Alejandra Matiz López

**Utilização da uréia por folhas de *Vriesea gigantea*
(Bromeliaceae) submetidas ao déficit hídrico, muito mais
do que uma fonte de nitrogênio**

**Utilization of urea by leaves of *Vriesea gigantea*
(Bromeliaceae) under water shortage, much more than a
nitrogen source**

São Paulo

2012

Alejandra Matiz López

**Utilização da uréia por folhas de *Vriesea gigantea*
(Bromeliaceae) submetidas ao déficit hídrico, muito mais
do que uma fonte de nitrogênio**

**Utilization of urea by leaves of *Vriesea gigantea*
(Bromeliaceae) under water shortage, much more than a
nitrogen source**

Tese 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): Prof^a. Dr^a. Helenice Mercier

São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Matiz, López Alejandra

Utilização da uréia por folhas de *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae) submetidas ao déficit hídrico, muito mais do que uma fonte de nitrogênio.

Número de páginas: 90

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

1. Urease 2. Metabolismo ácido das crassulaceas
3. Bromeliaceae 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)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, aos meus irmãos
e amigos que apesar da distância
sempre me incentivaram e apoiaram

Dedico

EPÍGRAFE

"La sabiduría nos llega cuando ya no nos sirve de nada."

Gabriel García Márquez

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof^a. Dr^a. Helenice Mercier, primeiro por aceitar ser minha orientadora, mesmo sabendo que o desafio ia ser maior devido a todas as implicações decorrentes de acolher um aluno estrangeiro e segundo pelo apoio incondicional e a liberdade em me deixar propor experimentos ao longo do trabalho. Obrigada por ser um exemplo de dedicação à pesquisa.

Ao Prof. Dr. Luciano Freschi pelas breves e à Auri pelas longas conversas, foram de grande importância para mim, a ambos agradeço pela amizade e a disposição em me ajudar sempre que precisei.

À Cássia pela amizade e pelos incríveis conselhos no desenho experimental e na bancada, por estar sempre disposta a me ensinar os segredos e as manhas da Vriesea. Agradeço pelo exemplo de competência, profissionalismo e amor à pesquisa.

Ao Prof.Dr. Gilberto B. Kerbauy por tentar sempre manter a ordem no laboratório, pelos conselhos e ajuda ao longo do trabalho.

Ao Prof. Dr Marcos Pereira Marinho Aidar pela colaboração com as trocas gasosas e as valiosas discussões sobre o metabolismo fotossintético. Sua ajuda foi de grande importância para aperfeiçoar o desenho experimental deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Eduardo Purgatto da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, por me ajudar com as análises de ácidos orgânicos.

À Prof^a. Dr^a Silvia Machado do Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP- Botucatu) pela colaboração e orientação na parte da microscopia eletrônica de transmissão e pela disposição em me ajudar ao longo deste trabalho.

Aos meus colegas e amigos, Ilton, Alininha, Nielda, Aline B, Leo, Lia, Lucas, Paula, Rafael, Bruno, Michel, Bruna e Carol pelas horas de descontração e risada, por dividir a bancada e suas experiências comigo.

Aos técnicos Max, Ana Maria, Rita, William e Cinthia por manter organizado o laboratório e pela disponibilidade em me ajudar sempre.

Aos meus amigos na Colômbia, Julián, Johannita, Camila, Vero, Juan, Karol, Ana Maria, Julián M, Gerardo, Juan Pablo, Fabio, Leo, Sara, Laura e Giovanny, agradeço enormemente o incentivo e motivação.

Ao Perdigão por sempre ter alguma coisa engraçada para dizer no "momento correto" e pelos bons momentos de convivência em casa.

Ao Paulinho, agradeço pelas valiosíssimas discussões teóricas, pela ajuda incondicional dentro e fora do laboratório, e sobretudo por me fazer sentir "em casa". Obrigada por todo o amor e carinho. Agradeço também a teus pais e a tua irmã pelo bom recebimento e carinho.

E principalmente agradeço aos meus pais e irmãos que sempre me incentivaram e me apoiaram em me propor desafios. Obrigada pela paciência, carinho e amor, por me dar forças nos momentos difíceis e comemorar junto comigo minhas vitórias e alegrias, mesmo à distância.

À FAPESP pela ajuda financeira, muito necessária para o desenvolvimento deste trabalho.

ÍNDICE

I. Introdução	1
I.1. <i>Vriesea gigantea</i> e a fisiologia das folhas das bromélias.....	1
I.2. Déficit hídrico e indução ao CAM.....	2
I.3. Uréia como fonte orgânica de N	6
I.4. Urease e assimilação da uréia	8
 II. Objetivos	 11
II.1. Objetivos específicos	11
 III. Material e métodos	 13
III.1. Material vegetal	13
III.2. Condição de déficit hídrico	13
III.3. Teor relativo de água (TRA)	14
III.4. Métodos de análise para determinar o estado fotossintético da folha	15
III.5. Quantificação da atividade <i>in vivo</i> da urease	17
III.6. Quantificação de uréia e amônio endógeno	18
III.7. Obtenção da razão entre massa seca e massa fresca das amostras	20
III.8. Detecção citoquímica do CO ₂	21
III. 9. Análises estatísticas	22
 IV. Resultados	 23
IV.1. Caracterização do metabolismo fotossintético em folhas de <i>Vriesea gigantea</i> quando submetidas ao PEG (déficit hídrico).....	23
IV.2. Determinação do teor relativo de água (TRA) nas diferentes porções da folha submetidas ao PEG (déficit hídrico)	23
IV.3. Caracterização do metabolismo fotossintético em folhas isoladas de <i>V.gigantea</i>	24
IV.4. Determinação da atividade endógena da urease (sem fornecer uréia) e dosagens de uréia e amônio nas diferentes porções foliares de <i>V.gigantea</i>	29
IV.5. Caracterização da atividade da urease durante a fase clara e fase escura	

(fornecendo uréia) e dosagem de uréia e amônio nas diferentes porções foliares de <i>V. gigantea</i> submetidas ao PEG (déficit hídrico).....	35
IV.6. Detecção citoquímica do CO ₂	53
V. Discussão	57
VI. Conclusões	74
VII. Resumo	76
VIII. Abstract	78
IX. Anexo	79
X. Referências bibliográficas	81

I. INTRODUÇÃO

I.1. *Vriesea gigantea* e a fisiologia das folhas das bromélias

Vriesea gigantea Gaudichaud é uma espécie endêmica da região sudeste do Brasil e de ocorrência exclusiva da floresta Atlântica (SAMPAIO *et al.*, 2012). É considerada uma bromélia epífita com tanque tipo III, segundo a classificação dos tipos ecológicos de formas de vida feita por PITTENDRIGH (1948). Esse tipo de bromélia caracteriza-se principalmente pela formação de uma estrutura constituída pelo imbricamento das folhas, denominada de tanque ou cisterna, que permite o acúmulo de água e material orgânico que caem sobre a planta. Desta maneira, é possível a absorção de nutrientes através dos tricomas presentes nas bases foliares, os quais ficam em contato com a solução ali acumulada (TOMLINSON, 1969; BENZING *et al.*, 1976; BENZING, 2000; TAKAHASHI *et al.*, 2007).

As bromélias de hábito terrestre absorvem os nutrientes do solo, tendo suas raízes bem desenvolvidas; ao contrário das bromélias de hábito epífito, cujas raízes são muito reduzidas e utilizadas principalmente para a fixação à planta hospedeira (BENZING & RENFROW, 1974). Dessa forma, em bromélias adultas com tanque, a folha que é o seu principal órgão vegetativo (BENZING, 2000) passou a executar quase totalmente tanto as funções de absorção de água quanto de assimilação de nutrientes. Além disso, as bromélias com tanque atuam como um núcleo de suporte para organismos: como anfíbios, outras plantas vasculares, invertebrados e microorganismos (BENZING, 2000; ROMERO *et al.*, 2006, 2008, 2010). Os anfíbios que vivem ou freqüentam o tanque liberam nele seus excretas (ROMERO *et al.*, 2010), os quais constituem um importante recurso de nitrogênio orgânico (uréia) para essas plantas (BENZING, 1990; LOPEZ *et al.*, 1999).

Adicionalmente, foi proposta a existência de diferenças funcionais, anatômicas e fisiológicas ao longo da folha de bromélias. Foi visto para o abacaxizeiro (*Ananas comosus*), um gradiente na concentração de nitrogênio ao longo da folha, sendo menor na parte basal do que na parte apical (MEDINA *et al.*, 1994). Além disso, estudos feitos por POPP *et al.* (2003) demonstraram a existência de um gradiente de concentração de ácidos orgânicos que aumentou da

base para o ápice da folha das espécies *Bromelia humilis*, *Aechmea fendler*, *Tillandsia flexuosa* e *Ananas comosus*, havendo, nesta última espécie também um gradiente de acúmulo de carboidratos. Igualmente foi constatado que os tricomas (estruturas importantes para a absorção de nutrientes) do ápice foliar são pouco numerosos, comparativamente, àqueles da base (SAKAI & SANDFORD, 1980).

Essa distribuição de tricomas também foi encontrada em *Vriesea gigantea*, em um estudo feito no nosso laboratório por TAKAHASHI *et al.* (2007). Nessa mesma pesquisa, constataram-se que as enzimas de assimilação de nitrogênio - sintetase da glutamina (GS) e desidrogenase do glutamato dependente de NADH (GDH) - apresentaram atividades significativamente maiores nos ápices foliares. Mais recentemente, foram comparadas também as atividades da nitrato redutase (NR) e da urease nas duas porções da folha, mostrando uma maior atividade de ambas na base (TAKAHASHI & MERCIER, 2011). Há ainda evidências de que a porção apical das folhas da bromélia-tanque *Vriesea sanguinolenta* é a principal região responsável pela atividade fotossintética, quando comparada com a base foliar (ZOTZ *et al.*, 2002). Adicionalmente, outra bromélia-tanque, *Guzmania monostachia* também apresentou diferenças metabólicas ao longo da folha quando submetida ao déficit hídrico, exibindo um gradiente de indução ao CAM (FRESCHI *et al.*, 2010).

Os trabalhos anteriormente mencionados confirmam que as bromélias-tanque apresentam nitidamente uma divisão espacial de funções dentro de uma mesma folha, isto é facilmente compreendido, uma vez que as folhas dessas bromélias desempenham funções tanto de nutrição e absorção quanto de fotossíntese: sendo que a base estaria associada principalmente à absorção de nutrientes e água, enquanto o ápice assumiria o papel fotossintético e de assimilação de nitrogênio.

1.2. Déficit hídrico e indução ao CAM

Dentre as inúmeras respostas fisiológicas ao estresse hídrico que protegem contra a desidratação inclui-se o fechamento estomático, o qual reduz, sensivelmente, a evaporação (TAIZ & ZEIGER, 2009).

O fechamento estomático pode ser desencadeado por um decréscimo no conteúdo de água da folha e /ou raízes. Quando o mesofilo torna-se moderadamente desidratado, parte do ácido abscísico (ABA) armazenado nos cloroplastos é liberado para o apoplasto do mesofilo, de onde é transportado para as células-guarda, induzindo o rápido fechamento dos estômatos (HARTUNG *et al.*, 1998).

Embora o transporte de fotossintatos e outros compostos através do floema possa ser prejudicado indiretamente com a perda de turgor das células devido ao estresse hídrico, experimentos têm mostrado que a translocação não é afetada quando as plantas são submetidas a um déficit moderado (SUNG & KRIEG, 1979). A capacidade de continuar translocando assimilados é um fator muito importante na resistência vegetal à falta de água.

Em um déficit hídrico moderado, a fotossíntese e a condutância estomática são afetadas. Durante esse processo, a desidratação das células inibe a fotossíntese, o metabolismo da planta é prejudicado e a eficiência do uso da água decresce (CHERNYAD'EV, 2005). Ou seja, à medida que os estômatos se fecham evitando a perda de água por transpiração, a disponibilidade de CO₂ diminui e, conseqüentemente, afeta a fotossíntese.

Estudos feitos em plantas mesofíticas C₃ sob déficit hídrico, onde o conteúdo hídrico relativo da planta (CHR) caiu de 100% para 75%, observou-se a diminuição da condutância estomática (gs), resultando numa menor fixação de CO₂ pela folha e na redução da concentração interna de CO₂ nas folhas (Ci) e nos cloroplastos (Cc) (LAWLOR & CORNIC, 2002).

A diminuição da fotossíntese, observada em resposta ao déficit hídrico moderado (onde o CHR cai para 70-75%), é primeiramente devida ao fechamento estomático (CHAVES *et al.*, 2003). Sob condições de escassez d'água muito severo, a limitação para assimilar o CO₂ tem um efeito prejudicial sobre o metabolismo da planta, diminuindo a síntese de ATP e RuBP, além de reduzir a atividade da Rubisco (BOTA *et al.*, 2004). Além disso, o déficit hídrico também afeta o metabolismo do nitrogênio. Em condições de déficit moderado, quando o CHR cai para 90-95%, a redução do nitrato é inibida, conjuntamente à diminuição dos esqueletos carbônicos decorrente da menor assimilação do CO₂, comprometendo fortemente a assimilação do nitrogênio.

É importante destacar a capacidade que algumas espécies vegetais têm para alterar o seu metabolismo fotossintético, sendo induzidas ao metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) em resposta à escassez d'água. De modo geral, a fotossíntese CAM consiste na abertura dos estômatos no período noturno (coincidindo geralmente com os períodos de mais alta umidade), acompanhada pela fixação do CO₂ (na forma de HCO₃⁻) por meio da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC), a qual carboxila o fosfoenolpiruvato (PEP), gerando oxaloacetato (OAA). Este último é reduzido pela enzima malato desidrogenase (MDH) a malato, que logo depois é transportado para dentro do vacúolo onde é estocado na forma de ácido málico, causando a típica adicificação noturna das plantas CAM. No seguinte período de luz, os estômatos permanecem fechados e o ácido málico é remobilizado para o citoplasma (retornando para a forma de malato) onde é descarboxilado, liberando CO₂ (que dependendo da espécie, o processo pode ser mediado pelas enzimas NAD(P)-ME-type ou PEPCCK-type) e causando a desacidificação das células. Finalmente, o CO₂ liberado é refixado nos cloroplastos pela enzima bifuncional ribulose 1,5-bifosfato carboxilase /oxigenase (Rubisco) no ciclo C₃ (CUSHMAN & BOHNERT, 1999; DODD *et al.*, 2002; LÜTTGE, 2004; HERRERA, 2009; SILVERA *et al.*, 2010).

A capacidade que as plantas CAM possuem de restringir as trocas gasosas com a atmosfera durante o dia, faz com que elas utilizem o seu conteúdo disponível de água mais eficientemente que as plantas C₃ (DRENNAN & NOBEL, 2000; WINTER *et al.*, 2005; BORLAND *et al.*, 2009), sendo, dessa forma, um tipo de comportamento fotossintético muito comum entre as plantas de regiões áridas ou em ambientes onde o suprimento hídrico é intermitente ou sazonal (LÜTTGE, 2004; CRAYN *et al.*, 2004; SILVERA *et al.*, 2009; BORLAND *et al.*, 2011).

O CAM é encontrado em aproximadamente 7% das espécies de plantas vasculares de 34 famílias, sendo que aproximadamente 10% de todas as espécies de plantas vasculares são epífitas (BEZING, 1989), muitas das quais apresentam o CAM (LÜTTGE, 2004). Cerca de 16000 espécies possuem este tipo de metabolismo, entretanto, acredita-se que esse número possa estar subestimado (DODD *et al.*, 2002). Dado que o hábitat epífito é um ambiente altamente escasso na disponibilidade de água e nutrientes, o comportamento CAM confere uma extraordinária flexibilidade fisiológica, permitindo ajustar o metabolismo das

plantas às variações ambientais, como acontece para as espécies C₃-CAM facultativas (BORLAND *et al.*, 1998; CUSHMAN & BORLAND, 2002; WINTER *et al.*, 2008; BORLAND *et al.*, 2011). A bromélia *Guzmania monostachia* é capaz de realizar essa mudança, podendo inclusive reverter o CAM para a condição C₃. Ao contrário de *Mesembryanthemum crystallinum* (Aizoaceae) (MAXWELL *et al.*, 1994; ADAMS *et al.*, 1998; BOHNERT & CUSHMAN, 2000; CUSHMAN & BORLAND, 2002), *Clusia rosea* (Clusiaceae) e algumas espécies estudadas do gênero *Kalanchoë* (Crassulaceae) (BORLAND *et al.*, 2011; WINTER *et al.*, 2008), que depois de convertidas ao CAM, não retornam à condição C₃.

