Dioceni Mancilha

**Respostas à deficiência hídrica relacionadas à ontogenia foliar em
Guzmania monostachia (Bromeliaceae): variações do potencial hídrico
e expressão de diferentes padrões do Metabolismo Ácido das
Crassuláceas (CAM)**

Responses to water deficiency related to foliar ontogeny in *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae): water potencial variations and different patterns in the Crassulacean Acid Metabolism (CAM) expression

São Paulo

2017

Dioceni Mancilha

**Respostas à deficiência hídrica relacionadas à ontogenia foliar em
Guzmania monostachia (Bromeliaceae): variações do potencial hídrico
e expressão de diferentes padrões do Metabolismo Ácido das
Crassuláceas (CAM)**

Responses to water deficiency related to foliar ontogeny in *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae): water potencial variations and different patterns in the Crassulacean Acid Metabolism (CAM) expression

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Botânica.

Orientador(a): Helenice Mercier

São Paulo

2017

Ficha Catalográfica

Mancilha, Dioceni

Respostas à deficiência hídrica relacionadas à ontogenia foliar em *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae): variações do potencial hídrico e expressão de diferentes padrões do Metabolismo Ácido das Crassuláceas (CAM)

Número de páginas: 65

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

1. Bromélia epífita 2. Ajuste osmótico 3. Metabolismo ácido das crassuláceas 4. ontogênia I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a).Helenice Mercier

Orientador(a)

RESUMO

O metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) representa uma importante via de assimilação de carbono fotossintético, caracterizado pela fixação do CO₂ atmosférico durante o período da noite, por meio da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) e pelo acúmulo noturno de ácidos orgânicos. Nesse tipo de fotossíntese, os estômatos permanecem fechados durante a maior parte do dia e, conseqüentemente, propicia uma maior eficiência no uso da água quando comparado com plantas C₃. Essa adaptação ecofisiológica permite às espécies CAM suportar alterações frequentes na disponibilidade de água no meio ambiente. *Guzmania monostachia* é uma bromélia epífita com tanque que apresenta a capacidade de alterar seu metabolismo fotossintético, passando de C₃ a CAM, em resposta a condições ambientais estressantes, constituindo-se, portanto, num interessante modelo de estudo sobre plasticidade fisiológica.

Algumas pesquisas anteriores do nosso laboratório mostraram que diferentes regiões foliares de *G. monostachia* podem desempenhar funções distintas em resposta à escassez hídrica. Foi visto que a expressão do CAM ocorreu com intensidades diferentes ao longo do comprimento foliar, sendo mais pronunciada na região apical. Um possível direcionamento da água da região basal para apical foi hipotetizado ocorrer, de forma que mesmo em situações de curta restrição hídrica (7 dias), a quantidade de água nos tecidos da porção apical permaneceu praticamente constante. Levando em consideração esses resultados prévios, a presente pesquisa teve como objetivo principal caracterizar o padrão de expressão do CAM nas folhas de diferentes estágios ontogenéticos (folhas jovens, intermediárias e maduras), bem como em suas porções, relacionando com as possíveis variações no estado hídrico durante a imposição da restrição no fornecimento de água por um período de até oito dias. E investigar se as

variações do potencial hídrico foliar seriam decorrentes de alterações no acúmulo de ácidos orgânicos e/ou açúcares solúveis nas diferentes porções foliares e nas folhas em diferentes estágios do desenvolvimento. Para tanto, plantas de *G. monostachia* tiveram a rega suspensa durante oito dias e, posteriormente, elas foram reidratadas por dois dias consecutivos. As coletas foram realizadas nas seguintes condições experimentais: 1) sem suspensão de rega, ou seja, as plantas foram mantidas bem hidratadas (controle), 2) com suspensão de rega por 1, 4 e 8 dias e 3) com retorno à rega após o período de seca (2 dias de reidratação). Amostras de folhas em diferentes fases de desenvolvimento (jovens, intermediárias e adultas) foram divididas em três porções ápice, mediana e base para determinação do potencial hídrico, conteúdo relativo de água e abertura do poro estomático, além dos ensaios da atividade enzimática da PEPC, quantificação de açúcares solúveis e do acúmulo noturno de ácido málico.

Os resultados demonstraram que as regiões apical e mediana de todas as folhas pertencentes aos diferentes estágios de desenvolvimento da roseta expressaram o CAM, quando submetidas a uma situação de restrição hídrica por no mínimo quatro dias. A porção apical foi a que apresentou os parâmetros indicativos desse metabolismo de forma mais intensa. Além disso, com a imposição à seca, a transição entre o metabolismo C_3 para o CAM clássico parece ocorrer até o quarto dia de suspensão de rega, com abertura dos estômatos predominantemente no período da noite e, ao estender o período de escassez hídrica para oito dias, foi possível observar a transição para o CAM do tipo *idling*, isto é, com fechamento estomático diuturnamente.

Observou-se também, uma redução gradual do potencial hídrico ao longo do período de exposição à seca, principalmente no ápice de folhas de diferentes estágios ontogenéticos. Além disso, o ápice das folhas de todos os grupos ontogenéticos e, em especial, as folhas jovens (incluindo as porções mediana e basal) foram os que não

apresentaram redução do conteúdo hídrico durante o tratamento de seca por oito dias. Entretanto, a partição de açúcares solúveis foi alterada, de forma que a porção da basal, a qual inicialmente mantinha as maiores quantidades de carboidratos, apresentou reduções significativas no conteúdo de frutose e glicose com o prolongamento da seca para 8 dias. Já a porção apical, teve um comportamento inverso. Esses resultados sugerem que o tratamento de déficit hídrico pode desencadear um ajuste osmótico tanto nos diferentes grupos foliares da roseta quanto no limbo foliar, direcionando, preferencialmente, o transporte da água às folhas jovens e ao ápice das folhas de diferentes idades.

