Paula Natália Pereira

Influência das fontes de N e do déficit hídrico sobre a expressão de aquaporinas e/ou transporte de ácidos orgânicos em plantas CAM

Influence of N sources and water deficit on aquaporin expression and/or organic acids transport in CAM plants

São Paulo,

Paula Natália Pereira

Influência das fontes de N e do déficit hídrico sobre a expressão de aquaporinas e/ou transporte de ácidos orgânicos em plantas CAM

Influence of N sources and water deficit on aquaporin expression and/or organic acids transport in CAM plants

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

Orientadora: Profa. Dra. Helenice Mercier

Co-orientadora: Profa. Dra. Marília Gaspar

Versão corrigida da tese de doutorado. A versão original encontra-se na biblioteca da USP (BDTD)

São Paulo,

2016

Ficha Catalográfica

Pereira, Paula Natália.

Influência das fontes de N e do déficit hídrico sobre a expressão de aquaporinas e/ou transporte de ácidos orgânicos em plantas CAM.

Número de páginas: p.141

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

1. Aquaporinas 2. Metabolismo ácido crassuláceo 3. Fontes de nitrogênio 4. Transporte de prótons.

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr (a).	Prof(a). Dr(a).	
Prof(a). Dr (a).	Prof(a). Dr(a).	
	Profa. Dra. Helenice Mercier (Orientadora)	

"Prezado Professor,

Sou sobrevivente de um campo de concentração.

Meus olhos viram o que nenhum homem deveria ver. Câmaras de gás construídas por engenheiros formados. Crianças envenenadas por médicos diplomados. Recém-nascidos mortos por enfermeiras treinadas. Mulheres e bebês fuzilados e queimados por graduados de colégios e universidades. Assim, tenho minhas suspeitas sobre a Educação. Meu pedido é: ajude seus alunos a tornarem-se humanos. Seus esforços nunca deverão produzir monstros treinados ou psicopatas hábeis. Ler, escrever e saber aritmética só são importantes para fazer nossas crianças mais humanas."

(Texto encontrado após a 2ª guerra mundial, em um campo de concentração nazista).

Ao Danny, pela paciência, ajuda, companheirismo e amor em todos os momentos.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos...

À minha mãe Sonia, ao meu pai José Valter "in memória" e aos meus irmãos Flávia e Milton, pelo amor incondicional, por acreditarem em mim e no meu trabalho, pela paciência e por me darem o suporte para que eu me tornasse a pessoa que sou hoje.

Ao Danny pelo amor, amizade, paciência, ajuda, companheirismo, por ter se mudado para o Brasil e estar ao meu lado nos momentos mais importantes e difíceis dessa jornada e por além de namorado, ser também um excepcional amigo e confidente na vida.

À Profa. Dra. Helenice Mercier pela orientação, conselhos, amizade, oportunidades oferecidas, pela confiança em meu trabalho ao longo desses 7 anos e pelo exemplo de inteligência, competência e paciência. Levarei comigo lições de otimismo e confiança em meu potencial por toda a vida.

À Profa. Dra. Marília Gaspar pela oportunidade em tê-la como co-orientadora nesse trabalho, pela paciência em me ensinar, pelos conselhos, por não me permitir desistir em nenhum momento, pela confiança no meu trabalho e por me servir de exemplo de profissional competente, dedicada, ética e inteligente. Obrigada pelas conversas agradáveis e construtivas e por diversas caronas.

Ao Prof. Dr. Andrew Smith por me receber em seu laboratório na Universidade de Oxford, pela ajuda prática e teórica, ensinamentos, incentivos e palavras que me permitiram crescer como pesquisadora e por ser um exemplo de amor à ciência.

Ao Prof. Dr. Eduardo Purgatto pela ajuda em diversas análises durante a realização desta pesquisa e pelas palavras incentivadoras em todos os momentos.

Aos Profs. Dr. Gilberto Barbante Kerbauy e Dr. Luciano Freschi pelos ensinamentos teóricos e práticos.

À Profa. Maria Magdalena Rossi pelos ensinamentos teóricos e práticos e por disponibilizar o uso de alguns equipamentos para a concretização desse trabalho.

Ao doutorando Ricardo, pela ajuda em inúmeros momentos durante esse doutorado, pela amizade, risadas, "masterchefs" realizados e conversas que tornaram o ambiente de trabalho mais agradável e divertido.

Aos colegas e amigos do laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal do IB-USP pelos ensinamentos compartilhados e discussões de cunho científico.

Aos técnicos do laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal do IB-USP pela disponibilidade em ajudar e pelo apoio em diversos momentos deste projeto.

À Dra. Tatiana Caroline Silveira Corrêa, do GaTE Lab, por disponibilizar o uso de alguns equipamentos, pela ajuda e conselhos valiosos que me permitiram evoluir no desenvolvimento dessa tese.

Aos amigos do laboratório na Universidade de Oxford, Pedro, Costas, Juan, Maria, Úrsula, Izargi, Will, Emily e Jack pela ótima recepção, conselhos, ensinamentos compartilhados, risadas e pela amizade preservada até hoje.

Aos secretários do Departamento de Botânica, Norberto, Carlos e Danilo, pelo atendimento e ajuda com as dúvidas acadêmicas.

A todos os funcionários do IBUSP que permitiram, direta ou indiretamente, a realização desta pesquisa.