O CAM também é capaz de evitar a fotoinibição quando há baixa disponibilidade de água e/ou alta irradiância (LÜTTGE, 2004) ou, além disso, é capaz de reciclar o CO₂ respirado, numa condição extrema onde os estômatos permanecem fechados tanto no dia quanto à noite. Esse comportamento é conhecido como CAM-Idling (SIPES & TING, 1985; DODD *et al.*, 2002; HERRERA, 2009; BORLAND *et al.*, 2011).

Resultados obtidos no Laboratório de Fisiologia Vegetal do IBUSP demonstraram a capacidade que plantas jovens de abacaxizeiro têm de mudar seu metabolismo fotossintético de um estado C₃ ao estado CAM e vice e versa, por meio da imposição da escassez d'água ou após a re-hidratação, respectivamente (FRESCHI *et al.*, 2010b). Outros resultados mostraram, ainda, diferenças significativas quanto à acidez, atividade da PEPC e MDH nas porções basal, mediana e apical das folhas de *Guzmania monostachia*, sendo que, as maiores atividades das enzimas PEPC e MDH e de acidez foram observadas na porção apical, seguida da porção média das folhas dessa espécie quando submetida ao déficit hídrico (FRESCHI *et al.*, 2010a).

Embora na literatura existam muito poucos estudos sobre o tipo de fotossíntese da bromélia *Vriesea gigantea*, alguns autores caracterizam principalmente o gênero *Vriesea* como contendo espécies exclusivamente C₃ (BENZING, 2000; CRAYN *et al.*, 2004). Porém, experimentos preliminares conduzidos em nosso laboratório demonstraram que *Vriesea gigantea* também possui essa flexibilidade de modular a expressão do CAM após certo período de escassez d'água, podendo ser utilizada, portanto, como um modelo de estudo a respeito da interação entre os metabolismos de nitrogênio e carbono.

I.3. Uréia como fonte orgânica de N

A uréia é uma molécula pequena, neutra, porém polar. Devido ao seu alto conteúdo de nitrogênio (46% de nitrogênio da massa molecular da uréia), é relativamente estável quimicamente. Essa molécula orgânica está presente em diversos ambientes naturais, onde serve como uma fonte disponível de nitrogênio para o crescimento de vários organismos (WANG *et al.*, 2008). A maioria das fontes de uréia na natureza é decorrente da decomposição de compostos nitrogenados de organismos mortos e da excreção de urina.

No interior da célula vegetal, a uréia é gerada com um subproduto na síntese de poliaminas (KUSANO *et al.*, 2007), ou sintetizada durante a degradação dos aminoácidos, purinas e ureídeos (TODD *et al.*, 2006), podendo, então, ser acumulada em tecidos-fonte como folhas senescentes e sementes em germinação, nas quais o nitrogênio é remobilizado para sustentar o crescimento (POLACCO *et al.*, 1993). Por ser metabolizada rapidamente, a uréia praticamente não se acumula, embora, constantemente, possa servir como uma fonte de nitrogênio na planta (WINKLER, 1988).

Por um longo tempo acreditou-se que fontes inorgânicas de nitrogênio, como o NH_4^+ e o NO_3^- , eram não somente as mais abundantes nos solos, como também as únicas formas possíveis de absorção. Contudo, estudos evidenciaram que as plantas são capazes de absorver fontes orgânicas como uréia na sua forma intacta, ou seja, sem ser necessária sua prévia transformação em moléculas de NH_4^+ (INSELSBACHER *et al.*, 2007; MÉRIGOUT *et al.*, 2008) e aminoácidos (NÄSHOLM *et al.*, 2009). Além disso, têm-se mostrado a importância das fontes orgânicas de nitrogênio para nutrição vegetal, principalmente em ambientes onde o suprimento das fontes inorgânicas é limitado (CHAPIN *et al.*, 1993; KIELLAND, 1994; SCHIMEL & CHAPIN, 1996), como acontece no habitat natural das plantas epífitas. Nesses casos, onde a disponibilidade de nitrogênio inorgânico é limitada, os compostos orgânicos podem constituir a maior parte dos recursos nitrogenados utilizados para a nutrição (BENZING, 2000).

As excretas de anfíbios e de outros organismos que freqüentam o tanque das bromélias constituem a principal fonte orgânica de nitrogênio dessas plantas. Estudos feitos por ROMERO *et al.* (2006, 2008) demonstraram a importância da

aranha *Psecas chapoda* (Salticidae) no abastecimento do nitrogênio para a nutrição da bromélia *Bromelia balansae*, chegando a contribuir com 18% do nitrogênio total da planta. Enquanto que, as excretas da espécie *Scinax hayii*, anfíbio freqüentador do tanque da bromélia *Vriesea bituminosa*, contribuíram com 27,7% do N total da planta (ROMERO *et al.*, 2010). Vários estudos têm documentado a grande capacidade que as bromélias epífitas possuem de utilizar uréia como fonte orgânica de nitrogênio. A espécie rupícula com tanque *Vriesea fosteriana* mostrou preferência pelo nitrogênio de origem orgânica (uréia) (NIEVOLA *et al.*, 2001). Observou-se também um melhor crescimento das espécies *Vriesea gigantea* e *Vriesea phillipocoburgi* quando cultivadas *in vitro* na presença de uréia (MERCIER *et al.*, 1997; ENDRES & MERCIER, 2001).

A importância da uréia como fonte nitrogenada para *V. gigantea* também foi evidenciada por meio de descobertas a respeito da sua absorção. Foi demonstrada a existência de uma alta capacidade dos tecidos foliares dessa espécie em absorver essa fonte de nitrogênio na sua forma intacta, além de apresentar uma cinética linear onde, mesmo na presença de altas concentrações de uréia, não houve saturação do seu influxo (INSELSBACHER *et al.*, 2007).

Para desempenhar as suas funções biológicas nas células e tecidos, a uréia deve ser mobilizada através de diferentes membranas. Apesar da observação de que a uréia possui baixa solubilidade através das bicamadas lipídicas artificiais (GALLUCI *et al.*, 1971), o oposto foi observado em sistemas biológicos, sugerindo o envolvimento de proteínas no transporte transmembrana da uréia (WIETH *et al.*, 1974). Para tanto, a uréia deve ser mobilizada através de transportadores específicos. Ainda não estão completamente elucidados os sistemas que as plantas possuem para a absorção da uréia, entretanto, em algas, foram identificados dois sistemas para a absorção de uréia - sistemas de alta e baixa afinidade (WILSON *et al.*, 1988). A identificação de transportadores de uréia de alta afinidade em *Arabidopsis thaliana* (AtDUR3; LIU *et al.*, 2003a) e de baixa afinidade como AtTIP e ZmPIP1-5, aquaporinas de tonoplasto e membrana plasmática permeáveis à uréia (LIU *et al.*, 2003b; GASPAR *et al.*, 2003) trouxeram novas informações sobre a base molecular do transporte de uréia em plantas. O trabalho conjunto desses transportadores permitem otimizar a nutrição nitrogenada da planta, atuando de

maneira dependente das quantidades disponíveis de nitrogênio, tanto no meio ambiente quanto na planta (teores endógenos disponíveis) (KRAJEWSKA, 2009).

Como descrito anteriormente, a bromélia epífita *Vriesea gigantea* possui uma alta capacidade em absorver uréia. Aparentemente, este processo é mediado por transportadores protéicos do tipo aquaporina, uma vez que o inibidor HgCl₂, capaz de se ligar a cisteínas da região do poro das aquaporinas, reduziu em 78% a absorção de uréia (INSELSBACHER *et al.*, 2007). Além disso, em estudos feitos no nosso laboratório, foram clonadas a partir de plantas de *Vriesea gigantea* crescidas *in vitro*, duas isoformas de aquaporinas, VgPIP1,5 e VgTIP2, as quais apresentaram uma maior expressão na porção basal das folhas, sítio de absorção de uréia, em comparação com a região apical (CAMBUÍ, 2009).

Embora dois genes de aquaporina induzíveis por uréia tenham sido clonados de *Vriesea gigantea*, sua capacidade em transportar água e uréia não foi estabelecida por testes funcionais, assim como não foi caracterizada também sua importância no balanço hídrico da planta em condições de déficit hídrico. Considerando que essa espécie de bromélia é de ambiente epifítico, esse hábito faz com que ela esteja constantemente exposta a condições intermitentes de falta de água e/ou nutrientes.

I.4. Urease e assimilação da uréia

Uma vez absorvida pelas células, a uréia deve ser assimilada. Dois tipos diferentes de enzimas que degradam a uréia são capazes de catalisar a assimilação dessa molécula após a sua absorção, são elas: a urease (E.C: 3.5.1.5)(ou uréia amidohidrolase) e a uréia amidolase. As duas hidrolisam a uréia no citossol a CO₂ e amônio, o qual é depois assimilado pela glutamina sintetase. A urease tem sido encontrada em diversos organismos, embora aparentemente esteja ausente em animais. Em plantas vasculares, a assimilação da uréia ocorre exclusivamente por meio da urease, enquanto que a uréia amidolase tem sido reportada somente para levedura (*S. cerevisiae*), algas e bactérias (SIRKO & BRODZIK, 2000).

Os resultados obtidos com *Vriesea gigantea* por TAKAHASHI & MERCIER (2011) mostraram que, quando fornecida uréia no interior do tanque, a região

apical da folha desempenha preferencialmente a assimilação do nitrogênio, enquanto que a basal realiza a hidrólise da uréia. A grande maioria dos estudos sugere que o nitrogênio da uréia só está disponível para o metabolismo vegetal quando a uréia é hidrolisada anteriormente pela urease (uma metaloenzima contendo níquel como grupo prostético), produzindo CO₂ e amônio. O NH₄⁺ é então incorporado, principalmente, pela ação combinada das enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT) (MARSCHENER, 1995; LAM *et al.*, 1996; CAMBUÍ, 2009).

A urease é uma metaloenzima chave no catabolismo da uréia, já que sem esta, a hidrólise da uréia demoraria 520 anos para acontecer espontaneamente (ZAMBELLI *et al.*, 2011). Em plantas, a urease é constituída por um dímero de homotrímeros, totalizando 6 sítios ativos por proteína ativa, onde cada sítio ativo possui dois íons níquel (ZAMBELLI *et al.*, 2011). Uma vez formada a proteína, essa requer um processo de ativação para tornar-se funcional (holo-urease), processo esse mediado por proteínas chaperonas acessórias (WITTE *et al.*, 2005). Durante a sua ativação, a apo-urease (urease inativa) precisa de CO₂ para carbamilar um resíduo de lisina do seu sítio ativo, local onde irão se ligar os íons níquel muito importantes para sua atividade. Adicionalmente, para a sua ativação, também é necessária a hidrólise de GTP (ZAMBELLI *et al.*, 2011).

Estudos realizados no Laboratório de Fisiologia Vegetal do IBUSP demonstraram a localização da urease nas membranas e parede celulares e no citossol de *Vriesea gigantea* (CAMBUÍ *et al.*, 2009). Além disso, notou-se que o CO₂, produto da hidrólise da uréia pela urease, pareceu se acumular junto aos cloroplastos, sugerindo a existência de uma função alternativa da urease, a qual ajudaria na disponibilização não somente de nitrogênio, mas também de carbono à bromélia.

Assim sendo, diante dos estudos realizados anteriormente no Laboratório de Fisiologia Vegetal do IBUSP, os quais demonstraram a grande eficiência e rapidez com que a bromélia epífitas com tanque *Vriesea gigantea* utiliza a uréia como fonte nitrogenada, e a destacada participação da urease no processo de assimilação do nitrogênio (TAKAHASHI & MERCIER, 2011; CAMBUÍ *et al.*, 2009), o presente trabalho visou aprofundar os conhecimentos já obtidos, priorizando a importância

da absorção e assimilação do nitrogênio orgânico e suas relações com o metabolismo de carbono. Procurou-se compreender os processos relacionados ao metabolismo da enzima urease quando plantas de *Vriesea gigantea* foram submetidas à condição de déficit hídrico por polietilenoglicol (PEG). Em uma condição de escassez de água, múltiplos processos fisiológicos/bioquímicos ocorrem na planta, como, por exemplo, o fechamento dos estômatos que limitaria as trocas gasosas e, portanto, a disponibilidade de CO₂ às células que realizam fotossíntese. Seria possível questionar se a atividade da urease compensaria esta condição, fornecendo aos cloroplastos CO₂ oriundo da hidrólise da uréia. Assim, a condição de deficiência hídrica poderia provocar um aumento na atividade da urease, comparada com uma condição sem deficiência. Portanto, pretendeu-se analisar quais seriam as principais alterações encontradas nas fases diurna e noturna da urease e sua possível correlação com o metabolismo ácido das crassuláceas.

II. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como principal objetivo caracterizar na bromélia epífita com tanque *Vriesea gigantea*, o ciclo diurno da atividade da urease em folhas isoladas, quando essas foram submetidas à deficiência hídrica por polietilenoglicol (PEG). Pretendeu-se, ainda, citolocalizar o CO₂ proveniente da hidrólise da uréia.

II.1. Objetivos específicos

- 1). Caracterizar o teor relativo de água (TRA) nas diferentes porções da folha (apical, mediana e basal), submetidas ao déficit hídrico (PEG 30% na presença ou ausência de uréia).
- 2). Caracterizar o metabolismo fotossintético em folhas isoladas de *V. gigantea*, por meio da análise das atividades das enzimas fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC), malato desidrogenase (MDH) e do teor de ácidos orgânicos, quando submetidas à escassez de água.
- 3). Determinar a atividade endógena da urease (sem fornecer uréia) nas porções foliares basal, mediana e apical de folhas submetidas ao déficit hídrico.
- 4). Caracterizar o ciclo na fase clara ou fase escura (semiciclos) da atividade da urease (fornecendo uréia) nas diferentes porções foliares de *V. gigantea* quando submetidas ao déficit hídrico.
- 5). Quantificar os teores de uréia e amônio endógenos nos semiciclos da urease (fornecendo uréia) realizados na fase escura ou clara.
- 6). Caracterizar o perfil de trocas gasosas das folhas destacadas mantidas no tratamento com água (controle) ou com PEG 30% (déficit hídrico) nas porções apical e mediana.

- 7). Determinar a localização citoquímica do CO₂ potencialmente gerado pela atividade da urease, nas células da porção apical das folhas controle e submetidas ao déficit hídrico, durante o período no qual a diferença das atividades da urease foi significativamente diferente entre o controle e o tratamento com PEG.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1. Material vegetal

Para os experimentos foram utilizadas plantas de *Vriesea gigantea* Gaudichaud adultas provenientes de cultivo *in vitro* de sementes de dez anos de idade cultivadas em casa de vegetação. Após adultas, essas plantas foram mantidas em uma mistura substrato contendo "Tropstrato HT Hortalças" (a base de casca de pinus, turfa, vermiculita expandida, enriquecido com macro e micronutrientes), casca de pinus em decomposição 4K tipo CH-2 e casca de pinus seca 4K-para cultivo de orquídeas, na proporção 3:3:1 respectivamente.