Com a retomada da rega, após um período de déficit hídrico de oito dias, notou-se que apenas dois dias de rega normalizada foram suficientes para que o conteúdo hídrico fosse totalmente recuperado. No entanto, a partição de açúcares solúveis entre as folhas da roseta, não apresentou um padrão semelhante ao controle (plantas bem hidratadas). O metabolismo fotossintético também não foi revertido de CAM para C_3 , sugerindo ser necessário um período maior de reabastecimento de água no tanque.

ABSTRACT

Crassulacean acid metabolism (CAM) is a photosynthetic CO₂ fixation pathway that evolved in some plants. It is characterized by the fixation of atmospheric CO₂ during the night, by the enzyme phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) and nocturnal organic acid accumulation. In a plant using CAM, the water use efficiency is maximized because the stomata remain closed during daytime and open at night when the relative humidity of the air is higher. *Guzmania monostachia*, an epiphytic bromeliad, is an interesting plant model because it presents the ability to change its photosynthetic metabolism, from C₃ to CAM, in response to stressful environmental conditions. Previously studies demonstrated that different leaf regions of *G. monostachia* performed distinct functions in response to water stress. In addition, CAM expression was more pronounced in the apical region. Even in situations of water restriction for 7 days, the amount of water in the tissues of the apical portion remained almost constant. Then, the present study hypothesized that the water may be transported from the base to the apex.

The present study aimed at characterize the CAM expression pattern in leaf blade and among different foliar groups (younger, intermediate and older leaves), relating them to variations in water status during suspension irrigation for a period of up to eight days. In addition, the present study investigated if the possible variations of the water leaf potential would be due to changes in the accumulation of organic acids and/or soluble sugars in different leaf portions at different foliar ontogenetic groups. Three experimental conditions were carried out: 1) well-watered condition (control), 2) under suspension irrigation (for 1, 4 and 8 days) and 3) rewatered treatment, after drought period (watered daily for two days). Leaf samples of different foliar groups (younger,

intermediate and older) were divided into three portions (apex, middle and base) for determination of water potential, relative water content, stomatal aperture, PEPC activity, quantification of soluble sugars and nocturnal malate accumulation.

Results indicated that apical and middle portions of all the leaves belonging to different foliar groups of the rosette expressed CAM when watering was suspended for at least four days. The apical portion displayed the most intense parameters indicative of CAM expression. In addition, with drought imposition, the transition from C_3 metabolism to classic CAM appears to occur up to the fourth day of irrigation suspension, with stomatal aperture during nighttime. When extending the period of water shortage for eight days, the establishment of a typical CAM-idling pathway, with stomatal closure during day and night, was verified

It was also observed a gradual reduction of water potential, during the period of exposure to drought, mainly at the apical of leaves of different foliar groups. At the apex of all foliar ontogenetic groups, and especially the younger leaves (including the middle and basal portions) were those that did not present reduction of water content during the drought treatment for eight days. However, the partition of soluble sugars was altered, so that the basal portion, which initially maintained the highest carbohydrate levels, showed significant reductions in the fructose and glucose content with prolongation of the drought for 8 days. The apical portion had the opposite behavior. These results suggest that drought treatment can trigger an osmotic adjustment both in the different leaf ontogenetic groups of the rosette and of the leaf blade. In this way, the water transport preferably favors the younger leaves and the apical of the different leaf developmental stages.

After a period of water deficit, the plants were rehydrated (for two days) and the water content was fully recovered. However, the partition of soluble sugars along the

rosette leaves did not present a pattern similar to that observed before of the beginning of the hydration interruption. The photosynthetic metabolism was also not reversed from the CAM to C3, suggesting that a longer tank replenishment period is necessary.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Metabolismo CAM

O metabolismo ácido das Crassuláceas (CAM), nomenclatura originada por ter sido descrito primeiramente em espécies da família Crassulaceae, representa uma das três formas principais de assimilação de carbono fotossintético em plantas superiores, juntamente com C_3 e C_4 (CUSHMAN & BOHNERT, 1999). Esta via fotossintética é considerada uma adaptação ecofisiológica que proporciona melhor eficiência no uso da água pelas plantas (LÜTTGE, 2004). O metabolismo CAM é encontrado em cerca de 7% das espécies de plantas vasculares distribuídas em 343 gêneros, dentro de 34 famílias (SUNAGAWA *et al.*, 2010). As famílias Aizoaceae, Asclepiadaceae, Asteraceae, Bromeliaceae, Cactaceae, Crassulaceae, Euphorbiaceae, Portulacaceae e Orchidaceae são as principais representantes desse grupo (FRESCHI & MERCIER, 2012).

De forma geral, a via fotossintética CAM é caracterizada pela abertura estomática durante o período da noite, no qual a fixação do CO_2 ocorre através da fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) que utiliza CO_2 para carboxilação do fosfoenolpiruvato (PEP), dando origem ao oxaloacetato (OAA), o qual é posteriormente reduzido a malato pela ação da malato-desidrogenase (MDH). Este composto orgânico é transportado para o vacúolo, juntamente com íons H^+ , causando a típica acidificação noturna das plantas CAM. Durante o período diurno, a descarboxilação do malato e refixação do CO_2 são realizadas pela ação da enzima ribulose bifosfato carboxilase/oxigenase (RUBISCO), no citosol, reduzindo assim a acidez nos tecidos da planta (HERRERA, 2009; KERBAUY *et al.*, 2012). Assim, a marcante particularidade

deste tipo de metabolismo fotossintético é a separação temporal entre a fixação de CO₂ e sua assimilação em compostos orgânicos (KERBAUY *et al.*, 2012).