A todos aqueles aqui não mencionados, mas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

À Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de nível superior (CAPES) pelo apoio financeiro ao meu doutorado e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro ao projeto temático.

ÍNDICE GERAL

	Introdução Geral	1
1.	O metabolismo ácido das crassuláceas	1
2.	Transporte de prótons no interior do vacúolo	3
3.	Nutrição e indução ao CAM	4
4.	Aquaporinas e CAM	5
	Objetivos gerais	7
1	Objetivos específicos de cada capítulo	
2	Estratégias de estudo	9
	Referências Bibliográficas	10
	Capítulo 1	15
	Abstract	15
	Abbreviations	
	Introduction	17
	Material and Methods	19
	Results	23
	Discussion	28
	Acknowledgments	33
	References	33
	Supplementary Material	39
	Capítulo 2	41
	Abstract	41
	Abbreviations	42
	Introduction	43
	Material and Methods	45
	Results	49
	Discussion	59
	Acknowledgments	63
	References	63
	Supplementary Material	68

Capítulo 372	
Abstract72	
Abbreviations73	
Introduction74	
Material and Methods76	
Results84	
Discussion92	
Acknowledgments97	
References97	
Supplementary Material	
Capítulo 4107	
Abstract	
Introduction	
Material and Methods112	
Results	
Discussion123	
Acknowledgments	
References129	
Supplementary Material135	
Principais conclusões136	
Resumo138	
Abstract140	

Introdução Geral

1. O Metabolismo Ácido das Crassuláceas (CAM)

O metabolismo CAM é expresso em aproximadamente 300 gêneros de 24 famílias (Ceusters *et al.*, 2011), sendo encontrado em aproximadamente 50% a 60% das espécies epífitas das famílias Bromeliaceae e Orchidaceae (Larcher, 2006; Silvera & Lasso, 2016). Esse metabolismo auxilia na adaptação dos vegetais a ambientes áridos, já que, comparado ao ciclo de Calvin (C₃), diminui a transpiração em relação à capacidade de assimilação do CO₂ (Kerbauy *et al.*, 2012).

Apesar da vantagem na eficiência do uso da água, plantas CAM apresentam algumas desvantagens. O gasto energético necessário para cada molécula de CO₂ assimilada geralmente é mais elevado em plantas CAM, quando comparado às plantas C₃ (Winter & Smith, 1996). Com relação à fotorrespiração, inicialmente achava-se que as plantas CAM não tinham esse processo. Contudo, recentemente foi descoberto que o efeito da concentração do CO₂ poderia ser contrabalançado pela alta concentração do O₂ produzido pelo ciclo de Calvin no final do período claro (Lüttge, 2011).

O CAM caracteriza-se pelo acúmulo noturno de ácidos orgânicos no vacúolo (Winter & Smith 1996; Lüttge, 2006). O principal ácido acumulado na maioria das espécies CAM é o ácido málico (Lüttge, 2006; Borland *et al.*, 2011). Contudo, em um trabalho realizado com *Tillandsia pohliana*, foi verificado o acúmulo noturno, principalmente, de citrato (Freschi *et al.*, 2010a). O acúmulo desse ácido orgânico é potencialmente mais eficiente do que o de malato, uma vez que a descarboxilação de um mol de citrato produz três moles de CO₂, enquanto a descarboxilação do malato produz apenas um mol de CO₂, por mol de piruvato formado. Dessa forma, o aumento no conteúdo de citrato pode funcionar como um mecanismo suplementar para minimizar a fotorrespiração e a fotoinibição nas plantas CAM

expostas às condições ambientais desfavoráveis (Lüttge, 1988, 2006; Franco *et al.*, 1992, Freschi *et al.*, 2010a).

Muitas plantas podem apresentar ambos os tipos de metabolismo fotossintético (C₃ ou CAM), alternando-os conforme variações nas condições ambientais (Sleslak *et al.*, 2003). A transição entre os tipos de assimilação de CO₂ pode ser induzida por déficit hídrico, aumento no fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (FFFA) que atinge as folhas (Maxwell *et al.* 1994; Haslam *et al.*, 2003; Sleslak *et al.*, 2003) ou por variações periódicas de temperatura (Nievola *et al.*, 2005). A mudança para o CAM pode acontecer independentemente entre diferentes regiões da planta. Por exemplo, folhas opostas de um mesmo nó de *Clusia rosea* (Clusiaceae) foram submetidas a diferentes condições de umidade relativa do ar, constatandose que o CAM foi induzido apenas nas folhas expostas ao ar seco (Schmitt *et al.*, 1998).

Um promissor modelo de estudo para esse tipo de transição metabólica é a espécie *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae), uma bromélia epífita que pode alternar, em diferentes condições ambientais, entre os metabolismos C₃ e CAM (Freschi *et al.*, 2010b; Pereira *et al.*, 2013). Resultados recentes obtidos em nosso laboratório mostraram diferenças significativas quanto à acidez noturna, atividade da fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) e da enzima malato desidrogenase (MDH) nas porções basal, mediana e apical das folhas de *Guzmania monostachia*. As maiores atividades das enzimas PEPC e MDH e de acidez foram observadas na porção apical, seguida da porção mediana das folhas dessa espécie quando submetidas ao déficit hídrico (Freschi *et al.*, 2010b). Esses dados indicaram que, provavelmente, a porção foliar apical dessa bromélia mantida sob deficiência hídrica apresentou maior expressão do CAM, quando comparada com a mesma porção foliar das plantas hidratadas. Por outro lado, a porção basal das plantas mantidas sob déficit hídrico ou hidratadas mostrou atividade fotossintética mais próxima da via C₃, caracterizada pelo pouco acúmulo noturno de ácidos orgânicos e pela reduzida atividade das enzimas PEPC e MDH.

