46 dias de déficit hídrico em uma câmara de crescimento.

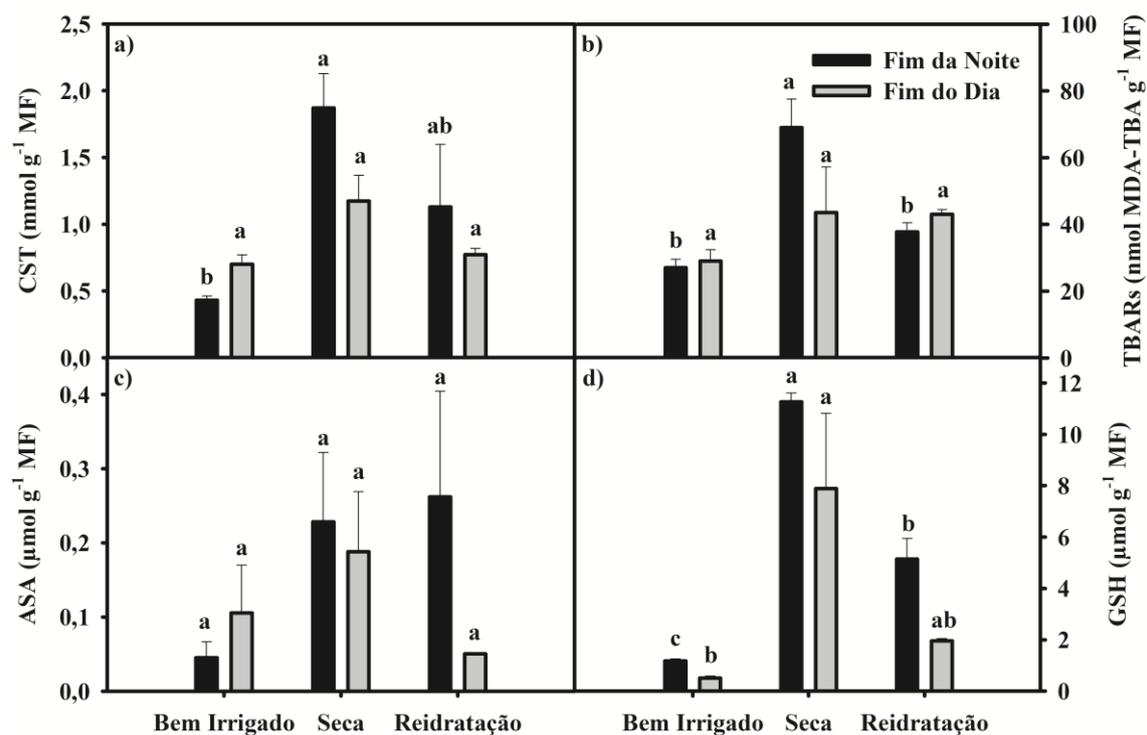


Figura S3 – Conteúdo de carboidratos solúveis (CST) (a), dano de membrana por peroxidação de membrana (TBAR_S) (b), conteúdo de ascorbato reduzido (ASA) (c) e conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) em plantas de Ora-Pro-Nóbis bem irrigadas e submetidas a 7 dias de suspensão da rega e mais 7 dias de reidratação realizados às 18:00h e 6:00h.