Como visto, a enzima PEPC preenche uma função central na fixação de CO₂ em plantas CAM (NIMMO, 2000). Do mesmo modo, o acúmulo de ácidos orgânicos durante a noite e a abertura estomática noturna são indicadores do CAM. Contudo, além desse padrão clássico, o CAM pode operar de outros modos, conhecidos como o CAM *cycling*, apresentando o comportamento estomático semelhante ao de uma planta C₃, com abertura estomática e fixação do CO₂ diurna e o CAM *idling* quando e os estômatos permanecem fechados tanto durante o dia quanto a noite e os ácidos orgânicos são acumulados durante a noite (HERRERA, 2009; KERBAUY *et al.*, 2012). Os padrões *cycling* e *idling* são caracterizados como um CAM mais fraco e mais intenso, respectivamente e, em ambos os casos, a variação noturna de ácidos orgânicos é resultante da refixação do CO₂ proveniente da respiração celular (CUSHMAN, 2001; BORLAND *et al.*, 2011).

Essas características permitem que as taxas de transpiração sejam menores, garantindo a melhor eficiência no uso da água quando comparado com plantas que apresentam fotossíntese C₃ (HERRERA, 2009). Além disso, o metabolismo CAM possui capacidade de proteger o aparato fotossintético quando há baixa disponibilidade de água e/ou alta irradiância (LÜTTGE, 2004). Devido a esse metabolismo, espécies CAM estão amplamente distribuídas em regiões áridas, tropicais e subtropicais, incluindo epífitas nos trópicos úmidos, sendo capazes de suportar alterações frequentes na disponibilidade de água (SILVERA *et al.*, 2010).

Algumas plantas, conhecidas como C₃-CAM facultativas, apresentam capacidade de induzir ou regular o metabolismo CAM, alternando a via fotossintética entre C₃ e CAM, de acordo com as fases de seu desenvolvimento ou em resposta às

variações ambientais, destacando-se o estresse hídrico (WINTER *et al.*, 2008; DODD *et al.*, 2002). Fatores relacionados à salinidade, fotoperíodo, intensidade luminosa e à deficiência nutricional também têm sido reconhecidos importantes indutores do metabolismo CAM (CUSHMAN & BORLAND, 2002; LÜTTGE, 2004). Quando em condições ambientais favoráveis, esse grupo de plantas maximiza seu crescimento através da realização da fotossíntese C₃, demonstrando que essa plasticidade é talvez a vantagem mais óbvia das plantas C₃-CAM facultativas. Entretanto, é também uma das mais complexas respostas adaptativas aos desafios ambientais, pois implica em uma integração da regulação metabólica nos níveis celular, tecidual e de toda a planta (FRESCHI & MERCIER, 2012).

1.2. Epifitismo e a família Bromeliaceae

Epífitas crescem, por definição, sobre outras plantas, ocorrendo assim em ambientes amplamente diversificados, desde o sub-bosque das florestas até a periferia da copa das árvores. Essa variação dos locais de crescimento e dos tipos de vegetação onde as epífitas se encontram demonstra que não é possível estabelecer uma definição simples do habitat epífita (ZOTZ & HIETZ, 2001). Por se tratar de um ambiente muito dinâmico, o habitat epífita está sujeito a variações espaciais e temporais de intensidade luminosa, disponibilidade de água e de nutrientes (FRESCHI *et al.*, 2010).

Bromélias e orquídeas, em sua maioria, são plantas que apresentam hábito epífita (CAMBUÍ & MERCIER, 2006). Características morfológicas, presentes em algumas bromélias, parecem indicar adaptações evolutivas que lhe permitiram lidar com as adversidades impostas por esse ambiente (CRAYN *et al.*, 2004). Uma das adaptações é dada pela organização de suas folhas de maneira a formar um tanque com

capacidade de armazenar água e nutrientes (ZOTZ & HIETZ, 2001). Além disso, devido à presença de tricomas absorptivos, as folhas dessas bromélias são responsáveis não só pela fotossíntese, mas também pela absorção e armazenamento de água (BEZING, 2000). Com isso, a disponibilidade intermitente de água, que é um dos principais problemas enfrentados pelas plantas epífitas, é atenuada (CAMBUÍ & MERCIER, 2006).

Adaptações como a ocorrência da via fotossintética CAM é muito comum em epífitas (ZOTZ & HIETZ, 2001).

1.3. A fisiologia das folhas das bromélias

As folhas compõem a maior parte do corpo vegetativo das bromélias com tanque e, por isso, são consideradas o mais importante órgão dessas plantas. Devido a suas distintas funções, seu limbo foliar pode ser dividido em pelo menos três regiões principais: a porção basal, a qual forma o tanque e, portanto, geralmente está em contato com a água e nutrientes (BENZING, 1990) e as porções mediana e apical que estão mais expostas à luz (POPP *et al.*, 2003).

TAKAHASHI *et al.* (2007) verificaram em uma bromélia epífita com tanque, *Vriesea gigantea*, diferenças anatômicas e morfológicas entre as diferentes porções foliares. Esses pesquisadores observaram uma quantidade maior de tricomas e menor de estômatos na região basal da folha quando comparada com a região apical, sugerindo assim uma divisão funcional nas folhas dessa bromélia. Posteriormente FRESCHI *et al.* (2010) observaram esses mesmos padrões na densidade de estômatos e tricomas, em folhas de *Guzmania monostachia*, uma bromélia de tanque C₃-CAM facultativa, além de notar maior abundância de hidrênquima nos tecidos basais da folha.