2) Transporte de prótons e acúmulo de ácidos orgânicos no interior do vacúolo

Plantas CAM são caracterizadas pelo acúmulo noturno de ácidos orgânicos, principalmente malato, no interior do vacúolo (Cushman & Borland, 2002). A força prótonmotriz para que ocorra o transporte de ácidos orgânicos no interior do vacúolo pode ser gerada por duas enzimas no tonoplasto, ATPase (ATP) e/ou pirofosfatase inorgânica (PPi) que bombeiam prótons (H⁺) para o interior do vacúolo (Marin, 1987; Rea & Sanders, 1987). O potencial elétrico negativo no citosol e a diferença de pH transmembrana gerado pelo bombeamento de H⁺ no vacúolo tendem a promover o transporte de ânions, como malato, citrato e fumarato, ocasionando o acúmulo de ácidos orgânicos no interior do vacúolo, característico de plantas que realizam a fotossíntese CAM (White & Smith, 1989; Cheffings *et al.*, 1997).

Estudos realizados com plantas de Kalanchoë daigremontiana (Crassulaceae), uma espécie CAM constitutiva, mostraram as maiores taxas de transporte de prótons através do tonoplasto na presença de malato (White & Smith, 1989). Nesse mesmo estudo, foi verificado que não havia uma preferência no transporte de H⁺ pelo ATP ou PPi. Apesar de muitos estudos verificarem o transporte de prótons dependente de ATP ou PPi em espécies de Kalanchoë, apenas um trabalho mostrou o transporte de açucares e prótons em Ananas comosus (McRae et al., 2002) e nenhum trabalho tem mostrado o transporte de ácidos orgânicos e prótons em bromélias. Será que assim como observado em Kalanchoë, bromélias CAM não apresentariam uma preferência por ATP ou PPi (Capítulo 1)? Será que o transporte de prótons no vacúolo estaria associado com o maior acúmulo de malato e consequentemente a maior expressão do CAM (Capítulo 1)? Em trabalho um desenvolvido com plantas de Mesembryanthemum crystallinum foi observado um aumento de três vezes nas taxas de transporte de prótons dependente de ATP quando as plantas foram submetidas ao estresse salino (induzidas ao CAM), comparado com as plantas C₃ (Lüttge *et al.*, 2000). O transporte de H⁺ dependente de ATP também foi verificado em plantas de *Nicotiana tabacum* (Solanaceae), uma espécie C₃, cultivadas sob diferentes fontes de nitrogênio inorgânico (NH₄⁺ ou NO₃⁻). Maiores taxas de transporte de prótons e malato no interior do vacúolo e na presença de ATP foram verificadas nas plantas mantidas na presença de nitrato comparado àquelas cultivadas em amônio (Lüttge *et al.*, 2000).

Apesar de inúmeros trabalhos na literatura descreverem os transportes de prótons e ácidos orgânicos no interior do vacúolo em plantas CAM e C₃, nenhum trabalho demonstrou ainda a influência de diferentes fontes de nitrogênio no transporte de H⁺ e ácidos orgânicos através do tonoplasto em plantas CAM constitutivas e facultativas. Será que o transporte de prótons no vacúolo e a expressão de transportadores vacuolar de malato e fumarato (ALMT9) seria influenciada por diferentes fontes inorgânicas de nitrogênio e pela concentração dessas fontes(Capítulos 2 e 3)? Como seria o transporte de prótons e ácidos orgânicos no vacúolo e a preferência por ATP ou PPi em plantas CAM constitutivas e facultativas das famílias Bromeliaceae e Crassulaceae (Capítulos 2 e 3)?

3) Nutrição e indução ao CAM

Apesar de muitos trabalhos terem mostrado a indução do CAM por diferentes condições ambientais como, disponibilidade de água, intensidade luminosa e fotoperíodo (Maxwell *et al.*, 1994; Nievola *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2013), poucos estudos têm mostrado a influência da deficiência nutricional na expressão desse metabolismo fotossintético (Ota 1988; Winter &Holtum, 2011; Rodrigues *et al.*, 2014). Winter & Holtum (2011) verificaram que o fornecimento de nutrientes afeta o balanço entre as vias fotossíntéticas C₃ e CAM em *Calandrinia polyandra* (Montiaceae). Quando mantida sob reduzida disponibilidade de água ou nutrientes, foi observada a mudança na fixação diurna do

CO₂ para a fixação noturna nessa herbácea. A reversão da fotossíntese CAM para C₃ foi possível após a reidratação ou adição de solução nutritiva no solo dessa espécie (Winter & Holtum, 2011).