III.2. Condição de déficit hídrico

As plantas cultivadas em casa de vegetação foram mantidas em câmara de crescimento durante oito dias com condições controladas de temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade relativa do ar de 70% e fotoperíodo de 12 horas, com intensidade luminosa de $200 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ para aclimação. Posteriormente, foram destacadas as folhas pertencentes ao oitavo até o décimo quinto nós, as quais foram mantidas em boréis contendo água destilada (controle) ou 30 % de polietilenoglicol 6000 (PEG 30%). Essa última solução gerou um $\Psi\pi = -1,83 \text{ MPa}$ que foi capaz de induzir déficit hídrico. Essas folhas isoladas foram mantidas nas mesmas condições controladas anteriormente descritas. Após coletadas, as folhas foram divididas em três porções: basal, mediana e apical. A montagem experimental e a forma como as folhas foram divididas estão mostradas na **figura 1**.

Figura 1: Plantas adultas de *Vriesea gigantea* cultivadas em vaso e mantidas por 8 dias em câmara de cultivo sob condições controladas, das quais foram destacadas as folhas do oitavo ao décimo quinto nós. Essas foram mantidas por 8 dias em solução de PEG 30%, ou em água. Após esse período as folhas foram divididas em 3 porções: ápice, mediana e base.

III.3. Teor Relativo de Água (TRA)

Para determinar o TRA foram feitas análises nas folhas destacadas de *Vriesea gigantea* submetidas ao déficit hídrico com PEG 30% (polietilenoglicol 6000 na concentração de 30%) em ausência ou na presença de uréia (PEG 30%+ uréia 5mM), após 8 dias de estresse hídrico.

Para as diferentes porções das folhas destacadas (após retirada da porção basal de cor avermelhada rica em antocianinas, o restante do limbo foliar foi dividido ao meio, constituindo as porções mediana e apical), foram determinadas as massas fresca, seca e a túrgida em discos com área foliar de 1cm². Os discos foliares foram pesados imediatamente após a coleta para determinar a massa fresca (Mf). Em seguida, esses mesmos segmentos foram colocados em uma placa de Petri com água durante quinze horas e após esse período foram pesadas (secando-as previamente para retirar o excesso de água) visando determinar a massa túrgida (Mt). Finalmente, os segmentos foram mantidos durante 72 horas em uma estufa a 60°C e logo após foram pesados para quantificar a massa seca (Ms).

Com os resultados, foi determinado o TRA por meio da seguinte equação:

$$\text{TRA}(\%) = (Mf - Ms / Mt - Ms) \times 100.$$

III.4. Métodos de análise utilizados na determinação do tipo de fotossíntese realizada pela folha

III.4.1. Ácidos orgânicos (malato e citrato)

Para a quantificação dos ácidos orgânicos foi usada a metodologia descrita por AMORÓS *et al.* (2003) e HASEGAWA *et al.* (2010). Para tanto, foram coletadas amostras de 0,5g de massa fresca, uma hora após as luzes acenderem (acidez de noite) e uma hora antes das luzes apagarem na sala de crescimento (acidez de dia). Essas foram maceradas em nitrogênio líquido, homogeneizadas com 1mL de ácido fórmico 0,25% (como padrão interno) e centrifugadas por 10 minutos a 10.000 g a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado usando filtros Millex GV 0,22 µm (Millipore). O filtrado foi usado para quantificar os ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta performance (HPLC, por suas siglas em inglês).

Alíquotas de 50 µL foram injetadas no cromatógrafo (HPLC Waters, PUMP 510, Detector UV/Vis 486, Auto sampler 717 plus e Software Millennium 32) equipado com uma coluna de troca iônica (300 mm X 7.8 mm, Bio-Rad, USA), usando 1% de ácido sulfúrico como fase móvel. A corrida foi feita isocraticamente a uma taxa de fluxo de 0.5 mL. min⁻¹ e analisado em um detector UV/Vis a 215nm. A temperatura do compartimento da coluna foi ajustada para 28°C. Os padrões dos ácidos orgânicos foram obtidos por soluções de 1mg. mL⁻¹ citrato e 1 mg. mL⁻¹ malato. As análises foram realizadas em triplicatas.

III.4.2. Atividades da PEPC e MDH

Amostras de 0,5 g de material fresco provenientes de folhas foram coletadas uma hora após as luzes acenderem e maceradas em nitrogênio líquido, em seguida imersas em tampão de extração (pH 8), composto por 100 mM de Tris-HCl, MgCl₂, 1mM de ditioneitol (DTT), 1mM de EDTA e 10% de glicerol. As amostras foram centrifugadas a 15.000 g por 5 minutos. O sobrenadante resultante foi coletado e utilizado nos ensaios enzimáticos.

O ensaio para a PEPC foi feito a 30°C em 2 mL de um meio de reação, contendo Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), 1 mM DTT, 0.1% m/v BSA, 10 mM MgCl₂, 10 mM

NaHCO₃, 0.2 mM NADH, 3 mM fosfoenolpiruvato (PEP) e 10 unidades de L-MDH. A reação foi iniciada com a adição de 400 µL do extrato (NIEVOLA *et al.*, 2005). O método para avaliação da atividade da MDH foi baseado em CUEVAS & PODESTA (2000) e FRESCHI *et al.* (2010a). Para o ensaio da atividade da MDH foi avaliada a redução do oxaloacetato, em um meio de reação contendo Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), 5 mM MgCl₂, 0.1% m/v BSA, e 0.2 mM NADH. A reação foi iniciada pela adição de 2 mM oxaloacetato. Nos dois ensaios, o consumo de NADH foi quantificado em espectrofotômetro (340 nm) no momento inicial da reação e após 4 minutos. As análises foram realizadas em triplicatas.

III.4.3. Parâmetros fotossintéticos e trocas gasosas

Visando analisar se haveriam diferenças nos parâmetros fotossintéticos entre a folha destacada e a folha na planta inteira e, portanto, validar o modelo de folha destacada neste estudo, foram comparadas as folhas destacadas e mantidas por 8 dias em boréis contendo água (controle) ou PEG 30% (déficit hídrico) e folhas na planta inteira mediante a análise de alguns parâmetros fotossintéticos, tais como a assimilação máxima (A_{max}), respiração no escuro (R_d), ponto de saturação luminosa (P_{SL}) e ponto de compensação luminosa (P_{CL}), através de analisador de gás por infravermelho (LiCor - 6400) com uso de câmara de luz artificial e cilindro de CO₂ (concentração mantida constante a 390 ppm).

Adicionalmente visando caracterizar o perfil de trocas gasosas, foram analisadas as porções apical e mediana das folhas destacadas mantidas nas diferentes condições experimentais anteriormente descritas em modo contínuo por 24 horas (**figura 1b**), conforme descrito em FRESCHI *et al* (2010a).

Figura 1b: Montagem experimental para a medição das trocas gasosas em folhas destacadas de plantas de *Vriesea gigantea* mantidas por oito dias em deficiência hídrica induzida por PEG 6000 30% ou em água (controle). Todas as medidas foram feitas com as folhas destacadas mantidas em câmaras de cultivo com condições controladas.

III.5. Quantificação da atividade *in vivo* da urease

III.5.1. Ciclo da atividade endógena da urease (sem fornecer uréia)

Uma vez induzida a deficiência hídrica nas folhas, cada porção foliar foi cortada em pequenos fragmentos, formando uma amostra composta. Previamente, as folhas foram lavadas com água destilada e secas superficialmente. A atividade da urease foi realizada de acordo com o método *in vivo* descrito por HOGAN *et al.* (1983) e TAKAHASHI & MERCIER (2011).

As folhas cortadas e homogeneizadas foram separadas em alíquotas de 0,5 g de matéria fresca para cada condição experimental, realizando triplicatas para todas as amostras. Posteriormente, os fragmentos foliares foram colocados dentro de tubos de ensaio, contendo 2 mL de tampão de incubação, previamente desaerado, constituído de fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), 5% de n-propanol e 200 mM de uréia. Os tubos contendo os fragmentos foliares foram submetidos 3 vezes a vácuo por 1 minuto cada, para facilitar a infiltração da solução tampão nos tecidos.

Foram coletadas alíquotas de 100 μL para a determinação da quantidade inicial de amônio presente nos tecidos. O restante foi incubado em banho a 30°C durante 1 hora. Terminado o tempo de reação, foi coletada uma alíquota de 100 μL para a determinação da quantidade de amônio produzido pela urease nesse intervalo de tempo. O amônio foi quantificado de acordo com o método descrito por McCULLOUGH (1967).

Aos 100 μL das amostras, foram adicionadas 500 μL do reagente A (solução aquosa constituída de 10 g. L^{-1} de fenol e 50 mg. L^{-1} de nitroprussiato de sódio) e 500 μL do reagente B (solução aquosa constituída de 5 g. L^{-1} de hidróxido de sódio, 20 mL. L^{-1} de hipoclorito de sódio a 5% e 20mL de fosfato de sódio dibásico a 150 mM). As amostras foram, então, agitadas e incubadas a 37°C por 35 minutos, sendo em seguida lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 625nm. A atividade específica da urease foi expressa em $\mu\text{g NH}_4^+ \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de massa seca. As análises foram realizadas em triplicatas.

III.5.2. Atividade da urease fornecendo uréia 5mM

Após 8 dias de deficiência hídrica, as folhas em PEG 30% (tratamento) e as folhas em água (controle) foram transferidas para boréis contendo água destilada ou PEG 30%, com uréia 5 mM e $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,5 μM , sendo o pH da solução do borel ajustado para pH 5.8. Os pontos de coleta foram 0, 1, 4, 7, 10 e 13 horas depois de adicionada a uréia. A atividade da urease foi quantificada com a mesma metodologia apresentada no item anterior. O experimento foi feito na fase clara (12 horas de análise no claro) e repetido para a fase escura (12 horas de análise no escuro), visando verificar o comportamento da enzima quando fornecida a uréia em fases diferentes do dia (claro/escuro). As análises foram realizadas em triplicatas.

III.6. Quantificações de uréia e amônio endógenos

Visando caracterizar e entender melhor o estado metabólico nos diferentes momentos de coleta, foram quantificados tanto a atividade da urease quanto os conteúdos endógenos de amônio e uréia.

III.6.1. Teor endógeno de uréia

A quantificação da uréia endógena foi baseada no método de dosagem enzimática descrito por GERENDÁS & SATTELMACHER (1997). Nesse método, a uréia endógena é hidrolisada pela enzima urease, sendo que o amônio formado é quantificado colorimetricamente e lido em espectrofotômetro.

Toda a vidraria utilizada no processo foi lavada em HCl 1.2 N, logo depois foi enxaguada várias vezes com água ultra-purificada e, finalmente, seca antes da sua utilização. As folhas foram cortadas em pequenos fragmentos formando uma mistura homogênea. Amostras de 0.5 g de massa fresca foram maceradas com nitrogênio líquido e, posteriormente, transferidas para tubos nos quais foram acrescentados 2 mL de água ultra-purificada. Os tubos contendo as amostras foram centrifugados a 10.000 g, 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado em lã de vidro e utilizado nas quantificações de uréia.

A reação consistiu da adição de 750 µL de tampão fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0,1 M pH 7.5, 200 µL do extrato vegetal e 50 µL da solução de enzima urease 50 mM ("Sigma"). Após a adição dos reagentes, a mistura foi agitada, sendo os tubos tipo "Eppendorf®" colocados em banho a 37°C por 40 minutos. Terminado o tempo de reação, foi coletada uma alíquota (100 µL) de cada tubo experimental para se determinar a quantidade de NH_4^+ formado. A quantificação de amônio foi feita segundo o método descrito por WEATHERBURN (1967) (item a seguir). Para a construção da curva-padrão, foram preparadas soluções de uréia com diferentes concentrações (0,5mM, 1mM, 2,5mM, 5mM). A dosagem de uréia endógena foi expressa em µg uréia. h^{-1} . g^{-1} de massa seca. As análises foram realizadas em triplicatas.

III.6.2. Quantificação de amônio endógeno

A quantificação do amônio foi determinada de acordo com a reação fenol-hipoclorito (WEATHERBURN, 1967; MCCULLOUGH, 1967). Toda a vidraria utilizada no processo foi lavada em ácido clorídrico 1.2 N, e em seguida, enxaguada várias vezes com água ultra-purificada e depois seca antes da sua utilização.

Segundo a metodologia do fenol-hipoclorito, dois reagentes são utilizados: o reagente A e o reagente B. O primeiro é constituído de fenol (10g/L) e nitroprusside de sódio (50 mg/L), sendo que o segundo contem $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (53,7g/L), hipoclorito de sódio (10-14% Cl_2) (10 mL/L) e NaOH (5g/L). Amostras de 0.5 g de massa fresca foram maceradas com nitrogênio líquido e transferidas para tubos, aos quais foram acrescentados 2 mL de água ultra-purificada. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 10.000 g, 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado em lã de vidro e utilizado nas quantificações de amônio endógeno.

Em tubos de ensaio, foram aliqotados 100 μL do extrato vegetal e adicionado 0,5 mL do reagente A e 0,5 mL do reagente B. Após uma vigorosa agitação, a mistura permaneceu em banho-maria a 35°C por 35 minutos. Cada amostra foi lida no espectrofotômetro a 625nm. Para a construção da curva-padrão, foram preparadas soluções de amônio com diferentes concentrações (0,05 μg , 0,1 μg , 0,2 μg , 0,5 μg e 1 μg de amônio em cada volume de 100 μL). A dosagem de amônio endógeno foi expressa em $\mu\text{g NH}_4^+ \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de massa seca. As análises foram realizadas em triplicatas.

III.7. Obtenção da razão entre massa seca e massa fresca das amostras

Como as amostras foram submetidas a diferentes graus de desidratação, a utilização de massa fresca como indicadora da quantidade de material poderia mascarar os resultados. Assim, amostras contendo 0,5 g de massa fresca retiradas de folhas submetidas a cada tratamento foram mantidas por 72 horas em uma estufa a 60°C, para a obtenção do valor de massa seca. Uma vez obtido esse valor, ele foi dividido pela quantidade original de massa fresca (0,5 g), obtendo-se uma razão entre a massa fresca e a massa seca em cada um dos tratamentos. Esses valores foram usados para expressar os resultados obtidos nos ensaios descritos anteriormente.

III.8. Detecção citoquímica do CO₂

A detecção citoquímica do CO₂, parcialmente liberado após hidrólise da uréia pela urease, foi baseada nas metodologias descritas por MILLANES *et al.* (2004) e CAMBUI *et al.* (2009). A técnica de citolocalização do CO₂ consiste na formação de carbonato de cobalto a partir da reação do CoCl₂ com o dióxido de carbono produzido durante a hidrólise da uréia. Dessa maneira, o carbonato de cobalto, o qual é insolúvel, na presença de sulfeto de amônio forma um precipitado eletrodenso quando analisado em microscópio eletrônico de transmissão, permitindo a visualização do local de atuação dessa enzima. Para permitir que o CO₂ gerado pela urease tenha livre movimentação no interior das células, a fixação dos tecidos foi realizada após a atuação da urease.

Os tecidos foliares das porções apical e mediana recém-coletados nos pontos máximos de atividade da enzima foram cortados em fragmentos de aproximadamente 1mm e incubados por 1 hora em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), contendo 100 mM de uréia e 10 mM de CoCl₂. O material foi submetido à infiltração a vácuo 3 vezes por um minuto e incubado durante 60 minutos a 30°C. Após a atuação da urease, os tecidos foliares foram lavados abundantemente com água destilada e tratados com (NH₄)₂S durante 30 segundos, sendo lavados posteriormente com água destilada. O material foi infiltrado a vácuo com solução fixadora composta de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 2% de formaldeído e 2,5% de glutaraldeído. O material foi fixado durante 24 horas, sendo posteriormente lavado abundantemente com tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e submetido a uma segunda fixação com OsO₄ 1% em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) durante 90 minutos. Em seguida, foi lavado o material com água destilada, com posterior incubação por 12 horas em solução aquosa contendo 0,5% de acetato de uranila. Após nova lavagem com água destilada, o material foi desidratado em série de acetona (20%, 40%, 60%, 90% e 100% ficando por 30 minutos em cada concentração de acetona) e emblocado em resina Spurr durante uma semana a 60°C. Cortes ultrafinos do material foram, então, contrastados com acetato de uranila 2% e citrato de chumbo e visualizados em microscópio eletrônico de transmissão.