Em acréscimo a essas características morfológicas, foi observado que a expressão do CAM, em resposta à seca, não ocorre de forma homogênea ao longo do limbo foliar. A maior acidez noturna e atividade das enzimas PEPC e MDH foram observadas na porção apical, indicando que esta região apresenta características morfológicas e fisiológicas mais estreitamente relacionadas à fotossíntese, enquanto a porção basal apresenta características mais relacionadas à absorção e armazenamento de água. Além disso, mesmo submetida a uma condição de escassez hídrica por sete dias, o ápice manteve seu conteúdo hídrico constante e a maior diminuição do conteúdo hídrico ocorreu na porção basal, indicando que a água presente na base parece ser transportada para região apical (FRESCHI *et al.*, 2010).

1.4. Ontogenia

Considerando a disposição das folhas das bromélias no caule, existe um gradiente ontogenético entre as folhas que formam a roseta, onde as folhas internas são mais jovens, enquanto as folhas mais maduras estão localizadas na região periférica da roseta. E, localizadas entre esses dois grupos, encontram-se as folhas de estágio intermediário. Como consequência, o microclima muda continuamente durante a vida das folhas, tanto por mudanças em sua inclinação, como por sombreamento causado pelas novas folhas produzidas (MEDINA *et al.*, 1994). Devido a isso, e às diferenças estruturais na anatomia das folhas durante o crescimento em uma planta de roseta, são esperadas respostas diferenciais a situações ambientais circundantes em folhas nos diferentes estágios ontogenéticos (ZOTZ *et al.*, 2011).

Apesar disso, poucos trabalhos, envolvendo a família Bromeliaceae, elucidam a magnitude das respostas fisiológicas entre folhas de diferentes estágios de desenvolvimento. Dentre os poucos registros encontrados, destaca-se o estudo com uma

bromélia terrestre CAM, *Ananas comosus*, onde foi observado que as folhas mais antigas apresentavam atividade menos acentuada do CAM (MEDINA *et al.*, 1994). Além disso, os autores sugeriram uma possível integração metabólica entre as folhas da roseta para ajustar o desempenho do crescimento em condições ambientais diversas. Em trabalho mais recente, sobre os impactos ontogenéticos e de seca na intensidade CAM e nos níveis de ácido abscísico (ABA) em *Guzmania monostachia*, foram observados uma diminuição mais significativa da água nas folhas mais velhas da roseta seguida pela menor atividade de CAM e um maior aumento nos níveis de ABA, enquanto que as folhas mais jovens mostraram uma resposta oposta (RODRIGUES *et al.*, 2016).

Alguns estudos voltados para outras famílias também notaram um padrão diferencial na expressão do CAM ao longo do desenvolvimento das folhas, porém de forma inversa ao observado pelos autores citados acima. Resultados obtidos por Jones (1975) relatam a captação noturna de CO₂ e aumentos noturnos na acidez titulável em folhas maduras da espécie *Bryophyllum fedtschenkoi* (Crassulaceae), uma planta CAM constitutiva. Já as folhas mais jovens dessa espécie apresentaram valores noturnos de acidez titulável menores e a captação de CO₂ durante o período diurno. Markovska e Dimitrov (2001) também observaram que folhas jovens de *Marrubium frivaldskyanun* (Lamiaceae) apresentavam menor capacidade de acumular malato, durante o período noturno, quando comparado com folhas maduras. Além disso, Hartwell (1999) ao quantificar transcritos da fosfoenolpiruvato carboxilase cinase (PEPC cinase), uma enzima que fosforila a PEPC ativando-a, notou que à medida que folhas de *Kalanchoe fedtschenkoi* (Crassulaceae) se tornavam mais desenvolvidas havia um aumento de transcritos da PEPC cinase durante o período noturno, observando um acúmulo de malato.

Além disso, a translocação de carboidratos provenientes da fotossíntese, nos órgãos das plantas CAM, como em plantas com outros mecanismos fotossintéticos, depende das relações fonte-dreno, da idade da planta e do órgão vegetativo (POPP *et al.*, 2003). As caracterizações anatômicas também evidenciaram uma variação na frequência e organização celular dos tricomas com o desenvolvimento das folhas de *G. monostachia*, de forma que, a base das folhas intermediárias e mais velhas apresentaram maior densidade e grau de especialização em estrutura de tricomas quando comparado com as folhas mais jovens (KLEINGESINDS *et al.*, dados não publicados).

Finalmente, Pantin *et al.* (2012) ressalta a importância de estudos que abordam plantas CAM, visando avaliar o impacto da ontogenia da folha nas respostas fisiológicas aos estresses abióticos, que afetam o crescimento da planta através de alterações nas relações de água e carbono.

1.5. O ajuste osmótico em epífitas CAM

Entre as características que conferem tolerância à seca, podemos destacar o ajuste osmótico das células. Este ajuste é caracterizado pelo potencial osmótico dos tecidos altamente negativo, devido ao acúmulo de solutos orgânicos e/ou inorgânicos. Em consequência, o potencial de água torna-se mais negativo, favorecendo a entrada da água e permitindo, assim, a manutenção da pressão de turgor (MARTIN *et al.*, 2004; SANCHEZ *et al.*, 2004).