Ota (1988) verificou que plantas de *Kalanchoe blossfeldiana* (Crassulaceae) mantidas em solução nutritiva com presença de nitrato (1 mM) apresentaram um aumento no conteúdo de malato e no acúmulo noturno de acidez, quando comparadas com plantas mantidas em solução com presença de amônio (1 mM). Esses resultados sugerem que a ausência do nitrato tem maior influência na indução ao CAM nessa espécie do que a ausência de amônio. Será que outras espécies CAM constitutivas dessa família teriam esse metabolismo fotossintético influenciado por diferentes concentrações dessas fontes inorgânicas de nitrogênio (**Capítulo 2**)?

Embora alguns trabalhos tenham estudado a correlação entre CAM e nutrição, apenas um estudo conduzido em folhas destacadas da bromélia epífita com tanque, *Guzmania monostachia*, mostrou a influência da deficiência de cada macronutriente (N, P ou K) na indução do CAM (Rodrigues *et al.*, 2014). Nesse estudo foi verificado que a ausência de nitrogênio promoveu um aumento de duas vezes na atividade das enzimas PEPC e MDH na porção apical das folhas de *Guzmania monostachia* comparado à ausência de P ou K (Rodrigues *et al.*, 2014). Em relação aos estudos mais recentes realizados com a bromélia epífita *G. monostachia*, ainda não se sabe como as fontes de nitrogênio regulam a expressão do CAM. A regulação desse metabolismo em *G. monostachia* seria bioquímica e molecular (Capítulo 3)?

4) Aquaporinas e CAM

As aquaporinas (AQPs) são proteínas responsáveis pelo transporte de água, pequenos solutos e gases através das membranas (Maurel, 2007). Elas pertencem à família das

proteínas intrínsecas de membrana (MIPs) e se subdividem em cinco subfamílias, denominadas PIPs (Plasma membrane Intrinsic Proteins), TIPs (Tonoplast Intrinsic Proteins), NIPs (Nodulin26-like Intrinsic Proteins), SIPs (Small basic Intrinsic Proteins) e XIPs (X Intrinsic Proteins) (Johanson *et al.*, 2001; Danielson & Johanson, 2008).

Variações de condutividade hidráulica em raízes (Lpr) têm sido associadas às alterações de expressão de genes de aquaporinas nesse órgão. Variações diuturnas de condutividade são acompanhadas por variações no nível de transcritos de aquaporinas do tipo PIP em raízes de milho e ervilha (Lopez *et al.*, 2003, Beaudette *et al.*, 2007). Nessas espécies, a expressão de aquaporinas se mostrou dependente do tipo de raiz (primária ou secundária) (Beaudette *et al.*, 2007) e do estágio de desenvolvimento das mesmas, sendo observado em geral um aumento de expressão na zona de alongamento celular e nas regiões mais maduras da raiz primária (Hachez *et al.*, 2006).

Também em folhas, a expressão de diferentes aquaporinas obedece a um padrão de regulação temporal e espacial. Enquanto algumas isoformas são expressas nas folhas jovens em expansão, outras são expressas preferencialmente em folhas completamente expandidas, sendo que as aquaporinas expressas nas folhas maduras estão provavelmente envolvidas em processos fisiológicos como o carregamento do floema, perda de água do xilema, abertura e fechamento estomático, transporte de CO₂ na fotossíntese e movimento foliar (Heinen *et al.*, 2009).Na leguminosa *Samanea saman* (Mimosaceae), o acúmulo de transcritos do gene *Ss*AQP2 (PIP) no pulvino foi maior no início da fase iluminada, coincidente com o aumento na permeabilidade da água em células motoras (Moshelion *et al.*, 2002).

Em *Mesembryanthemum crystallinum*, mudanças na permeabilidade à água de protoplastos isolados de folhas e raízes durante o ciclo diuturno coincidiram com flutuações na abundância de transcritos de três PIPs: *Mc*PIP1;4, *Mc*PIP1;5 e *Mc*PIP2;1 e uma TIP: *Mc*TIP1;2 em plantas CAM adultas (Vera-Estrella *et al.* 2012). No entanto, variações

similares não foram observadas em plantas C₃ jovens. De forma interessante, oscilações diuturnas na atividade de PEPC, no acúmulo de pinitol e na osmolaridade da seiva foram observadas somente nas plantas CAM sendo que esses parâmetros permaneceram inalterados nas plantas C₃. Essas mudanças, em períodos distintos do ciclo CAM, ressaltam a necessidade do controle do potencial osmótico em compartimentos celulares específicos concomitante com a regulação metabólica e do fluxo de água na planta. (Vera-Estrella *et al.*, 2012). De forma similar, não foram verificadas variações evidentes nos níveis de transcritos de *VgPIP1,5* e *VgTIP2* em função do regime luminoso, no ápice e na base das folhas de *Vriesea gigantea*, uma bromélia com metabolismo C₃. A ausência de um padrão nítido de expressão dia/noite sugere que esses genes sejam expressos de forma quase contínua, principalmente nas bases foliares, maximizando a absorção de nutrientes, cuja disponibilidade é imprevisível e sujeita à rápida degradação e/ou utilização por outros organismos habitantes do tanque (Cambuí, 2009).

Recentemente foi feito o transcriptoma da bromélia epífita com tanque, *G. monostachia*, que abriu uma ampla gama de possibilidades para o estudo da regulação gênica nessa espécie (dados não publicados). Nesse sentido, será que os genes que codificam aquaporinas nessa espécie seriam regulados pelo horário do dia (início e final do dia) (**Capítulo 4**)? Será que haveria uma regulação desses genes pelo horário do dia, estresse hídrico e fontes inorgânicas de nitrogênio nas porções basal, mediana e apical das folhas de *G. monostachia* que expressam diferentes graus de intensidade do CAM (**Capítulo 4**)?