III.9. Análises estatísticas

Foram calculadas as médias e desvios padrões para cada experimento. Para analisar a diferença entre o controle e o tratamento de deficiência hídrica, as médias foram comparadas pelo Teste t-student em nível de variância de 5% de significância.

IV. RESULTADOS

IV.1. Caracterização do metabolismo fotossintético em folhas de *Vriesea gigantea* quando submetidas ao PEG (déficit hídrico)

Realizou-se um primeiro teste com objetivo de avaliar o efeito do destacamento das folhas, submetendo-as ao déficit hídrico com PEG 30% por oito dias (**Tabela 1**). Também foi avaliado se, de fato, esse tipo de tratamento era efetivo para induzir o fechamento dos estômatos, condição na qual a entrada de CO₂ da atmosfera para a planta seria reduzida.

<i>Vriesea gigantea</i>	A max	Rd	PSL	PCL
Planta inteira	4,3	0,08	300	1,7
Folha destacada-mantida em água (controle)	1,2	0,05	140	2,1
Folha destacada- mantida em PEG 30%	0,1	0,6	205	12,5

Tabela 1: Parâmetros fotossintéticos em *Vriesea gigantea*. Amax - assimilação máxima, Rd - respiração no escuro (mmol CO₂ m⁻². s⁻¹), PSL - ponto de saturação luminosa (μmol fótons m⁻². s⁻¹), PCL - ponto de compensação luminosa (μmol fótons m⁻². s⁻¹). As medições foram realizadas na porção apical da folha.

A **tabela 1** mostra alguns parâmetros fotossintéticos estudados para a planta inteira bem hidratada e para as folhas destacadas e mantidas em água ou PEG 6000 30% durante 8 dias; para este último observou-se que o tratamento foi efetivo no fechamento dos estômatos, ilustrado pela alta respiração (Rd = 0,6) e baixa assimilação de CO₂ (Amax = 0,1).

IV.2. Determinação do teor relativo de água (TRA) nas diferentes porções das folhas destacadas submetidas ao PEG (déficit hídrico)

Após manter as folhas destacadas em frascos do tipo borel contendo PEG 30% ou água por 8 dias em câmaras com condições controladas (como descrito no itens III.2 e III.3), foi analisado o teor relativo de água (TRA). Pode-se notar por meio da **figura 2**, que o teor relativo de água decresceu significativamente em todas as

porções foliares (apical, mediana e basal), indicando que o tratamento com PEG foi eficiente na indução do déficit hídrico. De maneira interessante, a base foliar é a porção mais succulenta e ao mesmo tempo foi a que perdeu mais água com o tratamento com PEG, chegando a perder cerca de 60% da sua água. Entretanto, ao contrário da porção basal, as porções mediana e apical apresentaram pouca diminuição no teor de água, mesmo após serem mantidas por oito dias em PEG, reduzindo aproximadamente 10% e 24% da sua água, respectivamente.

Figura 2: Teor relativo de água-TRA (%) nas diferentes porções foliares de folhas destacadas de *Vriesea gigantea* após 8 dias de deficiência hídrica induzida por PEG 30%. Os asteriscos indicam diferenças significativas segundo o teste T-Student em nível de 5%.

IV.3. Caracterização do metabolismo fotossintético em folhas isoladas de *V. gigantea*

A fotossíntese das folhas destacadas de *Vriesea gigantea* após oito dias de submissão ao déficit hídrico foi caracterizada por meio da análise das atividades das enzimas fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC), malato desidrogenase (MDH), teor noturno de ácidos orgânicos e trocas gasosas.

IV. 3.1. Atividades das enzimas PEPC, MDH e conteúdo de ácidos orgânicos

A atividade da PEPC aumentou significativamente na porção apical das folhas submetidas ao PEG 30% (**figura 3**). Já na porção basal da folha, a atividade dessa enzima no controle foi significativamente maior quando comparada ao tratamento. A **figura 4** mostra a atividade da MDH, a qual foi significativamente maior para as porções mediana e basal das folhas-controle. Contudo, a região apical da folha foi sempre a que apresentou as maiores atividades tanto de PEPC quanto de MDH.

Figura 3: Atividade da PEPC ($\mu\text{moles de NADH consumido} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MS}$) nas diferentes porções foliares de folhas destacadas de *Vriesea gigantea* após 8 dias de deficiência hídrica induzida por PEG 30%. Os asteriscos indicam diferenças significativas segundo o teste T-Student em nível de 5%.

Figura 4: Atividade da MDH ($\mu\text{moles de NADH consumido} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MS}$) nas diferentes porções foliares de folhas destacadas de *Vriesea gigantea* após 8 dias de deficiência hídrica induzida por PEG 30%. Os asteriscos indicam diferenças significativas segundo o teste T-Student em nível de 5%.

Conjuntamente com o aumento na atividade da PEPC, o ápice da folha apresentou um acúmulo noturno significativo dos ácidos orgânicos citrato e malato, sendo este último o principal ácido acumulado (**figura 5**). Com base nos resultados apresentados nas **figuras de 2 a 5**, aparentemente, os ápices das folhas em déficit hídrico incrementaram a expressão do metabolismo CAM, ao contrário das outras porções foliares (mediana e basal) que parecem não terem alterado seu tipo de metabolismo fotossintético.

Figura 5: Teores de ácidos orgânicos expressos em $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}\text{MS}$, nas diferentes porções de folhas destacadas de *Vriesea gigantea* após 8 dias de deficiência hídrica induzida por PEG 30%. Os asteriscos (*) indicam diferenças significativas entre controle e tratamento. A letra A significa diferenças significativas entre o Controle-Dia e o Controle-Noite, enquanto a letra B indica diferenças significativas entre PEG 30%-Dia e PEG 30%-Noite.

IV.3.2. Trocas gasosas em folhas destacadas de *Vriesea gigantea*

Para compreender e caracterizar melhor o estado fotossintético das folhas destacadas mantidas sob déficit hídrico por oito dias, foram feitas análises de trocas gasosas nas porções mediana e apical (**figura 6**). Nas folhas mantidas sob condições hídricas favoráveis (controle), a assimilação de CO₂ aconteceu ao longo do período diurno para ambas as porções foliares estudadas (ápice e mediana). Na **figura 6A**, observa-se que a assimilação de CO₂ ocorreu principalmente nas primeiras cinco horas após o começo do fotoperíodo, apresentando a região mediana níveis diurnos de trocas gasosas levemente maiores daquelas encontradas para a região apical. Em contraste, as porções apical e mediana de folhas destacadas e mantidas sob déficit hídrico praticamente não exibiram assimilação de CO₂ tanto para o período diurno quanto para o noturno (**figura 6B**).

Esses resultados são mais uma evidência que valida o modelo experimental de folha destacada, isto é, além dos dados obtidos na **tabela 1**, os dados conseguidos com as folhas-controle mostraram que mesmo destacadas, estas permanecem fotossinteticamente ativas (**figura 6A**) e que o tratamento com PEG 30% foi eficiente na modulação do CAM, limitando a entrada de CO₂ na folha (**figura 6B**).

Figura 6: Trocas gasosas de CO₂ expressas em μmol de CO₂ fixado. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, nas diferentes porções foliares (ápice e mediana) de folhas destacadas de *Vriesea gigantea* após 8 dias de hidratação (A) ou de deficiência hídrica (B) induzida por PEG 30%

IV.4. Determinação da atividade endógena da urease (sem fornecer uréia) e dosagens de uréia e amônio nas diferentes porções foliares de *V.gigantea*

IV.4.1. Ciclo do teor endógeno de uréia (sem ter fornecido uréia às folhas)

Para conhecer como é o comportamento endógeno da enzima urease, analisou-se a sua atividade em um ciclo de 24 horas (**figura 7**). Neste observou-se que nas três porções foliares estudadas a atividade da urease é constitutiva. O comportamento para ambos os tratamentos (controle e PEG) estudados na porção apical mostrou uma tendência muito similar ao longo do ciclo. A porção mediana apresentou um comportamento semelhante àquele encontrado na porção apical

para ambos os tratamentos. Entretanto, a base foliar mostrou uma atividade significativamente maior comparada às porções apical e mediana, sendo que nas folhas-controle essa atividade foi maior quando comparada àquela das folhas submetidas ao PEG. Ainda que as folhas sob déficit hídrico possuam atividades mais baixas, elas seguem o mesmo padrão de comportamento do controle. Tendo em vista que a base da folha é a principal porção que sofre o estresse hídrico, isto se refletiu provavelmente nas atividades enzimáticas desta região.

Figura 7: Ciclo de 24 horas da atividade endógena da urease nas diferentes porções foliares. Atividade expressa em $\mu\text{g NH}_4^+ \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}\text{MS}$. A área sombreada representa a fase escura do ciclo. Os asteriscos indicam diferenças significativas segundo o teste T-Student em nível de 5%.

IV.4.2. Ciclo dos teores endógenos de uréia e amônio (sem ter fornecido uréia às folhas)

Visando entender um pouco mais profundamente a dinâmica da uréia na folha e a sua relação com a atividade endógena da urease, quantificaram-se os teores endógenos de uréia e amônio para cada horário de coleta estudado no ciclo enzimático do item anterior.

A **figura 8** mostra o conteúdo endógeno de uréia ao longo de 24 horas, nas diferentes porções foliares. O ápice da folha mostrou ter um padrão similar tanto para o controle quanto para o tratamento. Os horários onde houve uma diferença significativa entre os tratamentos foram no período escuro, no qual o controle apresentou um maior acúmulo de uréia. Comparando-se esses dados com as atividades endógenas da urease na porção apical (**figura 7**), observa-se que no período noturno (nas 15h e 21h de estudo) a atividade do controle é significativamente menor do que o tratamento com PEG, o que explicaria em parte as diferenças de acúmulo de uréia entre os tratamentos na porção apical. Ainda, observou-se que não houve níveis detectáveis de uréia no período das 3 a 6 horas.

A porção mediana apresentou o mesmo comportamento da região apical entre as horas 3 e 6, junto com um elevado acúmulo de uréia no final do período escuro. De maneira interessante, a porção basal é a que apresentou as maiores atividades endógenas de urease junto com os maiores níveis endógenos de uréia (**figuras 7 e 8**). Inesperadamente, no período das 3 às 6 horas, onde a atividade da urease diminui, o teor endógeno de uréia também caiu.

A **figura 9** mostra os teores endógenos de amônio. Os valores variaram relativamente pouco (entre 4 a 10 $\mu\text{g NH}_4^+\text{g}^{-1}\text{MS}$ na maioria dos pontos de coleta) ao longo do dia para todas as porções foliares estudadas. Entretanto, o controle, para todas as três porções foliares, apresentou níveis significativamente mais elevados quando comparados com o tratamento de déficit hídrico, principalmente no período claro.

Figura 8: Teor endógeno de uréia em um ciclo de 24 horas nas diferentes porções foliares. Teor expresso em μg uréia. g^{-1}MS . A área sombreada representa a fase escura do ciclo. Os asteriscos indicam diferenças significativas segundo o teste T-Student em nível de 5%.

Figura 9: Teor endógeno de amônio em um ciclo de 24 horas nas diferentes porções foliares. Teor expresso em $\mu\text{g NH}_4^+ \cdot \text{g}^{-1}\text{MS}$. A área sombreada representa a fase escura do ciclo. Os asteriscos indicam diferenças significativas segundo o teste T-Student em nível de 5%.

IV.5. Caracterização da atividade da urease durante a fase clara e fase escura (fornecendo uréia) e dosagem de uréia e amônio nas diferentes porções foliares de *V. gigantea* submetidas ao PEG (déficit hídrico).

Visando caracterizar melhor as atividades da urease nas fases clara e escura quando fornecida a uréia, foram realizados alguns testes descritos a seguir:

IV.5.1. Teste dosagens de uréia e amônio em uma solução com PEG 30%

O objetivo desse teste foi garantir que o PEG 6000 não interferiria no método bioquímico empregado para a dosagem de uréia e amônio tanto da solução (**figuras 10 e 11**) quanto do tecido foliar (**figuras 12 e 13**). Ao dosar o teor de uréia de uma solução contendo 5mM de uréia dissolvida em água (controle) ou em PEG 30% (PEG30%+Uréia), não se observaram diferenças significativas entre os tratamentos, indicando que o PEG 30% não interferiu no ensaio da dosagem de uréia (**figura 10**). Por sua vez, foi quantificado o teor de amônio presente nas diferentes soluções, Água+Uréia e PEG30%+Uréia, e detectaram-se baixíssimas concentrações de amônio (**figura 11**), possivelmente, provenientes de alguma pequena contaminação da vidraria no momento da quantificação. Entretanto, isto não representou consequências relevantes nas análises de amônio endógeno. Paralelamente, foram quantificados os teores de uréia e amônio de uma solução contendo somente PEG 30%, demonstrando-se que nela não existem impurezas de uréia e nem de amônio.

Figura 10: Dosagem de uréia presente na solução do borel com ou sem presença de PEG30% (µg uréia/mL de solução).

Figura 11: Dosagem de amônio na solução do borel, expressa em $\mu\text{g NH}_4^+/\text{mL}$ de solução.

IV.5.2. Teste de absorção de uréia pela folha de *V. gigantea*

Para avaliar se o PEG 30% permitiria a absorção de uréia pela folha foram quantificados os teores de amônio e uréia tanto na solução quanto no tecido nas diferentes porções foliares (apical, mediana e base) para os tempo de 0 e 6 horas, após o fornecimento de uréia.

Na **figura 12** estão mostrados os teores de uréia na solução e no tecido. Pode-se observar que após 6 horas de permanência na solução contendo 5mM de uréia dissolvida em PEG 30%, a absorção de uréia é significativamente menor nas folhas quando comparadas ao controle (uréia dissolvida em água), refletido em um teor de uréia restante na solução do borel mais elevado. Entretanto, é possível garantir que o PEG permitiu a absorção de uréia devido à diminuição do teor de uréia no borel no intervalo de tempo de 6 horas, e pelo aumento nos teores endógenos de uréia e amônio na porção basal da folha (**figuras 12 e 13**).

Provavelmente, a diferença de absorção entre os tratamentos foi devido ao aumento no fechamento estomático das plantas em PEG decorrente da perda de água que as folhas começaram a sofrer nas primeiras 6 horas de tratamento. Como ilustra a **figura 14**, todas as porções das folhas tratadas com PEG e uréia mostraram uma perda de aproximadamente 10% no conteúdo de água.

Figura 12: Dosagem de uréia presente na solução do borel ou no tecido foliar (nas diferentes porções), (μg uréia/mL de solução), após 0 e 6 horas do fornecimento de 5mM de uréia. Os asteriscos indicam diferenças significativas segundo o teste T-Student em nível de 5%. Controle = água+uréia.

Figura 13: Dosagem de amônio na solução do borel ou no tecido foliar (nas diferentes porções), ($\mu\text{g NH}_4^+/\text{mL}$) de solução, após 0 e 6 horas do fornecimento de 5mM de uréia. Os asteriscos indicam diferenças significativas segundo o teste T-Student em nível de 5%. Controle indica o tratamento água+uréia.

Figura 14: Conteúdo hídrico $((MF-MS)/MS \times 100)$, das diferentes porções foliares após 6 horas do fornecimento de 5mM de uréia à folha, tanto em água (controle) quanto em PEG (PEG 30%+uréia). Os asteriscos indicam diferenças significativas segundo o teste T-Student em nível de 5%.

Visando verificar se a condição hídrica das diferentes porções foliares não seria alterada no momento de adicionar a uréia aos tratamentos contendo PEG 30% por 8 dias, foi quantificado o conteúdo hídrico nas diferentes porções (**figura 15**). Mostrou-se que a uréia não influenciou no padrão de perda de água observado anteriormente na **figura 2**, quando as folhas foram mantidas somente durante o oitavo dia em uréia dissolvida em PEG.