Variações nas quantidades de ácidos orgânicos, açúcares solúveis e de aminoácidos tiveram uma grande relevância no ajuste osmótico sob déficit hídrico grave em folhas de *Arabidopsis thaliana* Columbia (HUMMEL *et al.*, 2010). Alguns pesquisadores também apontam para uma correlação entre a fotossíntese CAM e as diferenças de potencial osmótico, causado pelo acúmulo de ácido málico nas folhas

durante o período noturno. Luttge e Ball (1977) notaram essa mesma correlação em *Kalanchöe daigremontiana* (Crassulaceae), quando observaram uma diminuição nos potenciais hídrico e osmótico, concomitantemente, ao acúmulo noturno do malato. Já durante o período diurno, ocorreu o inverso. Herrera *et al.* (2008) também estimaram que as concentrações de malato contribuíram com 80% no valor do potencial osmótico em *Clusia minor* (Clusiaceae), a qual apresenta fotossíntese C₃-CAM facultativa.

A translocação de água entre os órgãos é um mecanismo importante para manter os índices de água foliar quase constantes, mesmo em períodos de seca. Nesse sentido, (ZOTZ & HIETZ, 2001) sugerem a necessidade de se ampliar os estudos em epífitas usando uma abordagem mais integrada em que se analise a planta como um todo e não somente folhas isoladas.

1.6. Hipóteses

Em estudos anteriores do grupo, foi comprovada a ocorrência de diferentes graus do CAM nas distintas porções foliares e sugeriu-se que o movimento da água segue da base para o ápice foliar em *G. monostachia* em deficiência hídrica. Esses experimentos anteriores nos deram uma boa base para a compreensão das diferentes funções desempenhadas por pelas distintas regiões ao longo do limbo foliar, contudo a caracterização da expressão do CAM durante o decorrer do período de restrição hídrica e o direcionamento do transporte de água em folhas de diferentes estágios de desenvolvimento ainda não haviam sido investigados até o momento.

Portanto, no presente estudo, aprofundaram-se os conhecimentos a respeito do possível transporte diferencial da água entre as folhas de diferentes fases ontogenéticas. Outro ponto que mereceu especial destaque foi a tentativa de correlacionar se as

possíveis variações do potencial hídrico seriam decorrentes de alterações no potencial osmótico das folhas.

Algumas questões importantes envolvendo a ontogenia dessa planta surgiram, motivando este estudo: será que as folhas mais jovens receberiam, preferencialmente, água proveniente das folhas mais maduras? Será que o menor valor de potencial hídrico encontrado, seria decorrente do ajuste osmótico das células? O CAM poderia ocorrer em diferentes padrões e intensidades ao longo do período de escassez hídrica em folhas em diferentes estágios de desenvolvimento? Isso correlacionaria com a capacidade do tecido de direcionar o transporte d'água? A partir de que tempo de imposição da suspensão de rega o CAM mais forte (*idling*) se expressaria?

Algumas hipóteses deste trabalho foram, portanto:

As folhas mais jovens receberiam água preferencialmente das folhas mais antigas da roseta, sendo o potencial hídrico dessas mais negativo em decorrência de ajuste osmótico.

As folhas mais jovens apresentariam a maior expressão do CAM, uma vez que o conteúdo de água seria estável nessas folhas, durante o tratamento de seca. Num período mais prolongado de escassez hídrica, o padrão CAM *idling* seria atingido após a expressão do tipo CAM clássico.

As folhas intermediárias apresentariam os valores de potencial hídrico mais elevado, uma vez que teriam menor redução do conteúdo de água do que as folhas maduras e acumulariam menor quantidade de solutos do que as folhas jovens.

As folhas intermediárias apresentariam o declínio de seu conteúdo hídrico ao serem submetidas a um período mais prolongado de seca, quando comparada com as folhas maduras.

As folhas maduras teriam as maiores reduções no conteúdo de água já que remobilizariam a água presente em seus tecidos para as folhas mais jovens. Neste caso, possíveis reduções do potencial da água nas folhas maduras expressariam seu estado hídrico.

As folhas maduras expressariam o CAM de forma menos intensa uma vez que o conteúdo hídrico de seus tecidos seria reduzido significativamente. A expressão do metabolismo CAM nas folhas intermediárias ocorreria de forma mais e menos intensa do que as folhas maduras e jovens, respectivamente.

2. CONCLUSÕES

A transição para o metabolismo CAM em *Guzmania monostachia* ocorreu de forma gradual até alcançar o tipo *idling*. A quantificação do ácido málico acumulado durante a noite, aliado às medidas de abertura do poro estomático, sugerem que, sob déficit hídrico de quatro dias, as folhas jovens e intermediárias alteram seu metabolismo fotossintético de C_3 para o modo clássico de CAM, enquanto as folhas maduras parecem transitar para um padrão mais próximo ao CAM *cycling*. Já sob influência de um período mais prolongado de déficit hídrico (8 dias), o CAM passa a ser do tipo *idling*, nas folhas de todos os grupos ontogenéticos da roseta, mantendo os estômatos fechados diuturnamente.

Sob restrição hídrica, apesar dessa bromélia mostrar aumentos da atividade da PEPC e maior acúmulo noturno de ácido málico nas porções apical e mediana dos grupos foliares pertencentes a diferentes estágios de desenvolvimento, esses parâmetros de CAM foram mais pronunciados na região apical das folhas intermediárias, indicando que essa porção apresenta maior capacidade de expressar o CAM. Dois dias de reidratação foram insuficientes para que *G. monostachia* revertisse a fotossíntese CAM para a C_3 . No entanto, nesse curto período o conteúdo de água foi restabelecido em todas as regiões foliares de todos os grupos ontogenéticos da roseta.