Objetivos Gerais

Investigar o transporte de prótons e ácidos orgânicos e acúmulo noturno de malato e citrato no interior do vacúolo nas folhas de alguns representantes CAM das famílias

Bromeliaceae e Crassulaceae submetidos a diferentes fontes inorgânicas de nitrogênio associadas ou não ao déficit hídrico.

Avaliar a expressão de genes que codificam aquaporinas nas porções basal e apical de folhas de *Guzmania monostachia* submetidas a diferentes fontes de nitrogênio associadas ou não ao déficit hídrico.

1. Objetivos específicos de cada capítulo

Capítulo 1:

Investigar o transporte de prótons e ânions, como malato, fumarato e citrato, dependente de ATP ou PPi no interior do vacúolo e o acúmulo noturno de malato e citrato em seis espécies de bromélias CAM constitutivas e uma C₃.

Capítulo 2:

Determinar o acúmulo noturno de ácidos orgânicos, malato, fumarato e citrato e o transporte de H⁺ e ânions, malato, citrato e fumarato, no interior do vacúolo dependente de ATP ou PPi em duas espécies de *Kalanchoë*, *Kalanchoë tubiflora* e *Kalanchoë laxiflora*, mantidas sob diferentes fontes de nitrogênio inorgânico (NH₄⁺ e/ou NO₃⁻) e diferentes concentrações dessas fontes (2.5 ou 5.0 mM).

Capítulo 3:

Investigar a influência da presença e/ou ausência de fontes inorgânicas de nitrogênio (NH₄⁺ e/ou NO₃⁻) associada ou não à deficiência hídrica (PEG 6000 30%), sobre a expressão do CAM, transporte de prótons e ânions no interior do vacúolo, expressão do gene ALMT9 que codifica o transportador de malato dependente de alumínio 9, atividade das principais enzimas antioxidantes (catalase, ascorbato peroxidase, superóxido

dismutase e glutationa redutase) e quantificação de ácucares solúveis, glicose, frutose e sacarose, na porção apical das folhas pertencentes ao 8-12º nós de *Guzmania* monostachia.

Capítulo 4:

Verificar a expressão de alguns genes que codificam aquaporinas (PIPs, TIPs, NIPs e SIPs) nas porções basal, mediana e apical de folhas pertencentes ao 8-12º nós de *Guzmania monostachia* mantidas sob diferentes fontes de nitrogênio (NH₄⁺ ou NO₃⁻) associadas ou não à deficiência hídrica (PEG 6000 30%).

2. Estratégias de estudo

- 1) Avaliar o transporte de prótons dependente de ATP ou PPi e o acúmulo noturno de malato e citrato em folhas de bromélias classificadas como CAM constitutivas, CAM facultativas ou C₃ e em folhas de duas espécies CAM constitutivas de *Kalanchoë*.
- 2) Analisar o grau de expressão do CAM por meio de ensaio da atividade das enzimas PEPC e MDH e da dosagem da variação de acidez (acúmulo noturno de ácido málico e cítrico) na porção apical de folhas de *G. monostachia* após o tratamento de deficiências nutricionais (NH₄⁺ e/ou NO₃⁻) associadas ou não à deficiência hídrica por sete dias.
- 3) Determinar a atividade das enzimas antioxidantes e o acúmulo de açucares solúveis na porção apical de folhas de *Guzmania monostachia* submetidas à deficiência de diferentes fontes de nitrogênio inorgânico (NH₄⁺ e/ou NO₃⁻) associada ou não à deficiência hídrica por sete dias.
- 4) Analisar os níveis de transcritos do ALMT9 na porção apical das folhas de G. monostachia após o tratamento de deficiências nutricionais (NH_4^+ e/ou NO_3^-) associadas ou não à deficiência hídrica por sete dias.

5) Analisar os níveis de transcritos de AQPs (PIP, TIP, NIP e SIP) nas diferentes porções foliares (basal e apical) de *G. monostachia* após o tratamento com diferentes fontes de nitrogênio (NH₄⁺ ou NO₃⁻) associadas ou não à deficiência hídrica por sete dias.

Referências bibliográficas

- BEAUDETTE PC, CHLUP M, YEE J, EMERY RJN (2007) Relationships of root conductivity and aquaporin gene expression in *Pisum sativum*: diurnal patterns and the response to HgCl2 and ABA. *Journal of Experimental Botany* **58**:1291-1300.
- BORLAND AM, ZAMBRANO VAB, 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 CA (2009) Absorção e assimilação de uréia pela bromélia epífita com tanque *Vriesea gigantea*.
- CEUSTERS J, BORLAND AM, GODTS C, LONDERS E, CROONENBORGHS S, VAN GOETHEM D, PROFT MP (2011) Crassulacean acid metabolism under severe light limitation: a matter of plasticity in the shadows? *Journal of Experimental Botany* **62**(1): 283-291.
- CHEFFINGS AM, PANTOJA O, ASHCROFT FM, SMITH JAC (1997) Malate transport and vacuolar ion channels in CAM plants. Journal of Experimental Botany **48**: 623-631.
- CUSHMAN JC, BORLAND AM, (2002) Induction of crassulacean acid metabolism by water limitation. *Plant, Cell & Environment* **25**: 295–310.
- DANIELSON JAH, JOHANSON U (2008) Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biology* **8**:45.