Figura 15: Conteúdo hídrico $((MF-MS)/MS \times 100)$, das diferentes porções foliares após as folhas terem sido mantidas por 8 dias em déficit hídrico (PEG) e, apenas no último dia, terem sido submetidas a 5mM de uréia, tanto em água (controle) quanto em PEG (PEG 30%+uréia). Os asteriscos indicam diferenças significativas segundo o teste T-Student em nível de 5%.

IV.5.3. Semiciclo da atividade da urease durante a fase clara após ter fornecido uréia nas folhas destacadas de *Vriesea gigantea*

O objetivo de analisar a atividade da urease na fase clara após ter fornecido uréia foi comparar as atividades das porções foliares com as atividades endógenas da urease encontradas no período claro, observando se haveria um incremento ou mudança significativa ao longo do período estudado.

Comparando-se os resultados de atividade da urease obtidos para a porção apical (**figura 16**) com as suas atividades endógenas (**figura 7**), foi possível observar que tanto o tratamento com PEG+uréia e água+uréia (controle), apresentaram o mesmo padrão do ciclo endógeno, sem aumento nas atividades.

As atividades da urease na porção mediana, após o fornecimento de uréia, também não apresentaram aumentos nos valores de atividade quando comparadas com o ciclo endógeno (**figura 16**). Ainda que o controle tenha seguido o mesmo padrão diário do ciclo endógeno, o tratamento de déficit hídrico mudou esse padrão, aparentemente adiantando o ciclo; isto é, enquanto a máxima atividade na fase clara do ciclo endógeno ocorreu no final da tarde, ela ocorreu 3 horas antes com o fornecimento de uréia. Além disso, no último ponto desse período (coleta já no escuro), a atividade das folhas tratadas aumentou consideravelmente quando comparada ao controle.

Na porção basal, as atividades do controle foram sempre maiores quando comparadas com o tratamento (**figura 16**), como ocorreu no ciclo endógeno. Entretanto, as folhas mantidas em água com uréia dobraram sua atividade quando comparada àquelas sem uréia (controle do ciclo endógeno- **figura 7**), ainda que seguindo um padrão similar, com máxima atividade no final da tarde. Já o mínimo de atividade ocorreu 6 horas antes, quando comparado ao ciclo endógeno. O tratamento de PEG com uréia, por sua vez, também dobrou suas atividades quando comparadas com o ciclo endógeno (sem uréia), sendo que o padrão das atividades foi adiantado em três horas.

Aparentemente o fornecimento de uréia na fase clara tem implicações relevantes apenas na porção basal, dobrando a atividade da urease comparativamente ao comportamento endógeno e adiantando o pico de atividade nas porções mediana e basal do tratamento com PEG + uréia.

Figura 16: Semiciclo da atividade da urease nas diferentes porções foliares, após ter fornecido 5 mM de uréia no período claro. A área sombreada representa a fase escura do semiciclo. Os asteriscos indicam diferenças significativas segundo o teste T-Student em nível de 5%.

IV.5.4. Semiciclo da atividade da urease durante a fase escura após ter fornecido uréia nas folhas destacadas de *Vriesea gigantea*

De maneira similar ao objetivo do item anterior, a finalidade de analisar a atividade da urease com o fornecimento de uréia na fase escura do ciclo foi observar se existiria alguma alteração em termos de atividade entre as porções foliares e os tratamentos estudados (**figura 17**), quando comparados com atividades endógenas da urease encontradas no período escuro (**figura 7**).

Ao contrário da resposta dos tratamentos no semiciclo na fase clara, onde não ocorreram mudanças significativas no que diz respeito ao ciclo endógeno, a resposta encontrada para os tratamentos na fase escura foi extremamente interessante. Notavelmente, houve um forte incremento da atividade de urease na porção apical no período de escuro nas folhas submetidas a déficit hídrico por PEG 30% (**figura 17**). As folhas-controle, por outro lado, apresentaram atividades menores que as encontradas no ciclo endógeno e, mesmo com o fornecimento de uréia, observou-se uma queda progressiva da atividade da urease.

Na porção mediana (**figura 17**), as atividades do tratamento com PEG se mostraram levemente maiores do que o controle, indicando que nesta porção a uréia teria implicações similares às encontradas para a porção apical. De maneira semelhante às folhas-controle da porção apical, na porção mediana tanto as folhas-controle quanto as submetidas ao PEG apresentaram valores de atividade menores do que as encontradas no ciclo endógeno mesmo na presença de uréia.

Na porção basal (**figura 17**), não somente a atividade do controle se manteve significativamente maior quando comparado com o estressado, mas também o padrão de atividade da urease de ambos os tratamentos mudou quando se compara com o ciclo endógeno (**figura 7**). Neste último, as atividades caem paulatinamente durante a noite enquanto que, com o fornecimento de uréia, a atividade das folhas sob déficit hídrico varia dentro de uma faixa de valores, sem apresentar uma queda progressiva. As atividades das folhas-controle também mantiveram-se estáveis dentro de uma faixa de valores, havendo somente a queda de atividade após 7 horas após o fornecimento da uréia. De modo geral, os valores absolutos das atividades aumentaram quando comparados aos do ciclo endógeno, mas não tão drasticamente quanto na fase clara.

Figura 17: Semiciclo da atividade da urease nas diferentes porções foliares, após ter fornecido 5 mM de uréia no período escuro. A área clara representa a fase de luz do semiciclo. Os asteriscos indicam diferenças significativas segundo o teste T-Student em nível de 5%.

IV.5.5. Semiciclo de dosagens de uréia e amônio na solução e no tecido durante a fase clara e a fase escura

Para avaliar o conteúdo de amônio e uréia no tecido, quando foi fornecida a uréia (5 mM) às folhas destacadas controle e PEG 30%, foram dosados os teores de amônio e uréia nos pontos de coleta dos semiciclos da atividade da urease na fase clara e escura. Conjuntamente, foram dosados o amônio e a uréia na solução do borel, permitindo, dessa maneira, avaliar com mais detalhes as condições nas quais as folhas estavam expostas.

IV.5.5.1. Semiciclo de dosagem de uréia e amônio na solução durante a fase clara e a fase escura

Na **figura 18** apresentam-se os conteúdos de uréia e amônio na solução coletadas na fase clara após ter fornecido uréia às folhas. Os resultados mostram que muito provavelmente as folhas-controle absorveram mais uréia do que as folhas expostas à condição de déficit hídrico, sendo detectado uma menor quantidade de uréia no borel. No intervalo da 1 hora até as 10 horas, as folhas-controle absorveram em torno de 30 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que para as folhas submetidas à escassez de água a absorção foi consideravelmente menor, chegando somente a absorver nesse intervalo de tempo cerca de 10 $\mu\text{g/mL}$. Esse resultado era esperado, uma vez que a dosagem de uréia feita anteriormente nos boréis (**figura 12**) mostrou um comportamento similar.

O teor de uréia na solução durante a fase escura comportou-se de maneira similar à absorção de uréia na fase clara, sendo que para as folhas-controle houve uma absorção de aproximadamente 40 μg de uréia/mL e de 10 $\mu\text{g/mL}$ nas folhas sob déficit hídrico no intervalo entre 1h até 10 horas (**figura 19**). Mais interessante ainda é ter encontrado uma maior atividade da urease na fase escura para as folhas submetidas ao déficit hídrico (**figura 17**), sendo que provavelmente o transporte de uréia até o ápice foi menor quando comparado ao das folhas-controle.

Figura 18: Dosagem de uréia e amônio na solução dos boréis utilizados no semiciclo da fase clara. As horas indicam os tempos de coleta após o fornecimento de 5 mM de uréia. Os asteriscos indicam diferenças significativas segundo o teste T-Student em nível de 5%.

Figura 19: Dosagem de uréia e amônio na solução dos boréis utilizados no semiciclo da fase escura. As horas indicam os tempos de coleta após o fornecimento de 5 mM de uréia. Os asteriscos indicam diferenças significativas segundo o teste T-Student em nível de 5%.

IV.5.5.2. Semiciclo de dosagens de uréia e amônio nas folhas destacadas de *Vriesea gigantea* durante a fase clara

Além de analisar os semiciclos das atividades de urease nas folhas quando fornecida a uréia, foi avaliada a dosagem de amônio e uréia endógenos nos mesmos tempos de coleta usados para as atividades enzimáticas.

De maneira comparativa, observou-se que a adição de 5 mM de uréia aumentou a quantidade de uréia e amônio no tecido (**figuras 20 e 21** respectivamente), alterando o padrão de resposta na fase clara quando comparada à dosagem do ciclo endógeno, ou seja naquele em que às folhas não foi fornecida a uréia (**figuras 8 e 9**). Na **figura 20** é possível observar que a quantidade absoluta de uréia vai diminuindo em direção ao ápice, isto poderia ser devido em parte a um

menor transporte da uréia da base para o ápice. Para as folhas-controle, o perfil de concentração de uréia que apresentou a porção apical foi muito similar àquele da porção mediana, havendo para ambas as porções uma queda do teor de uréia no ponto de coleta das 7 horas. De maneira similar para as folhas submetidas à escassez da água, o padrão de resposta para as porções apical e mediana foi muito parecido, entretanto, o perfil de resposta quando comparado ao das folhas-controle seguiu uma dinâmica totalmente diferente.

Aparentemente, para as porções apical e mediana o conteúdo de uréia não refletiu num aumento ou diminuição da atividade da urease. Somente a porção basal parece ter alguma relação direta com o padrão de atividades da urease, sendo que para folhas-controle o conteúdo de uréia aumenta ao longo do tempo (**figura 20**), estimulando aparentemente a atividade da urease (**figura 16**). Para as folhas tratadas com PEG 30%, o padrão do conteúdo de uréia (**figura 20**) seguiu o mesmo padrão de comportamento da atividade da urease (**figura 16**).

De maneira similar à dosagem de uréia, o conteúdo absoluto de amônio vai diminuindo em direção ao ápice da folha tanto no tratamento com PEG 30% quanto no controle (**figura 21**). No ápice foliar, tanto as folhas submetidas ao déficit hídrico quanto as do controle, apresentaram uma queda no conteúdo de amônio na primeira hora após fornecida a uréia, seguida de um leve incremento e finalmente, estabilizando os valores entre 6 e 8 $\mu\text{g NH}_4^+\text{g}^{-1}\text{ MS}$ até o final do fotoperíodo. Esses valores foram ligeiramente superiores aos encontrados no ciclo endógeno sem fornecer uréia. Na porção mediana observou-se, também, um incremento no teor de amônio para ambos os tratamentos quando comparado ao ritmo de amônio endógeno (sem fornecer uréia) (**figuras 9 e 21**). A porção mediana das folhas-controle, apresentou um incremento até a quarta hora após ter fornecido a uréia (chegando a valores próximos a 14 $\mu\text{g NH}_4^+\text{g}^{-1}\text{ MS}$), seguida de uma queda até o final do fotoperíodo (atingindo valores ao redor de 8 $\mu\text{g NH}_4^+\text{g}^{-1}\text{ MS}$). Já a porção mediana de folhas em PEG, tiveram um comportamento diferente ao da porção mediana de folhas-controle, variando o conteúdo de amônio entre 10 e 14 $\mu\text{g NH}_4^+\text{g}^{-1}\text{ MS}$, finalmente no final da fase clara há uma queda no teor de amônio atingindo os mesmos valores das folhas-controle.

Por outro lado, a porção basal apresentou um padrão de resposta muito similar ao do ritmo endógeno de amônio (sem ter fornecido a uréia) (**figura 9**)

para ambos os tratamentos, entretanto, os valores de amônio registrados após fornecida a uréia chegam a ser em torno de 10 vezes maiores comparativamente aos do ritmo endógeno (**figura 21**).

Figura 20: Dosagem de uréia nas diferentes porções de folhas destacadas de *Vriesea gigantea* na fase clara. Os tempos de coleta indicam horas após fornecida a uréia, sendo os

mesmos pontos do semiciclo da atividade da urease. Os asteriscos indicam diferenças significativas segundo o teste T-Student em nível de 5%.

Figura 21: Dosagem de amônio nas diferentes porções de folhas destacadas de *Vriesea gigantea* na fase clara. Os tempos de coleta indicam horas após fornecida a uréia, sendo os mesmos pontos do semiciclo da atividade da urease. Os asteriscos indicam diferenças significativas segundo o teste T-Student em nível de 5%.

IV.5.5.3. Semiciclo de dosagens de uréia e amônio nas folhas destacadas de *Vriesea gigantea* durante a fase escura

De maneira similar aos teores de uréia e amônio registrados na fase clara, na fase escura foi possível observar, também, uma diminuição nos valores absolutos de uréia e amônio ao longo da folha em direção ao ápice (**figuras 22 e 23**). Na porção apical observou-se um aumento no conteúdo de uréia no ponto de coleta das 7 horas nas folhas-controle, momento no qual a atividade da urease é baixa, o que ocasionaria provavelmente este acúmulo. Por outro lado, a porção apical das folhas em PEG apresentaram um padrão de conteúdo de uréia (**figura 22**) muito similar ao padrão de atividade da urease (**figura 17**), comportamento encontrado também para a porção mediana das folhas-controle e tratamento.

A porção basal do controle, por sua vez, incrementou consideravelmente os teores de uréia, evidenciados a partir da quarta hora. Provavelmente parte desse aumento pode ser explicado pelo incremento na absorção de uréia que é mais evidente a partir desse horário (**figura 19**). Já uma menor absorção de uréia nas folhas sob déficit hídrico, juntamente com uma atividade da urease relativamente constante ao longo da fase escura, explicariam os teores quase inalterados de uréia nesse tratamento (**figura 22**).

É interessante ainda observar que as folhas-controle apresentaram um acúmulo de amônio na fase escura nas três porções estudadas (**figura 23**). Dadas as baixas atividades de urease registradas para essas folhas durante o período escuro (**figura 17**), esses resultados poderiam indicar que o amônio possuiria um efeito inibitório sobre a atividade da urease.

Figura 22: Dosagem de uréia nas diferentes porções de folhas destacadas de *Vriesea gigantea* na fase escura. Os tempos de coleta indicam horas após fornecida a uréia, sendo os mesmos pontos do semiciclo da atividade da urease. Os asteriscos indicam diferenças significativas segundo o teste T-Student em nível de 5%.

Figura 23: Dosagem de amônio nas diferentes porções de folhas destacadas de *Vriesea gigantea* na fase escura. Os tempos de coleta indicam horas após fornecida a uréia, sendo os mesmos pontos do semiciclo da atividade da urease. Os asteriscos indicam diferenças significativas segundo o teste T-Student em nível de 5%.

IV.6. Detecção citoquímica do CO₂

Como etapa final desta dissertação, buscou-se citolocalizar do CO₂ proveniente da hidrólise da urease, podendo valer como mais um indicativo da sua possível utilização pela planta. De acordo com os resultados atualmente obtidos, os quais mostraram um aumento muito significativo da atividade da urease à noite quando fornecida a uréia às folhas mantidas sob déficit hídrico, procurou-se determinar se o CO₂ gerado pela atividade da urease seria utilizado pela planta. Então, uma vez fornecida uréia (5 mM) às folhas destacadas e mantidas por oito dias em PEG 30% (déficit hídrico) e em água (controle) no período noturno, os ápices foliares foram coletados após 7 horas (momento no qual foi observado uma maior diferença das atividades da urease - **figura 17**), realizando-se a reação de citolocalização do CO₂ neles.