Foi observada uma tendência na redução do potencial hídrico durante a noite, sendo esse declínio revertido no início do dia. Na maioria dos casos, os valores mais negativos de potencial hídrico foram obtidos no final do período escuro, coincidindo com o momento em que houve um maior acúmulo de ácido málico nos vacúolos. Desse modo, esse ácido orgânico parece ser responsável pelas oscilações diurnas no

potencial hídrico de *G. monostachia*, sugerindo uma função osmorreguladora, além de seu importante papel no armazenamento de carbono atmosférico durante o período da noite em plantas CAM.

Com relação à movimentação de água entre as folhas de diferentes estágios ontogenéticos, o potencial hídrico declinou durante todo período de suspensão de rega, atingindo valores mais negativos nas porções apicais, após oito dias de déficit hídrico. Nesse mesmo período, as porções mediana e basal das folhas intermediárias e maduras, perderam quantidades significativa de água, enquanto que a manutenção do conteúdo hídrico foi observado nas folhas jovens, no limbo todo (ápice, mediana e base) e na porção apical de todas as folhas pertencentes aos diferentes estágios ontogenéticos. As folhas e as porções foliares que mantiveram seu conteúdo de água estável apresentaram a manutenção e/ou o aumento na quantidade glicose e frutose, indicando um possível ajuste osmótico. Assim, este conjunto de resultados sugere que os açúcares solúveis possam ter um papel de osmorregulação em *G. monostachia*, dirigindo, em parte, o transporte de água tanto para o ápice foliar quanto para as folhas jovens da roseta.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUBRY, S.; BROWN, N. J.; HIBBERD J. M. (2011) The role of proteins in C3 plants prior to their recruitment into the C4 pathway. *J Exp Bot*, **62**: 3049–3059.
- BARRS, H. D.; WEATHERLEY, P. E. (1962) A reexamination of relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Australian Journal of Biological Sciences*, **15**: 413.
- BENZING, D. H. (1990) *Vascular Epiphytes: General Biology and Related Biota*. Cambridge, Cambridge University Press, 1990.
- BORLAND, A.M.; ZAMBRANO, V.A.B.; CEUSTERS, J.; SHORROCK, K. (2011) The photosynthetic plasticity of crassulacean acid metabolism: an evolutionary innovation for sustainable productivity in a changing world. *New Phytologist*, **191** (3): 619-633.
- CAMBUÍ, C.A.; MERCIER, H. (2006) Organic nitrogen nutrition in plants. *Plant Biology*, **7**: 13-17.
- CARVALHO, V.; ABREU, M. E.; MERCIER, H.; NIEVOLA, C. C. (2017) Adjustments in CAM and enzymatic scavenging of H₂O₂ in juvenile plants of the epiphytic bromeliad *Guzmania monostachia* as affected by drought and rewatering. *Plant Physiology and Biochemistry* **11**: 32-39.
- CEUSTERS, J.; BORLAND, A. M.; LONDERS, E.; VERDOODT, V.; GODTS, C.; DE PROFT, M. P. (2009) Differential usage of storage carbohydrates in the CAM bromeliad *Aechmea* ‘Maya’ during acclimation to drought and recovery from dehydration. *Physiologia Plantarum* **135**: 174-184.

- CHEN, M.; TANG, Y.; ZHANG, J.; YANG, M.; XU, Y. (2010) RNA Interference-based Suppression of Phosphoenolpyruvate Carboxylase Results in Susceptibility of Rapeseed to Osmotic Stress. *Journal of Integrative Plant Biology* **52** (6): 585–592.
- COUSINS, A. B.; BAROLI, I.; BADGER, M. R.; IVAKOV, A.; LEA, P. J.; LEEGOOD, R. C.; VON CAEMMERER, S. (2007) The role of phosphoenolpyruvate carboxylase during C₄ photosynthetic isotope exchange and stomatal conductance. *Plant Physiology* **145**: 1006–1017.
- CRAYN, D. M.; WINTER, K.; SMITH, J. A. C. (2004) Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habitat in the Neotropical family Bromeliaceae. *Pnas*, **110** (10): 3703–3708.
- CUSHMAN, J. C. (2001) Crassulacean acid metabolism: A plastic photosynthetic adaptation to arid environments. *Plant Physiology*, **127** (4): 1439–1448.
- CUSHMAN, J. C.; BORLAND, A.M. (2002) Induction of crassulacean acid metabolism by water limitation. *Plant, Cell and Environment*, **25**: 295–310.
- CUSHMAN, J. C.; HANS, J.; BOHNERT, H. J. (1999) Crassulacean acid metabolism: molecular genetics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **50**: 305–332.
- DODD, A.N.; BORLAND, A.M.; HASLAM, R.P.; GRIFFITHS, H.; MAXWELL, K. (2002) Crassulacean acid metabolism: plastic, fantastic. *Journal of experimental Botany*, **53** (369): 569–580.
- FRESCHI, L.; MERCIER, H. (2012) Connecting environmental stimuli and crassulacean acid metabolism expression: phytohormones and other signaling molecules. In: Lüttge, U; Beyschlag, W; Büdel, B; Francis, D. (Org.). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag GmbH, *Progress in Botany*, **73**: 231–255.