- FRANCO AC, BALL E, LÜTTGE U (1992) Differential effects of drought and light levels on accumulation of citric and malic acids during CAM in *Clusia*. *Plant, Cell & Environment* **15**: 821-829.
- FRESCHI L, RODRIGUES MA, TINÉ MAS, MERCIER H (2010a) Correlation between citric acid and nitrate metabolisms during CAM cycle in the atmospheric bromeliad *Tillandsia pohliana*. *Journal of Plant Physiology* **167**: 1577-1583.
- FRESCHI L, TAKAHASHI CA, CAMBUÍ CA, SEMPREBOM TR, CRUZ AB, MIOTO PT, VERSIEUX LM, CALVENTE A, LATANSIO-AIDAR SR, AIDAR MPM, MERCIER H (2010b) Specific leaf areas of the tank bromeliad *Guzmania monostachia* perform distinct functions in response to water shortage. *Journal of Plant Physiology* **167**:526-533.
- HASLAM R, BORLAND A, MAXWELL K, GRIFFITHS H (2003) Physiological responses of the CAM epiphyte *Tillandsia usneoides* L. (Bromeliaceae) to variations in light and water supply. *Journal of Plant Physiology* **160**: 627–634.
- HACHEZ C, MOSHELION M, ZELAZNY E, CAVEZ D, CHAUMONT F (2006) Localization and quantification of plasma membrane aquaporin expression in maize primary root: a clue to understanding their role as cellular plumbers. Plant Molecular Biology **62**: 305-323.
- HEINEN RB, YE Q, CHAUMONT F (2009) Role of aquaporins in leaf physiology. *Journal of Experimental Botany* **60**:2971-2985.
- JOHANSON U, KARLSSON M, JOHANSSON I, GUSTAVSSON S, SJOVALL S, FRAYSSE L, WEIG AR, KJELLBOM P (2001) The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiology* **126**:1358-1369.
- KERBAUY GB, TAKAHASHI CA, LOPEZ AM MATSUMURA, AT, HAMASHI L, FELIX LM, PEREIRA PN, 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.

LARCHER W (2006) Ecofisiologia Vegetal. Ed. Rima.

- LOPEZ F, BOUSSER A, SISSOEFF I, GASPAR M, LACHAISE B, HOARAU J, MAHE A (2003) Diurnal regulation of water transport and aquaporin gene expression in maize roots: contribution of PIP2 proteins. *Plant and Cell Physiology* **44**:1384-1395.
- LÜTTGE U (1988) Day-night changes of citric acid levels in Crassulacean acid metabolism: phenomenon and ecophysiological significance. *Plant, Cell & Environment* **11**: 445- 451.
- LÜTTGE U, PFEIFER T, FISCHER-SCHLIEBS E, RATAJCZAK R (2000) The role of vacuolar malate-transport capacity in crassulacean acid metabolism and nitrate nutrition. Higher malate-transport capacity in the Ice plant after crassulacean acid metabolism-Induction and in Tobacco under nitrate nutrition. *Plant Physiology* **124**: 1335-1347.
- LÜTTGE U (2006) Photosynthetic flexibility and ecophysiological plasticity: questions and lessons from *Clusia*, the only CAM tree, in the neotropics. *New Phytologist* **171**: 7-25.
- LÜTTGE U (2011) Photorespiration in Phase III of Crassulacean Acid Metabolism: Evolutionary and Ecophysiological Implications. *Progress in Botany* **72**: 371-384.
- MARIN B (ed.) (1987) Plant vacuoles: their importance in solute compartmentation in cells and their applications in plant biotechnology. *Plenum Press*, New York.
- MAUREL C (2007) Plant aquaporins: novel function and regulation properties. *FEBS Letters* **581**: 2227–2236.
- MAXWELL C, GRIFFITHS H, YOUNG AJ (1994) Photosynthetic acclimation to light regime and water stress by the C,-CAM epiphyte *Guzmania monostachia*: gas-exchange characteristics, photochemical efficiency and the xanthophyll cycle. *Functional Ecology* **8**: 746-754.

- McRAE SR, Christopher JT, Smith JAC, Holtum JAM (2002) Sucrose transport across the vacuolar membrane of *Ananas comosus*. *Functional Plant Biology* **29**, 717-724.
- MOSHELION M, BECKER D, BIELA A, UEHLEIN N, HEDRICH R, OTTO B, LEVI H, MORAN N, KALDENHOFF R (2002) Plasma membrane aquaporins in the motor cells of *Samanea saman*: diurnal and circadian regulation. *Plant Cell* **14**(3): 727-739.
- NIEVOLA CC, KRAUS JE, FRESCHI L, SOUZA BM, MERCIER H (2005) Temperature determines the occurrence of CAM or C₃ photosynthesis in pineapple plantlets grown *in vitro*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant* **41**: 832-387.
- OTA K (1988) CAM photosynthesis under drought conditions in *Kalanchoe blossfeldiana* grown with nitrate or ammonium as the sole nitrogen source. *Plant and Cell Physiology* **29**(5): 801-806.
- PEREIRA PN, 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.
- REA PA, SANDERS D (1987) Tonoplast energization: two H⁺ pumps, one membrane. *Physiologia Plantarum* **71**: 131-141.
- RODRIGUES MA, FRESCHI L, PEREIRA PN, MERCIER H (2014) Interactions between nutrients and crassulacean acid metabolism. *Progress in Botany* **75**: 167-186.
- SCHMITT AK, LEE HSJ, LÜTTGE U (1998) Response of the C₃-CAM tree *Clusia rosea* to light and water stress. *Journal of Experimental Botany* **39**: 1581-1590.
- SILVERA K, LASSO E (2016) Ecophysiology and Crassulacean Acid Metabolism of Tropical Epiphytes. *Tree Phisiology* **9**: 25-43.
- SLESLAK I, KARPINSKA B, SURÓWKA E, MISZALSKI Z, KARPINSKI S (2003) Redox changes in the chloroplast and hydrogen peroxide are essential for regulation of C₃-