Como explicado no item III.8 material e métodos, a técnica de citolocalização do CO₂ proveniente da urease consistiu em submeter o material vegetal coletado à reação da urease, dando livre movimentação na célula ao CO₂ que estava sendo gerado. Depois o material foi tratado com CoCl₂, o qual reagiu com o CO₂, precipitando-o (formando carbonato de cobalto), desta maneira pode se conhecer o possível destino de utilização desse composto. Posteriormente o material foi tratado com (NH₄)₂S o qual reagiu com o carbonato de cobalto (o CO₂ precipitado), formando um composto eletro-denso que pode ser visualizado no microscópio eletrônico de transmissão. Visando garantir que o CO₂ analisado foi oriundo da atividade da urease, foi feito um controle da reação de citolocalização, o qual consistiu na não colocação de uréia na etapa de reação da urease, impedindo dessa forma, a geração de CO₂.

Nos resultados obtidos (**figura 24**) observou-se que tanto nos ápices de folhas-controle quanto nos de folhas sob déficit hídrico foi possível citolocalizar o CO₂ proveniente da ação da urease. Entretanto, foi possível detectar uma maior quantidade de CO₂ nos ápices de folhas sob déficit hídrico, nos locais próximos à parede celular (**figura 24B e G**), ao redor dos cloroplastos (**figura 24B, D e G**) e nos espaços intercelulares (**figura 24H**). Os maiores níveis de CO₂ precipitado nos ápices de folhas sob déficit hídrico podem ser devidos às maiores atividades de urease registradas para esse período de coleta (7 horas após fornecida a uréia-

figura 17). Nos ápices das folhas-controle foi possível citolocalizar o CO₂ ao redor dos cloroplastos e microvacúolos (**figura 24A e C respectivamente**). Também foi observado o CO₂ precipitado em vesículas de transporte próximas à parede celular (**figura 24E**) e no espaço intercelular (**figura 24F**).

Com objetivo de confirmar que o CO₂ citolocalizado era oriundo da ação da urease, foi feito o controle da reação (explicado anteriormente), demonstrando que não houve precipitação do CO₂ ao redor dos cloroplastos, nos espaços intercelulares ou próxima das paredes celulares nem nos ápices de folhas do tratamento nem do controle (**figura 25**).

Figura 24: Citolocalização química do CO_2 por microscopia eletrônica de transmissão no tecido do ápice foliar. Folhas bem hidratadas (controle) tratadas com 5 mM de uréia na fase escura e coletadas 7 horas depois de ter fornecido a uréia, foram coletadas e o ápice foliar foi incubado em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), contendo 100 mM de uréia e 10 mM de CoCl_2 (A,C,E,F). Folhas mantidas por 8 dias em PEG 30%, sendo no último dia fornecida 5 mM de uréia na fase escura, as folhas foram coletadas 7 horas depois do fornecimento da uréia, sendo o ápice incubado em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), contendo 100 mM de uréia e 10 mM de CoCl_2 (B,D,G,H). As setas brancas indicam o CO_2 precipitado proveniente da hidrólise da uréia. Es: Espaço intercelular, Cl: Cloroplasto, V: Vacúolo.

Figura 25: Controle da reação de citolocalização química do CO_2 no tecido do ápice foliar, a reação enzimática ocorreu na ausência de uréia. Folhas bem hidratadas (controle) tratadas com 5 mM de uréia na fase escura e coletadas 7 horas depois de ter fornecido a uréia, foram coletadas e o ápice foliar foi incubado em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 10 mM de CoCl_2 (A, C). Folhas mantidas por 8 dias em PEG 30%, sendo no último dia fornecida 5 mM de uréia na fase escura, as folhas foram coletadas 7 horas depois do fornecimento da uréia, sendo o ápice incubado em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 10 mM de CoCl_2 (B,D). As setas brancas indicam a ausência de CO_2 precipitado. *Cl*:Cloroplasto.

V. DISCUSSÃO

A falta d'água mostra-se como um fator muito eficiente para limitar a entrada de CO₂ nas plantas (CHAVES et al., 2003; LAWLOR & CORNIC, 2002; CHERNYAD'EV, 2005) e, adicionalmente, é capaz de induzir ou intensificar a expressão do CAM em certas espécies (MAXWELL et al., 1994; WINTER et al., 2008; FRESCHI et al., 2010a, 2010b). Segundo os resultados obtidos por FRESCHI et al. (2010a) em *Guzmania monostachia*, uma bromélia epífita C₃-CAM facultativa, sete dias de suspensão de rega foram suficientes para induzi-la ao CAM. Soma-se a isso outros estudos realizados em nosso laboratório, com a mesma bromélia, que mostraram que ao manter as folhas destacadas por sete dias em PEG 6000 30%, um efeito similar era observado na expressão do CAM quando comparada à planta inteira (MIOTO, 2011).

Entretanto, atualmente não existem trabalhos empregando a bromélia *Vriesea gigantea*, visando caracterizar seu metabolismo fotossintético, tanto em condições de déficit hídrico quanto em condições hídricas favoráveis. Também não se conhece o efeito do PEG 6000 30% sobre as folhas destacadas. Por essa razão, foi realizado um primeiro teste (**Tabela 1**) para avaliar o efeito do destacamento da folha e do PEG 30% na imposição do déficit hídrico. Apesar do fato de destacar a folha ter ocasionado uma queda na assimilação de CO₂ (A_{max}) e no ponto de saturação luminosa (PSL) para os tratamentos com PEG 30% e com água (controle), quando comparados com a folha da planta inteira, elas foram capazes de se manter fotossinteticamente ativas durante oito dias, o que valida o modelo experimental usado neste trabalho, ou seja, a folha destacada continua a ter condições de fazer fotossíntese mesmo que com uma capacidade menor de A_{max}, comparativamente à folha ligada à planta-mãe. Já o efeito do PEG nas folhas destacadas foi efetivo no fechamento dos estômatos, evidenciado pela alta respiração (R_d) e baixa A_{max}.

Uma vez validado o material de estudo (folha destacada) e as condições para a limitação do CO₂ à folha (por deficiência hídrica -PEG 30%), foi necessário caracterizar o estado fotossintético e hídrico das folhas quando expostas por 8 dias ao PEG. Desta maneira, teria-se um melhor conhecimento do estado metabólico

das folhas quando analisadas as dinâmicas da enzima urease. Adicionalmente, devido à falta de conhecimento sobre o efeito do déficit hídrico e a possível intensificação ou indução do CAM nas folhas de *Vriesea gigantea*, esses dados seriam de grande importância para o entendimento do metabolismo fotossintético das bromélias epífitas-tanque.

Estudos anteriores têm demonstrado a existência de uma forte divisão de funções ao longo da folha de bromélias, evidenciada tanto nos aspectos fisiológicos (ZOTZ *et al.*, 2002; POPP *et al.*, 2003; FRESCHI *et al.*, 2010a; MIOTO, 2011; TAKAHASHI & MERCIER, 2011) quanto anatômicos (TAKAHASHI *et al.*, 2007). No presente trabalho observou-se que a disponibilidade hídrica também exerceu uma forte influência sobre o tipo de comportamento fotossintético apresentado ao longo da folha de *V. gigantea*. Constatou-se que folhas destacadas e mantidas em PEG 30% por oito dias, apresentaram uma significativa perda de água em todas suas porções (apical, mediana e basal) (**figura 2**). De maneira interessante, a base foliar é a porção mais succulenta e ao mesmo tempo foi a que perdeu mais água com o déficit hídrico, chegando a perder cerca de 60% do seu conteúdo hídrico. Entretanto, ao contrário da porção basal, as porções mediana e apical apresentaram uma menor diminuição no teor de água.

Foi sugerido para folhas de *Guzmania monostachia* um possível transporte de água da base para o ápice foliar (FRESCHI *et al.*, 2010a; MIOTO, 2011), garantindo, assim as funções metabólicas nessa região. Acredita-se que nesse processo exista a participação de aquaporinas, as quais são canais protéicos de transporte de água que facilitariam o transporte de água entre os tecidos (KJELLBOM *et al.*, 1999), uma vez que, sob condições de déficit hídrico observou-se uma maior expressão de certas isoformas de aquaporinas (em arroz-LIAN *et al.*, 2004; *Arabidopsis thaliana*-ALEXANDERSSON *et al.*, 2005; e *Mesembryanthemum crystallinum*- VERA-ESTRELLA *et al.*, 2012). Dessa maneira, esses canais poderiam auxiliar no transporte de água para outras regiões da folha por meio do aumento da condutividade hidráulica, mesmo em condições de baixo fluxo xilemático causado pela baixa transpiração decorrente do fechamento estomático causado pelo déficit hídrico. Outro indicio que sugere o transporte de água da porção basal para a apical nas folhas de *V.gigantea* pode ser visualizado ao comparar as **figuras 15 e 14**. Nessa última figura, após 6 horas de exposição ao PEG, observa-se nas

folhas uma perda de água similar para todas as porções (10% de perda). Entretanto, quando expostas por 8 dias ao PEG observa-se que a região basal foi a que sofreu uma redução mais forte no teor de água, sugerindo que de fato poderia existir o transporte de água em direção ao ápice.

Adicionalmente, poderia se pensar que ao expor as folhas ao PEG, esse padrão de perda de água fosse exclusivamente uma resposta ao PEG. Entretanto, ao analisar o conteúdo hídrico de folhas de *V. gigantea* na natureza, nas épocas de chuva e seca (**figura 26-Anexo**), observou-se um padrão similar de redução de água nas porções foliares analisadas quando comparadas ao efeito do PEG, demonstrando que as respostas nas dinâmicas de perda de água quando utilizado o PEG 30% como estratégia para induzir a deficiência hídrica, não são devidas a um artefato do uso do PEG.

Além disso, cabe salientar que a principal resposta de uma planta submetida ao déficit hídrico é o fechamento estomático, evitando uma maior perda de água através da transpiração (LAWLOR, 1995). Como consequência a difusão de CO₂ dentro da folha se restringe, ocasionando uma diminuição da concentração interna de CO₂ e limitando a fotossíntese (CORNIC *et al.*, 1992), como observado na **tabela 1** (diminuição da Amax) e **figura 6B**. As taxas de assimilação diminuem com a redução do conteúdo hídrico relativo da planta. Sob condições de déficit hídrico que ocasionam uma queda máxima no conteúdo hídrico relativo de 100% para 75% a assimilação de CO₂ é comprometida principalmente pela diminuição na condutância estomática e não por perturbações nos processos bioquímicos, como a diminuição da síntese de ATP ou ribulose bisfosfato (RuBP) (LAWLOR & CORNIC, 2002). A condição anteriormente descrita pode ser revertida aumentando as concentrações externas de CO₂, o que gera um aumento na concentração interna de CO₂, indicando que é o estômato o principal limitador da assimilação do CO₂ sob condições de deficiência hídrica moderada (ROBREDO *et al.*, 2007; LAWLOR & CORNIC, 2002; CORNIC, 2000; CORNIC *et al.*, 1992). Nos resultados obtidos nesta pesquisa, observamos que as folhas submetidas à escassez de água perdem por volta de 10% e 24% do conteúdo relativo de água na porção mediana e apical, respectivamente (**figura 2**), induzindo o fechamento estomático e a diminuição da assimilação de CO₂ (**figura 6B e tabela 1**). Esses resultados corroboram fortemente a observação que em condições de déficit hídrico moderado a baixa

assimilação de CO₂ é devida ao fechamento estomático. Condições onde o déficit hídrico diminui o conteúdo hídrico de 100% para menos de 75%, a assimilação de CO₂ já não é mais comprometida pelo fechamento dos estômatos e sim pelas perturbações nos processos bioquímicos, já que, mesmo aumentando as concentrações de CO₂ a assimilação de CO₂ não é recuperada (LAWLOR & CORNIC, 2002). Valores de conteúdo hídrico relativo abaixo de 50%, a assimilação de CO₂ não é mais observada na maioria das plantas (HUCHZERMEYER & KOYRO, 2005).

Embora a porção basal das folhas submetidas à escassez de água tenha sofrido uma diminuição considerável no seu teor relativo de água (perda de 60% de água) (**figura 2**), as implicações na fotossíntese dessa porção podem não ter um impacto tão forte quando comparadas às possíveis implicações na porção mediana ou apical da folha, mais vinculadas com processos fotossintéticos (FRESCI *et al.*, 2010a, TAKAHASHI & MERCIER, 2011; ZOTZ *et al.*, 2002). Na porção basal da folha a alta densidade de tricomas e o acúmulo de água do tanque nessa região sugerem que a principal função é a de absorver nutrientes e água (BENZING, 2000) e não a de assimilação de CO₂, corroborado também pela baixa densidade de estômatos, clorofila e amido encontrada nessa região foliar (TAKAHASHI *et al.*, 2007; TAKAHASHI & MERCIER, 2011).

Sabe-se que a imposição do déficit hídrico possui uma grande influência sobre a abundância e a regulação de determinadas enzimas envolvidas no metabolismo de ácidos orgânicos, carboidratos e nas funções de transporte intracelular (CUSHMAN & BORLAND, 2002). Neste estudo, observou-se que o déficit hídrico também causou mudanças metabólicas na porção apical da folha, evidenciado pelo incremento na expressão da PEPC acompanhado pelo acúmulo noturno de citrato e malato (**figura 3 e 5**), sugerindo um aumento na expressão da fotossíntese CAM. Embora não se tenham encontrado enzimas exclusivas necessárias para facilitar a transição de um estado metabólico fotossintético para outro (CUSHMAN & BORLAND, 2002), a maioria dos estudos tem-se focado no papel da PEPC durante a indução do CAM, já que esta é a enzima mais abundante em plantas CAM e participa na regulação dos padrões circadianos de fixação de CO₂ e síntese de malato (NIMMO, 2000).

Neste trabalho observou-se que a região apical da folha foi sempre a que apresentou as maiores atividades tanto de PEPC quanto de MDH,

comparativamente às outras regiões (**figura 3 e 4**). Esses resultados são coerentes, tendo em vista que esta é uma região que possui uma maior capacidade de modulação da atividade fotossintética (FRESCHI *et al.*, 2010a). Comparando esses resultados com aqueles obtidos por FRESCHI *et al.* (2010a) e MIOTO (2011) com *Guzmania monostachia*, as atividades de MDH e PEPC que as folhas de *Vriesea gigantea* apresentaram na porção apical quando expostas ao PEG são consideravelmente menores, indicando que a resposta de expressão do CAM em *V. gigantea* é relativamente mais fraca.

Como mencionado anteriormente a porção apical das folhas mantidas em PEG por oito dias acumularam, noturnamente, malato e citrato. A participação deste último na dinâmica do CAM não está bem entendida, entretanto, o acúmulo noturno de citrato parece não estar associado com um ganho líquido de CO₂ armazenado (LÜTTGE, 2006). Porém, foi proposto que o acúmulo de citrato no período noturno pode incrementar a capacidade tamponante do vacúolo, que ajudaria a aumentar a capacidade de armazenamento de ácidos (FRANCO *et al.*, 1992), enquanto que a descarboxilação do citrato durante o dia poderia ajudar a aliviar a fotoinibição em plantas CAM, através do aumento da concentração do CO₂ no mesofilo (HAAG- KERWER *et al.*, 1996).

Outro aspecto muito importante no acúmulo de ácidos orgânicos é que esses podem incrementar a pressão osmótica na folha, mantendo assim, o status hídrico e permitindo também, a remobilização de água a partir de outros tecidos (SMITH & LÜTTGE, 1985). Dessa maneira, o acúmulo de ácidos orgânicos em resposta à limitação de água representa um possível mecanismo de ajuste osmótico, representando uma possível adaptação à escassez de água nas plantas CAM.