- FRESCHI, L.; TAKAHASHI, C.A.; CAMBUÍ, C.A.; SEMPREBOM, T.R.; CRUZ, A.B.; MIOTO, P.T.; VERSIEUX, L.M.; CALVENTE, A.; LATANSIO-AIDAR, S.R.; AIDAR, M.P.M.; MERCIER, H. (2010) Specific leaf areas of the tank bromeliad *Guzmania monostachia* perform distinct functions in response to water shortage. *Journal of Plant Physiology*, **167** (7): 526-533.
- GOMES, F. P. *A análise moderna na pesquisa agropecuária*. Ed. POTAFOS, 1984.
- HARTWELL, J.; GILL, A.; NIMMO, G. A.; WILKINS M. B.; JENKINS, G. I.; NIMMO, H. G. (1999) Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase is a novel protein kinase regulated at the level of expression. *The plant journal*, **20** (3): 333-342.
- HERRERA, A. (2009) Crassulacean acid metabolism and fitness under water deficit stress: if not for carbon gain, what is facultative CAM good for? *Annals of Botany*, **103**: 645- 653.
- HERRERA, A.; BALLESTRINI, C.; TEZARA, W. (2008) Nocturnal sap flow in the C₃-CAM species, *Clusia minor*. *Trees* **22**: 491–497.
- HUMMEL, I.; PANTIN, F.; SULPICE, R.; PIQUES, M.; ROLLAND, G.; DAUZAT, M.; CHRISTOPHE, A.; PERVENT, M.; BOUTEILLÉ, M.; STITT, M.; GIBON, Y.; MÜLLER, B. (2010) Arabidopsis plants acclimate to water deficit at low cost through changes of carbon usage: an integrated perspective using growth, metabolite, enzyme, and gene expression analysis. *Plant Physiology* **154**: 357-372.
- JONES, M. B. (1975) The Effect of Leaf Age on Leaf Resistance and CO₂ Exchange of the CAM Plant *Bryophyllum fedtschenkoi*. *Planta*, **123**: 645-653.

- KERBAUY, G.B.; TAKAHASHI, C.A.; LOPEZ, A.M.; MATSUMURA, A.T.; HAMASHI, L.; FELIX, L.M.; PEREIRA, P.N.; FRESCHI, L.; MERCIER, H. (2012) Crassulacean acid metabolism in epiphytic orchids: current knowledge, future perspectives. In: Mohammad Najafpour (org.). Rijeka. *Photosynthesis*, **2(4)**: 81-104.
- KNUDSON, L. (1946) A new nutrient solution for orchid seed. Amer. *Orch. Soc. Bull.*, **15**: 214-217.
- LÜTTGE, U. (2004) Ecophysiology of crassulacean acid metabolism (CAM). *Annals of Botany*, **93**: 629-652.
- LÜTTGE, U.; BALL, E. (1977) Water relation parameters of the CAM plant *Kalanchöe daigremontiana* in relation to diurnal malate oscillations. *Oecologia*, **31**: 85-94.
- LUTTGE, U.; NOBEL, P. S. (1984) Day-night variations in malate concentration, osmotic pressure, and hydrostatic pressure in *Cereus validus*. *Plant Physiology* **75**: 804–807.
- MALES, J. (2016) Think tank: water relations of Bromeliaceae in their evolutionary context. *Botanical Journal of the Linnean Society* **181**: 415-440.
- MARKOVSKA, Y. K.; DIMITROV, D. S. (2001) The effect of leaf age on gas exchange and malate accumulation in C₃-CAM plant *Marrubium frivaldszkyanum* (Lamiaceae). *Photosynthetica*, **39**: 191–195.
- MARTIN, C. E. (1994) Physiological ecology of the Bromeliaceae *Botanical Review* **60**: 1- 82.
- MARTIN, C. E.; LIN, T. C.; LIN, K. C.; HSU, C. C.; CHIOU, W. L. (2004) Causes and consequences of high osmotic potentials in epiphytic higher plants. *Journal of Plant Physiology* **161**: 1119–1124.

- MAXWELL, C.; GRIFFITHS, H.; BORLAND, A. M.; BROADMEADOW, M. S. J.; MCDAVID, C. R. (1992) Photoinhibitory responses of the epiphytic bromeliad *Guzmania monostachia* during the dry season in Trinidad maintain photochemical integrity under adverse conditions. *Plant, Cell Environ.* **15**: 37-47.
- MEDINA, E. M.; DELGADO, J. H.; TROUGHTON, J.; MEDINA, D. (1977) Physiological ecology of CO₂ fixation in Bromeliaceae. *Flora* **166**: 137-152.
- MEDINA, E.; ZIEGLER, H.; LÜTTGE, U.; TRIMBORN, P.; FRANCISCO, M. (1994) Light conditions during growth as revealed by $\delta^{13}\text{C}$ values of leaves of primitive cultivars of *Ananas comosus*, an obligate CAM species. *Func. Ecol.* **8**: 298-305.
- MIOTO, P. T.; MERCIER, H. (2013) Absciscic acid and nitric oxide signaling in two different portions of detached leaves of *Guzmania monostachia* with CAM up-regulated by drought. *Journal of Plant Physiology*, **170**: 996-1002.
- MIOTO, P. T.; RODRIGUES, M. A.; MATIZ, A.; MERCIER, H. (2015) CAM-like traits in C₃ plants: biochemistry and stomatal behavior. In: Lüttge, U.; Beyschlag, W. (Eds.) *Progress in Botany* **76**: 195-209.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, **15**: 473-479.
- NIEVOLA C.C.; KRAUS, J.E.; FRESCHI, L.; SOUZA, B.M.; MERCIER, H. (2005) Temperature determines the occurrence of CAM or C₃ photosynthesis in pineapple plantlets grown in vitro. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, **41**: 832-837.
- NIMMO, H. G. (2000) The regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in CAM plants. *Trends in plant Science*, **5**(2): 75-80.