- CAM transition and photooxidative stress responses in the facultative CAM plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant and Cell Physiology* **44**: 573-581.
- VERA-ESTRELLA R, BARKLA BJ, AMEZCUA-ROMERO JC, PANTOJA O (2012) Day/night regulation of aquaporins during the CAM cycle in *Mesembryanthemum* crystallinum. Plant, Cell & Environment 35: 485-501.
- WHITE PJ, SMITH JAC (1989) Proton and anion transport at the tonoplast in crassulacean-acid-metabolism plants: specificity of the malate-influx system in *Kalanchoë daigremontiana*. *Planta* **179**: 265-174.
- WINTER K, SMITH JAC (1996) Crassulacean acid metabolism: current status and perspectives. In Winter K, Smith JAC, ads. Crassulacean acid metabolism: biochemistry, ecophysiology and evolution. Berlin: *Springer* Verlag 389-426.
- WINTER K, HOLTUM JA (2011) Induction and reversal of crassulacean acid metabolism in *Calandrinia polyandra*: effects of soil moisture and nutrients. *Functional Plant Biology* **38**: 576-582.

Principais conclusões

As principais conclusões obtidas desse trabalho são descritas individualmente para cada capítulo apresentado.

No **capítulo 1**, entre as 6 espécies de bromélias CAM utilizadas nesse estudo, *Billbergia pyramidalis* apresentou as maiores taxas de transporte de prótons dependente de ATP ou PPi e maior acúmulo noturno de malato, enquanto *Tillandsia usneoides* exibiu as menores taxas de transporte de prótons e acúmulo de malato durante a noite. Todas bromélias mostraram uma preferência pela ATPase, em vez da PPiase, como força próton-motriz para o transporte de ácidos orgânicos no interior do vacúolo. A permeabilidade do tonoplasto na presença de ATP, para todas as bromélias CAM testadas foi fumarato > malato > citrato.

No **capítulo 2**, plantas de *Kalanchoë laxiflora* e *Kalanchoë tubiflora* cultivadas com 2.5 mM de nitrato apresentaram maiores taxas de transporte de prótons dependente de ATP ou PPi e maior acúmulo noturno de ácidos orgânicos no interior do vacúolo. Por outro lado, plantas de ambas as espécies mantidas em 5.0 mM de amônio exibiram os menores valores de transporte de prótons e acúmulo de ácidos orgânicos durante a noite. Ao comparar as duas espécies, os parâmetros descritos acima foram maiores nas plantas de *K. tubiflora* do que nas plantas de *K. laxiflora*. De modo geral, os resultados apresentados nesse capítulo sugerem que *K. tubiflora* apresenta um CAM mais forte comparado com *K. laxiflora* e as fontes inorgânicas de nitrogênio (NH₄⁺ ou NO₃⁻), bem como suas concentrações, influenciam no grau de expressão do CAM nessas duas espécies de *Kalanchoë*.

No **capítulo 3**, os dados claramente mostram que a presença isolada de amônio (5.0 mM) associada ao déficit hídrico (PEG 6000 30%) favorece a maior expressão do CAM na porção apical das folhas de *Guzmania monostachia*, quando comparado com a presença isolada de nitrato (5.0 mM). Foi observado também o maior acúmulo de açucares solúveis (glicose, frutose e sacarose) e atividade das principais enzimas antioxidantes (SOD, CAT,

APX e GR) na porção apical das folhas dessa bromélia mantidas na presença de amônio. O transporte de prótons e ácidos orgânicos dependentes de ATP, bem como a expressão do gene ALMT9, que codifica o transportador de malato ativado por alumínio, foram aumentados na presença de amônio como única fonte isolada de nitrogênio. Esses resultados sugerem que o amônio melhorara a capacidade de limitar o dano oxidativo, bem como favorece o transporte de ácidos orgânicos no interior do vacúolo na porção apical das folhas de *G monostachia*.

No **capítulo 4**, nossos resultados sugerem que os 11 genes que codificam aquaporinas escolhidos nesse estudo são diferencialmente regulados pelo ciclo dia/noite e fontes de nitrogênio e são muito responsivos aos déficit hídrico, contribuindo para manter o balanço hídrico em folhas de *G. monostachia*. A presença de NH₄⁺ parece favorecer a indução dos genes que codificam PIP1;2 e PIP1;5 nas porções basal e mediana no final do dia. O aumento na expressão desses genes na base, poderia auxiliar no transporte de água para o ápice, associado com a repressão desses genes na porção apical, evitando a perda de água, poderia resultar em uma maior disponibilidade de água e CO₂ para a enzima PEPC que exibiu maior atividade na porção apical das folhas, como destacado no **capítulo 3**.