De modo interessante, as porções mediana e basal das folhas-controle apresentaram acúmulo diurno de malato, enquanto que somente a porção mediana de folhas sob deficiência hídrica acumulou diurnamente citrato e malato (**figura 5**). Como descrito por MARTINOIA & RENTSCH (1994), o malato que é um intermediário do ciclo de Krebs, pode ser acumulado durante o dia para ser utilizado como energia respiratória à noite. Entretanto, estudos paralelos realizados nesta dissertação mostraram a capacidade de folhas destacadas de *Vriesea gigantea* em condições hídricas favoráveis em acumular malato durante a

noite nas porções mediana e basal (dados não apresentados). Essa possível incoerência nos resultados poderia ser decorrente do transporte de ácidos entre as porções ou dos momentos de coleta do material que poderiam não refletir os pontos de maior e menor acúmulo do ácido. Para esclarecer melhor esta questão, seria necessária a quantificação de ácidos orgânicos ao longo do ciclo diuturno e o estudo de transporte desses compostos ao longo da folha. Adicionalmente, o fato dessas folhas possuírem a capacidade de acumular ácidos orgânicos durante a noite quando bem hidratadas, poderia mostrar a competência desse tecido em expressar o CAM-cycling, levando em consideração que as folhas, quando bem hidratadas, fazem trocas gasosas típicas de uma planta C_3 (**figura 6A**), enquanto armazenariam ácidos orgânicos no período noturno. De maneira interessante, quando estudadas as folhas de *Vriesea gigantea* mantidas em condições naturais, foi visto que as folhas na época de chuva, quando as essas encontravam-se em condições bem hidratadas (**figura 26-Anexo**), acumularam mais malato durante a noite do que na época de seca para ambas as porções apical e mediana (**figura 27-anexo**), demonstrando que mesmo na natureza sob condições hídricas favoráveis essas plantas apresentam a capacidade de expressar CAM.

Estudos feitos por ZOTZ *et al.* (2002) evidenciaram que é a porção apical das folhas da bromélia *Vriesea sanguinolenta* a principal região responsável pela atividade fotossintética, quando comparada com a base foliar. Entretanto, a **figura 6A** mostra que é a porção mediana a que assimilou maior quantidade de CO_2 . Esses resultados poderiam ser devidos ao ângulo de inclinação da folha da *Vriesea gigantea*, permitindo que a porção mediana interceptasse maior quantidade de luz.

Os resultados de ácidos orgânicos, atividade das enzimas PEPC e MDH e as trocas gasosas indicaram que a porção apical das folhas destacadas de *Vriesea gigantea* quando expostas à escassez da água alterou seu metabolismo para um estado CAM-idling. Nesse tipo de metabolismo fotossintético os estômatos encontram-se sempre fechados (**figura 6B**) e o acúmulo de ácidos à noite (**figura 5**) seria decorrente da utilização do CO_2 produzido pela respiração. O CAM-idling é considerado um tipo de CAM extremo que pode ser encontrado em espécies que estão sob déficit hídrico, sendo um metabolismo que não permite o ganho de matéria seca (crescimento), já que os estômatos não se abrem nem de dia nem de noite, evitando a transpiração mas também impedindo a captura de CO_2 .

atmosférico (LÜTTGE, 2004). Cabe salientar que a porção apical foi a que apresentou as maiores atividades da PEPC, uma característica que pode ser muito importante, já que auxiliaria no aumento da expressão do CAM quando as folhas foram submetidas ao déficit hídrico, sendo, então, a porção apical a única que passaria a expressar o CAM-idling.

É importante analisar a fotossíntese C_3 e CAM sob o ponto de vista evolutivo: acredita-se que a fotossíntese CAM se originou a partir de um ancestral C_3 , podendo existir na natureza formas de fotossíntese que abrangeriam desde o tipo C_3 até o tipo CAM (SILVERA *et al.*, 2010). Entretanto, os nomes de CAM-cycling, CAM-clássico ou CAM-idling são somente meras classificações didáticas para explicar o tipo de fotossíntese da planta, podendo existir muitos mais dentro desse contínuo C_3 -CAM.

Uma mudança metabólica entre dois tipos de fotossíntese similar àquela de *Vriesea gigantea* já foi verificada em folhas maduras de *Peperomia camptotricha*, que no seu estado bem hidratado apresentaram um tipo de fotossíntese CAM intermediário entre C_3 e CAM-cycling. Porém, quando submetidas à deficiência de água mudam seu comportamento para CAM-idling (SIPES & TING, 1985).

Como discutido acima, fica ainda por esclarecer que tipo de fotossíntese realizariam as porções mediana e basal de folhas de *V. gigantea* mantidas em condições bem hidratadas. Muito provavelmente essas folhas possuem um tipo de fotossíntese muito próxima ao CAM-cycling, já que numa planta com fotossíntese C_3 não seria de se esperar observar uma variação de acidez ao longo do dia. Isto último, foi constatado por VERA-ESTRELLA *et al.* (2012) em folhas de *Mesembryanthemum crystallinum* (uma planta C_3 -CAM facultativa) as quais, quando analisadas no seu estado C_3 , de fato, não apresentaram variações no seu conteúdo de malato, pH e atividade de PEPC.

Contudo, os resultados obtidos são de grande importância, já que nunca antes tinha sido feita a caracterização fotossintética das folhas de *Vriesea gigantea* tanto em condições de boa hidratação quanto de deficiência hídrica, sendo que, até então, pensava-se que essa bromélia era uma espécie que apresentava fotossíntese C_3 constitutivamente.

Uma vez analisado o estado fotossintético das folhas submetidas durante 8 dias ao PEG ou em água, continuou-se a analisar as dinâmicas da enzima urease

quando 5 mM de uréia era fornecida. Entretanto, para entender as mudanças na atividade da urease foi necessário conhecer inicialmente o ciclo endógeno (sem fornecer uréia às folhas) desta enzima. Notou-se que nas três porções foliares estudadas a atividade da urease era constitutiva, sendo que o perfil observado para ambos as condições (controle e PEG) seguiu uma tendência muito similar ao longo do ciclo tanto na porção apical quanto na mediana. Entretanto, a base foliar mostrou uma atividade significativamente maior comparada às outras porções, sendo que nas folhas-controle essa atividade foi maior àquela das folhas submetidas ao PEG (**figura 7**). Tendo em vista que a base da folha é a principal porção que sofre o déficit hídrico, isto se refletiria provavelmente nas atividades enzimáticas desta região. O fato de *V. gigantea* apresentar endogenamente atividades de urease tão altas na sua região basal poderia ser consequência da elevada preferência que possui pela uréia. INSELBACHER *et al.* (2007) observaram a alta eficiência que tem esta bromélia em absorver a uréia, apresentando um perfil que não segue a cinética típica de Michaelis-Menten, isto é, mesmo em altas concentrações (10 mM) a absorção de uréia continuou alta (não se saturou). Nesse mesmo trabalho, hipotetizou-se que essa bromélia teria a capacidade de secretar urease no tanque para o rápido aproveitamento da mesma. Esse poderia ser um mecanismo, além da expressão constitutiva da urease, que lhe permitiria utilizar rapidamente a uréia quando esse composto nitrogenado estivesse disponível no tanque da planta.

Por outro lado, quando analisados os teores endógenos de uréia, observou-se que as diferenças significativas no acúmulo noturno de uréia entre o controle e o tratamento com PEG (**figura 8**) para todas as porções, parecem não estar diretamente relacionadas com as atividades endógenas de urease, uma vez que não houve diferenças significativas na atividade entre o controle e o tratamento com PEG (**figura 7**), indicando que a atividade da urease poderia não ser o único fator que influenciaria no acúmulo de uréia. Notou-se, também, que no período das 3 às 6 horas, quando a atividade da urease diminuiu, o teor endógeno de uréia também caiu. Isso não era esperado, tendo em vista que a atividade da urease é responsável por hidrolisar a uréia em amônio e CO₂. De forma similar, não era esperado que no período das 6 às 9 horas, quando a atividade da urease começou a aumentar (tanto para o controle quanto para o tratamento com PEG - **figura 7**), o conteúdo de uréia

endógena também aumentou (**figura 8**). Estes dados refletem que, de fato, as dinâmicas da urease não são as únicas responsáveis pelo padrão de acúmulo da uréia. Deve ser levado em consideração que a atividade da arginase, a enzima que hidrolisa a arginina em uréia e ornitina, também poderia influenciar nos teores endógenos de uréia, além das dinâmicas de acúmulo no vacúolo que influenciariam a atividade da urease.

Mesmo assim, apesar da atividade da urease ser constitutiva em todas as porções foliares ao longo do dia, observou-se um fenômeno bastante interessante: nas três porções foliares ocorreu um aumento no teor endógeno de uréia no final da noite, que drasticamente desapareceu no começo do dia, sem que isso se refletisse em um aumento no teor endógeno de amônio (**figura 9**). Provavelmente a uréia estaria sendo acumulada no vacúolo durante a noite, impossibilitando a ação da urease. Com o começo do dia a uréia seria liberada do vacúolo, permitindo sua rápida hidrólise e, conseqüentemente, a rápida assimilação do amônio gerado.

Também foi possível observar que os teores endógenos de amônio variaram relativamente pouco (**figura 9**). É de se esperar que a folha não possuísse teores elevados de amônio, já que esse composto tem um efeito tóxico para a planta, quando em alta concentração (BRITTO & KRONZUCKER, 2002). Entretanto, o controle, para todas as três porções foliares, apresentou níveis significativamente mais elevados quando comparados com o tratamento de déficit hídrico, principalmente no período claro. É difícil explicar o porquê dessas diferenças baseado unicamente nos dados das atividades da urease, uma vez que o amônio é um composto participante em inúmeros processos metabólicos, como na fotorrespiração e nas atividades das enzimas glutamina sintetase (GS), glutamato desidrogenase (GDH) e nitrito redutase (NiR).

Uma vez analisado o ciclo endógeno da urease, prosseguiu-se com a caracterização do efeito da uréia quando fornecida na fase clara ou na fase escura nas folhas mantidas em PEG por oito dias. Entretanto, surgiu uma preocupação sobre a capacidade da folha de absorver a uréia dissolvida no PEG, já que se desconhecia se esse composto interferiria ou não nesse processo. Dessa maneira, resolveu-se fazer um teste de absorção de uréia nas primeiras 6 horas após seu fornecimento às folhas (**figura 12**). Com resultados positivos, observou-se que o PEG permitiu a absorção da uréia, porém mais lentamente. Adicionalmente, foi

visto que nas primeiras 6 horas já havia uma diminuição significativa de aproximadamente 10% no conteúdo de água em todas as porções das folhas tratadas com PEG+ uréia (**figura 14**). Assim, assumiu-se que numa condição de déficit hídrico a corrente xilemática diminuiu devido ao fechamento dos estômatos, afetando a absorção. Por esta razão, não foi possível descartar que as diferenças de atividades enzimáticas observadas nas **figuras 16 e 17** sejam devidas, em parte, a uma menor entrada de uréia na folha. É interessante salientar que 6 horas após do fornecimento da uréia às folhas, ambos os tratamentos (controle e PEG, ambos com uréia) apresentaram um acúmulo de amônio na solução (**figura 13**), indicando que existe a hidrólise da uréia pelos microorganismos presentes na base da folha das bromélias e/ou a ação de ureases secretadas pela planta, como proposto por INSELSBACHER *et al.* (2007) e CAMBUÍ *et al.* (2009) para a bromélia *Vriesea gigantea*.

Quando fornecida a uréia na fase clara (**figura 16**), os valores encontrados na região apical de folhas destacadas e mantidas em água (controle) foram similares aos encontrados por TAKAHASHI & MERCIER (2011) em folhas de plantas adultas de *Vriesea gigantea* tratadas com 5 mM de uréia. Esses resultados demonstram que o fato de ter destacado as folhas não parece ter prejudicado a atividade da urease na porção apical da folha. Contudo, o fornecimento de uréia durante o período de luz parece ter implicações relevantes apenas na porção basal, já que ao comparar as atividades obtidas (**figura 16**) com as do ciclo endógeno (**figura 7**) tanto para o tratamento com PEG+uréia quanto para o tratamento de água+uréia (controle), só na porção basal observou-se um aumento na atividade da urease. As atividades da urease obtidas para a porção basal de folhas-controle, comparadas com aquelas mostradas no trabalho de TAKAHASHI & MERCIER (2011), foram consideravelmente mais elevadas, chegando a ser quase o dobro das obtidas naquela pesquisa. Essas diferenças em atividade, considerando que as condições experimentais foram praticamente as mesmas, só podem ser explicadas pela diferença de idade entre as plantas. Sendo que, neste presente trabalho foram utilizadas plantas de aproximadamente 10 anos de idade, enquanto no outro estudo elas tinham apenas 3 anos. É interessante salientar que a atividade de

urease de *Vriesea gigantea* da porção basal, aparentemente, foi mais influenciada pela ontogenia da planta do que a porção apical.

CAMBUÍ *et al.* (2009) quantificaram as atividades de urease das frações citoplasmática, da membrana celular e da parede celular em plantas *in vitro* de *Vriesea gigantea*. Mesmo somando a atividade de urease de todas as frações, não chega a ser mais de $5 \mu\text{g NH}_4^+ \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{MF}^{-1}$, valor muito inferior ao encontrado em plantas adultas, o que demonstra mais uma vez a importância da idade da planta sobre a atividade da urease, parecendo a princípio que, à medida que a planta cresce e forma um tanque maior, a atividade da urease aumenta consideravelmente. As altas atividades encontradas na porção basal quando fornecida a uréia poderiam refletir uma grande importância ecológica que a uréia poderia ter nessa fase do desenvolvimento. ROMERO *et al.* (2010) demonstraram que o anfíbio *Scinax hayii*, o qual costuma visitar durante o dia o tanque da bromélia *Vriesea bituminosa* na procura de abrigo, contribuiu com suas excretas (uréia) um 27,7% do nitrogênio total da planta. Adicionalmente, foi constatado um melhor crescimento da *Vriesea gigantea* quando crescida *in vitro* na presença de uréia (ENDRES & MERCIER, 2001). Portanto, quando fornecida a uréia no tanque da *Vriesea gigantea*, a planta estaria pronta para aproveitar rapidamente essa fonte orgânica de nitrogênio. Os resultados aqui apresentados, juntamente com as evidências mencionadas anteriormente, confirmam a grande importância dessa fonte para as bromélias com tanque, sendo, aparentemente, a porção basal a mais comprometida com sua absorção.

No entanto, quando fornecida a uréia na fase escura, ao contrário da resposta dos tratamentos no semiciclo na fase clara, onde não ocorreram mudanças significativas no que diz respeito ao ciclo endógeno, a resposta encontrada para os tratamentos na fase escura foi extremamente interessante. Foi notável o forte incremento da atividade de urease na porção apical no período de escuro nas folhas submetidas a déficit hídrico por PEG 30% (**figura 17**). Pelas atividades da urease obtidas no tratamento de déficit hídrico, a uréia parece ter implicações fisiológicas importantes. Levando em consideração que especificamente para esse material de estudo, a porção apical aumentou a atividade da PEPC e apresentou acúmulo noturno de ácidos orgânicos, resultando aparentemente num aumento da expressão do metabolismo fotossintético CAM,

CO₂, além do atmosférico, passaria a ter grande importância, como aquela que fornece a uréia ao ser hidrolisada. Então, no período noturno, onde as enzimas do CAM encontram-se ativas e a uréia encontra-se disponível para a planta, a atividade da urease passaria a ter de grande utilidade, considerando que se está fornecendo à planta não somente nitrogênio, mas também CO₂. As folhas-controle (porção apical e mediana da folha), por outro lado, apresentaram atividades menores que as encontradas no ciclo endógeno e, mesmo com o fornecimento de uréia, observou-se uma queda progressiva na atividade da urease.

Adicionalmente, na porção basal, de modo geral, os valores absolutos das atividades aumentaram quando comparados aos do ciclo endógeno, mas não tão drasticamente quanto na fase clara. Essas diferenças no perfil de resposta da atividade da urease quando a uréia é fornecida na fase clara ou na fase escura, aparentemente sugerem que a hidrólise da uréia nas três porções da folha está sendo influenciada pela luz ou por outros fatores dependentes da luz e/ou talvez pelo próprio ritmo circadiano. Atualmente é escassa a informação sobre os mecanismos regulatórios da urease em plantas, uma vez que se conhece muito pouco sobre a estrutura enzimática, expressão e regulação de sua atividade. Os mecanismos de ação das ureases estão baseados em estudos feitos na planta *Canavalia ensiformis* (a primeira e única planta na qual foi cristalizada a estrutura protéica da urease) e em microrganismos. Devidas às similaridades estruturais da urease da *Canavalia ensiformis* com as ureases de microrganismos, quase todos os mecanismos de regulação propostos para plantas estão fundamentados nos mecanismos encontrados em bactérias.