- O'LEARY, B.; PARK, J.; PLAXTON, W. C. (2011) The remarkable diversity of plant PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase): recent insights into the physiological functions and post-translational controls of non-photosynthetic PEPCs. *Biochem J* **436**:15–34.
- PANTIN, F.; RENAUD, J.; BARBIER, F.; VAVASSEUR, A.; THIEC, D. L.; ROSE, C.; BARIAC, T.; CASSON, S.; MCLACHLAN, D. H.; HETHERINGTON, A. M.; MULLER, B.; SIMONNEAU, T. *et al.* (2013) Developmental priming of stomatal sensitivity to abscisic acid by leaf microclimate. *Curr. Biol.* **23**: 1805-1811.
- PANTIN, F.; SIMONNEAU, T.; MULLER, B. (2012) Coming of leaf age: control of growth by hydraulics and metabolics during leaf ontogeny. *New Phytol.* **196**: 349-366.
- PEREIRA, P. N. (2012) **Divisão espacial da atividade das enzimas PEPC e NR e sua regulação por citocininas em folhas de *Guzmania monostachia* induzidas ao CAM.**
- PEREIRA, P. N.; PURGATTO, E.; MERCIER, H. (2013) Spatial division of phosphoenolpyruvate carboxylase and nitrate reductase activity and its regulation by cytokinins in CAM-induced leaves of *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae). *Journal of Plant Physiology* **170**: 1067-1074.
- PIKART, F. C (2014) ***Heterogeneidade fotossintética em folhas de *Guzmania monostachia* (L.) Rusby ex Mez (Bromeliaceae).***
- POPP, M.; JANETT, H.P.; LÜTTGE, U.; MEDINA, E. (2003) Metabolite gradients and carbohydrate translocation in rosette leaves of CAM and C3 bromeliads. *New Phytol.* **157**: 649-656.

- RODRIGUES, M. A.; HAMACHI, L.; MIOTO, P. T.; PURGATTO, E.; MERCIER, H. (2016) Implications of leaf ontogeny on drought-induced gradients of CAM expression and ABA levels in rosettes of the epiphytic tank bromeliad *Guzmania monostachia*. ***Plant Physiol. Biochem.* 108:** 400-411.
- SANCHEZ, F. J.; ANDRÉS, E. F.; TENORIO, J. L.; AYERBE, L. (2004) Growth of epicotyls, turgor maintenance and osmotic adjustment in pea plants (*Pisum sativum* L.) subjected to water stress. ***Field Crops Research* 86:** 81–90.
- SCHMIDT, J. E; KAISER, W. M. (1987) Response of the Succulent Leaves of *Peperomia magnoliaefolia* to Dehydration: Water Relations and Solute Movement in Chlorenchyma and Hydrenchyma. ***Plant Physiol.* 83:** 190-194
- SILVEIRA, K.; SANTIAGO, L.S.; WINTER, K. (2010) The incidence of crassulacean acid metabolism in the Orchidaceae derived from carbon isotope ratios: a checklist o the flora of Panama and Costa Rica. ***Botanical Journal of the Linnean Societ*, 163:** 194-222.
- SMITH, J. A. C.; LUTTGE, U. (1985) Day-night changes in leaf water relations associated with the rhythm of crassulacean acid metabolism in *Kalancho daigremontian*. ***Planta* 163:** 272-282.
- SMITH, J. A. C.; GRIFFITHS, H.; BASSETT, M.; GRIFFITHS, N. M. (1985) Day-night changes in the leaf water relations of epiphytic bromeliads in the rain forests of Trinidad. ***Oecologia* 67:** 475-485.
- SMITH, J. A. C.; GRIFFITHS, H.; LÜTTGE, U. (1986) Comparative ecophysiology of CAM and C3 bromeliads. I. The ecology of the Bromeliaceae in Trinidad. ***Plant, Cell and Environment* 9:** 359-376
- SMITH, J. A. C.; SCHULTE, P. J.; NOBEL, P. S. (1987) Water flow and water storage in *Agave deserti*: osmotic implications of crassulacean acid metabolism. ***Plant, Cell and Environment* 10:** 639–648.

- SUNAGAWA, H.; CUSHMAN, J.; AGARIE, S. (2010) Crassulacean acid metabolism may alleviate production of reactive oxygen species in a facultative CAM plant, the common ice plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. ***Plant Production Science* 13**: 256-260.
- TAKAHASI, C.A.; CECCANTINI, G.C.T.; MERCIER, H. (2007) Differential capacity of nitrogen assimilation between apical and basal leaf portions of a tank epiphytic bromeliad. ***Braz. J.Plant Physiol.* 19**: 119-126.
- WINTER, K.; GARCIA, M.; HOLTUM, J.A.M. (2008) On the nature of facultative and constitutive CAM: environmental and developmental control of CAM expression during early growth of *Clusia*, *Kalanchoë* and *Opuntia*. ***Journal of Experimental Botany*, 59**: 1829–1840.
- ZOTZ, G. ; ANDRADE, J. L. (1998) Water relations of two co-occurring epiphytic bromeliads. ***Journal of Plant Physiology* 152**: 545–554.
- ZOTZ G.; HIETZ P. (2001) The physiological ecology of vascular epiphytes: current knowledge, open questions. ***Journal of Experimental Botany*, 52**: 2067-2078.
- ZOTZ, G.; WILHELM, K.; BECKER, A. (2011) Heteroblasty—A Review. ***Bot. Rev.* 77**: 109–151.