Resumo

Historicamente, o metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) tem sido bem estudado em espécies das famílias Bromeliaceae e, principalmente, Crassulaceae. Essa via fotossintética é caracterizada pelo acúmulo noturno de ácidos orgânicos dentro do vacúolo e pela fixação de CO₂ durante a noite pela enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC). No entanto, pouco se sabe sobre a preferência pela atividade da enzima ATPase ou PPiase no transporte de prótons e ácidos orgânicos no interior das vesículas do tonoplasto em espécies CAM. A fotossíntese CAM pode ser induzida em plantas caracterizadas como CAM-facultativas por diversos fatores ambientais, por exemplo, déficit hídrico, termoperíodo, salinidade e deficiência de nutrientes. Contudo, pouco tem sido discutido sobre a influência dos nutrientes na indução do CAM. Esse estudo investigou o transporte de prótons através da membrana do tonoplasto em seis espécies de bromélias CAM e duas espécies de Kalanchoë. Todas as espécies usadas nesse estudo mostrou uma preferência pela ATPase do que pela PPiase para o transporte de prótons e ácidos orgânicos no interior das vesículas do tonoplasto. Nós também observamos uma maior expressão do CAM nas plantas de Kalanchoë laxiflora e Kalanchoë tubiflora mantidas na presença de 2.5 mM de NO₃. Por outro lado, Guzmania monostachia, uma espécie de bromélia epífita, exibiu a maior intensidade do CAM nas folhas mantidas na presença de NH₄⁺ + déficit hídrico. Nessa espécie de bromélia, a maior expressão do gene ALMT9 na porção apical das folhas, seguido pelas maiores taxas de transporte de prótons pela ATPase, acúmulo de acucares solúveis e a ativação das defesas antioxidantes parecem estar relacionados com o aumento da tolerância pelo ajuste osmótico e limitação do dano oxidativo nas folhas mantidas na presença de NH₄⁺ + déficit hídrico. Uma outra explicação para a maior intensidade do CAM no ápice das folhas mantidas em NH₄⁺ + déficit hídrico poderia ser a maior expressão dos genes que codificam aquaporinas nas regiões basal e mediana das folhas na presença dessa fonte de N, principalmente PIPs e TIPs, que talvez sejam

responsáveis pelo transporte de água das porções basal e mediana para a porção apical das folhas. O maior conteúdo de água conservado na porção apical poderia ajudar a aumentar a intensidade da fotossíntese CAM nessa porção das folhas de G. monostachia mantidas na presença de NH_4^+ + déficit hídrico.

Palavras-chave: Aquaporinas; Metabolismo ácido crassuláceo; Fontes de nitrogênio; Transporte de prótons.

Abstract

Historically, crassulacean acid metabolism (CAM) has been studied in many families, mainly Bromeliaceae and Crassulaceae. This photosynthetic pathway is characterized by the nocturnal organic acid accumulation in the vacuole as well as CO₂ fixation during the night by the phosphoenolpyruvate carboxylase enzyme (PEPC). However, little is known about the preference of ATPase or PPiase activities for the proton and organic acids transport in tonoplast vesicles in CAM species. CAM photosynthesis can be inducted in CAM-facultative species by environmental factors such as, water deficit, thermoperiod, salinity and nutrients deficiency. Although, little has been discussed about the influence of nutrients on CAM induction. This study investigated proton transport in CAM bromeliad species and two CAM Kalanchoë species. All of the species used in this study showed a preference for ATPase rather than PPiase for the proton and organic acids transport into the tonoplast vesicles. We also observed a higher CAM expression in Kalanchoë laxiflora and Kalanchoë tubiflora plants kept in the presence of 2.5 mM of NO₃. On the other hand, Guzmania monostachia plants, an epiphytic tank bromeliad species, exhibited the highest CAM intensity in the leaves kept in the presence of NH₄⁺ + water deficit. In this same bromeliad, a malate transporter gene, ALMT9, showed its highest expression in the apical portion of the leaves and the highest proton transport rates into the vacuole by ATPase. Soluble sugars and antioxidant enzymes activities were also verified in this study in order to observe their influence on increasing the drought tolerance of G.monostachia. In the leaves kept in NH_4^+ + water deficit the highest antioxidant activities and accumulation of soluble sugars were observed, this suggests that this inorganic nitrogen source seems to increase the drought tolerance by osmotic adjustment and limitation of oxidative damage. These factors can favor the increase of CAM intensity in the leaves kept under NH₄⁺ + water deficiency. Another explanation for why the highest CAM intensity was observed in the apical portion of the leaves kept in NH₄⁺

+ water deficiency is because of the higher expression of aquaporin genes in the basal and

middle regions of the leaves in the presence of this N source, mainly PIP and TIP, which

might be responsible for transporting water from the basal and middle portions to the apical

portion where these AQP genes are repressed. The fact that the highest water content is

conserved in the apical portion might help to explain the increase in the intensity of CAM

photosynthesis observed in the leaves of G. monostachia kept in the presence of NH₄⁺ +

water deficit.

Keywords: Aquaporins; Crassulacean acid Metabolism; Nitrogen sources; Proton transport.

20