Estudos feitos por BENDER *et al.* (2012) em diatomáceas crescidas em uréia (*Thalassiosira pseudonana*) demonstraram que a abundância dos transcritos da urease eram maiores durante a fase escura do que na fase clara, o que levaria a uma maior atividade da urease na fase escura. Cabe salientar que os mecanismos de regulação nas diatomáceas podem não ser os mesmos mecanismos presentes em plantas vasculares, entretanto esse trabalho com diatomáceas sugere que pode existir a regulação pela luz ou pelo ritmo circadiano em nível da expressão gênica que levaria a diferenças na atividade da urease.

Os resultados apresentados nas **figuras 16 e 17** mostram não somente que a atividade da urease poderia estar sendo regulada pela luz ou outros fatores

dependentes dela, mas também a urease seria regulada de maneira diferencial ao longo da folha. A porção basal, aparentemente, é a única porção que sofre um incremento considerável da atividade da urease quando exposta à uréia. Além disso, essa capacidade de ser induzida também parece ser influenciada pela luz, dadas as diferenças de atividade na porção basal na fase clara comparada com a fase escura. Foi observado por TAKAHASHI & MERCIER (2011), que após ter fornecido uréia no tanque da *Vriesea gigantea*, a atividade na porção apical não variou ao longo do tempo mesmo após 48 horas, diferentemente da porção basal. Essa potencialidade da base em responder à presença da uréia diferencialmente às outras porções pode não ser somente devida à importância ecológica desenvolvida por essas plantas para aproveitar as excretas dos anfíbios, como discutido anteriormente, mas também à idade do tecido. Em bromélias, sabe-se que a base das folhas é mais jovem do que a porção apical devida à ação do meristema intercalar.

De maneira interessante quando fornecida a uréia na fase escura, a porção apical das folhas submetidas ao déficit hídrico foi a única porção que, além da base, respondeu com um incremento da atividade. Considerando que a atividade da urease fornece à planta CO_2 e NH_4^+ , este último deve ser assimilado rapidamente pela planta. Entretanto, a disponibilidade de esqueletos carbônicos representa uma limitação para que esse processo ocorra. Na porção apical submetida ao déficit hídrico verifica-se o acúmulo noturno de citrato e malato (provavelmente gerados em parte pela fixação do CO_2 proveniente da hidrólise da uréia), podendo ser utilizados como esqueletos carbônicos para a assimilação do NH_4^+ . Estes resultados sugerem que o amônio poderia estar, também, regulando a atividade da urease, já que sem a disponibilidade de esqueletos carbônicos o NH_4^+ se acumularia na célula e inibiria a atividade da urease (inibição por produto).

Devido ao fato de que a hidrólise da uréia somente pode acontecer pela ação de ureases (em um período curto de tempo), observou-se mais uma vez a capacidade das folhas da *Vriesea gigantea* em secretar ureases no meio e/ou a ação das ureases de microrganismos presentes nas folhas, evidenciado nos teores de amônio encontrados ao longo do tempo na solução dos boréis onde as folhas-controlas foram mantidas (**figuras 18 e 19**). De modo interessante, o tratamento com PEG 30% pareceu diminuir a ação das ureases dos microrganismos e/ou a

secreção das ureases da planta, já que observaram-se teores significativamente menores de amônio na solução dos boréis comparados àqueles encontrados para a solução dos que continham as folhas-controle em ambas as fases (clara e escura) estudadas. É possível que a presença de microrganismos na folha de *V. gigantea* possa contribuir com as atividades de urease encontradas. Entretanto, acredita-se que a maior parte das atividades enzimáticas registradas foram devidas principalmente às ureases da planta. Lamentavelmente, não há trabalhos que demonstrem o quanto esses microrganismos contribuiriam para a atividade da urease encontrada nas plantas sendo, para tanto, necessários estudos que permitam conhecer essa contribuição.

Quando analisados os teores endógenos de uréia e amônio na fase clara, quando fornecida a uréia (**figuras 20 e 21**), nem sempre foi possível explicar os teores desses compostos a partir das atividades da urease, já que existe a participação de outras enzimas que podem influenciar nos resultados obtidos, como discutido anteriormente, para as dosagens de uréia e amônio nos pontos de coleta do ciclo endógeno da urease (**figuras 8 e 9**). Entretanto, a análise das dosagens de uréia e amônio permite conhecer como era a condição do tecido naquele momento. Os dados obtidos na dosagem de uréia por TAKAHASHI & MERCIER (2011) na base de folhas de plantas bem hidratadas de *Vriesea gigantea* de 3 anos de idade, regadas com a mesma concentração de uréia usada neste trabalho, mostraram valores seis vezes inferiores àqueles encontrados neste estudo (**figura 20-base**). Tal diferença pode ser reflexo da capacidade metabólica e/ou de absorção dessas folhas frente à uréia.

Como discutido anteriormente, a idade da planta parece ter, também, uma influencia direta na atividade da urease. De maneira similar à dosagem de uréia, o conteúdo absoluto de amônio vai diminuindo em direção ao ápice da folha tanto no tratamento com PEG 30% quanto no controle (**figura 21**). Por outro lado, a porção basal apresentou um padrão de resposta muito similar ao do ritmo endógeno de amônio (sem fornecimento de uréia) (**figura 9**) para ambos os tratamentos. Entretanto, os valores de amônio registrados após fornecida a uréia chegam a ser em torno de 10 vezes maiores comparativamente aos do ritmo endógeno (**figura 21**). Devido ao alto teor de uréia registrado para essa porção basal junto com as atividades da urease era de se esperar encontrar altos valores de amônio. Cabe

salientar, que na porção basal os teores de amônio, uréia e urease das folhas submetidas ao déficit hídrico foi consideravelmente menor do que as folhas-controle. Nestas últimas, o conteúdo de amônio chegou ser até 3 vezes maior comparado com os dados obtidos por TAKAHASHI & MERCIER (2011).

De maneira interessante, os teores de uréia e amônio na fase escura, podem ser mais diretamente explicados a partir das atividades de urease obtidas para essa fase, talvez porque à noite a disponibilidade de esqueletos carbônicos ou a atividade das enzimas de assimilação de nitrogênio possam estar diminuídos. Geralmente, as enzimas de assimilação de nitrogênio localizam-se no cloroplasto, sendo estas reguladas pela luz (LAM *et al.*, 1995) ou por processos ligados à fotossíntese. Portanto, na fase escura os níveis de uréia e amônio poderiam refletir mais a ação da urease do que a ação de outras enzimas que possam interferir nos níveis desses compostos, como as enzimas de assimilação de nitrogênio. Pouco se conhece sobre o efeito regulatório do amônio na atividade da urease em plantas. Já em bactérias, foi visto que a urease de *Saccharopolyspora erythraea* foi reprimida pelo NH_4^+ devido ao efeito inibitório que esse íon possui sobre a síntese da urease (FLORES, 1996). O padrão de acúmulo observado nas folhas destacadas de *V. gigantea*, inverte-se no final do período escuro, acompanhado por um ligeiro aumento nas atividades da urease. Cabe ressaltar que se o amônio for de fato o principal regulador da atividade da urease no período escuro, ele teria um efeito inibitório diferencial ao longo da folha, isto é, agindo mais fortemente nas porções apical e mediana do que na basal, refletindo-se nas atividades de urease obtidas (**figura 17**). De maneira intrigante, o ápice das folhas sob déficit hídrico, mesmo apresentando um acúmulo de amônio na fase escura, não diminuiu a atividade da urease. Considerando que nessa condição o ápice apresentou um metabolismo fotossintético do tipo CAM-idling (**figuras 5 e 6**), o acúmulo de ácidos orgânicos decorrente da fixação do CO_2 proveniente da respiração e da atividade da urease, poderia ser utilizado também como fonte de esqueletos carbônicos para a assimilação de NH_4^+ . Ou seja, a falta de capacidade das folhas-controle em assimilar o NH_4^+ produzido nesta fase faz com que este tenha um efeito inibitório na atividade da urease, situação que não é observada no ápice das folhas em déficit hídrico. Já a porção mediana das folhas mantidas em PEG não teria a capacidade de acumular ácidos orgânicos à noite capazes de auxiliar a assimilação do NH_4^+ ali

contido (**figura 23**), apresentando então, um efeito inibitório da atividade da urease (**figura 17**). Por sua vez, o teor de amônio da região basal das folhas mantidas em PEG manteve-se constante ao longo da fase escura da mesma maneira que a atividade da urease.

Para confirmar a importância da uréia não somente como fonte de nitrogênio, mas também de carbono para a planta, realizou-se o ensaio de citolocalização do CO₂ (proveniente da hidrólise da uréia). Como hipotetizado nesta dissertação, foi possível visualizar uma maior quantidade de CO₂ nos ápices de folhas sob déficit hídrico, nos locais próximos à parede celular (**figura 24B e G**), ao redor dos cloroplastos (**figura 24B, D e G**) e nos espaços intercelulares (**figura 24H**). Os maiores níveis de CO₂ precipitado nos ápices de folhas sob déficit hídrico podem ser devidos às maiores atividades de urease registradas para esse período de coleta (7 horas após fornecida a uréia- **figura 17**).

Já foi demonstrado por CAMBUÍ *et al.* (2009) a localização da urease nas frações citoplasmática, de membrana celular e parede celular em plantas *in vitro* de *Vriesea gigantea*, através da técnica de anticorpos anti-urease e por citolocalização química. Portanto, é coerente encontrar o CO₂ nos espaços intercelulares e em locais próximos à parede celular, indicando um possível transporte do CO₂ para dentro das células. Por outro lado, o CO₂ presente dentro das células pode ser fixado pela PEPC para a formação de ácidos orgânicos nos ápices das folhas em déficit hídrico (já que nesta condição o ápice das folhas apresenta CAM-idling). A presença tanto no tratamento quanto no controle de CO₂ ao redor dos cloroplastos poderia indicar outro mecanismo de concentração de CO₂ que evitaria em parte a atividade oxigenase da Rubisco, isto é, quando fornecida a uréia, um dos principais locais do CO₂ situaria-se perto dos cloroplastos aumentando assim, as concentrações de CO₂ ao redor do cloroplasto. Devido às amostras terem sido coletadas no período noturno, acredita-se que parte do CO₂ proveniente da urease ficou acumulada em volta dos cloroplastos e com o início do período luminoso uma maior concentração de CO₂ próxima do cloroplasto reduziria a ação oxigenase da Rubisco, e portanto, a fotorrespiração.

Adicionalmente, como observado por LAWLOR & CORNIC (2002), os efeitos na diminuição da assimilação de CO₂ decorrentes de um déficit hídrico moderado podem ser aliviadas por aumentos na concentração interna de CO₂ na planta. Outra

vantagem da planta ter uma alta afinidade pela uréia, além de poder utilizar esta como fonte tanto de carbono quanto de nitrogênio, é que a hidrólise da uréia aumentaria as concentrações internas de CO₂ mitigando os efeitos do déficit hídrico. Numa condição onde a *Vriesea gigantea* é submetida a condições intermitentes de água no seu ambiente natural, sua afinidade pela uréia poderia representar uma adaptação à sobrevivência nesses ambientes.

Como discutido anteriormente, sob condições de déficit hídrico as plantas podem acumular diferentes tipos de solutos compatíveis, dentre desses o aminoácido prolina é um dos mais amplamente estudados. Esse aminoácido é biosintetizado a partir de L-glutamato com gasto de ATP e NADPH. Entretanto, outra rota de biosíntese também seria possível a partir do aminoácido ornitina (HUCHZERMEYER & KOYRO, 2005). Este último participa do ciclo da uréia e é gerado a partir da arginina pela ação da arginase (LEHNINGER et al., 2005). Estudos do nosso laboratório com folhas de *Vriesea gigantea* adultas demonstraram que a atividade da arginase foi maior na porção apical da folha (TAKAHASHI, 2008). É provável que numa situação de déficit hídrico a arginase forneceria não somente uréia (a qual seria hidrolisada para gerar CO₂), mas também ornitina, que geraria prolina que, então, aliviaria os efeitos decorrentes do déficit hídrico.

Finalmente, a uréia ofereceria mais uma vantagem à planta, fornecendo esqueletos carbônicos (disponibilizando o CO₂ proveniente da sua hidrólise) ao mesmo tempo que o nitrogênio. A assimilação do nitrogênio proveniente de outras fontes que não a uréia, como, por exemplo, o nitrato, vê-se comprometida pela falta de esqueletos carbônicos disponíveis, numa situação onde a assimilação de CO₂ é limitante para a planta (CAM-idling).

Mesmo que mais estudos sejam necessários para confirmar essas evidências, os resultados aqui apresentados sugerem a grande importância decorrente que o uso da uréia pode ter para a fisiologia das bromélias com tanque.

VI. CONCLUSÕES

De acordo ao dados obtidos neste trabalho, é possível tirar algumas conclusões sobre a atividade da urease em folhas destacadas de *Vriesea gigantea* submetidas ao déficit hídrico:

- As folhas destacadas permaneceram fotossinteticamente ativas ao longo do período experimental.
- O uso de PEG 30% como estratégia para limitar a entrada do CO₂ pelos estômatos foi efetiva, durante a geração do déficit hídrico, como detectado nas análises de trocas gasosas feitas com o IRGA.
- O déficit hídrico causou a perda de água ao longo da folha, sendo ela maior na porção basal após 8 dias de exposição ao PEG.
- Detectou-se a mudança de metabolismo fotossintético para CAM-idling no ápice foliar, acompanhado pelo respectivo acúmulo noturno de ácidos orgânicos (citrato e malato) e aumento da atividade PEPC nesta porção. Por outro lado, as folhas isoladas quando bem hidratadas apresentaram um tipo de fotossíntese intermediário entre C₃ e CAM-cycling.
- A atividade endógena da urease (sem fornecimento de uréia) mostrou ser constitutiva nas três porções foliares estudadas, mesmo sob déficit hídrico.
- A urease pareceu ser regulada em diferentes níveis dependendo da região foliar e da fase do fotoperíodo (fase clara ou escura) quando fornecida a uréia.
- Na fase escura, o amônio parece ter um papel regulatório sobre a atividade da urease.
- Encontrou-se também um aumento significativo da urease na porção apical de folhas mantidas sob escassez da água, sugerindo uma possível utilização do CO₂ gerado pela hidrólise da uréia.

- A citolocalização do CO_2 , comprovou que houve um maior acúmulo de CO_2 nas células sob déficit hídrico, indicando a grande importância que o metabolismo da uréia pode ter na fisiologia de bromélias com tanque.

VII. RESUMO

A urease vem sendo cada vez mais caracterizada como uma enzima muito importante na hidrólise da uréia, fornecendo nitrogênio para a planta. Estudos anteriores realizados no Laboratório de Fisiologia Vegetal do IBUSP demonstraram a preferência da bromélia *Vriesea gigantea* pela absorção de uréia e a localização da urease nas membranas e citoplasma. Evidências recentes apontam também para uma possível utilização do carbono a partir da uréia, possivelmente explicando a grande afinidade que esta bromélia tem por esse composto nitrogenado. Essa capacidade da uréia fornecer também carbono à planta poderia desempenhar uma estratégia importante sob condições que limitam a entrada de CO₂ atmosférico pelos estômatos, como no caso da deficiência hídrica. Atualmente conhece-se muito pouco sobre o ciclo diurno da atividade da urease nas plantas e particularmente em folhas de *Vriesea gigantea* sob limitação de água. Imagina-se que numa condição de escassez d'água e, portanto, aumento do fechamento estomático, a uréia seria muito importante, tanto como fonte de nitrogênio (N) quanto de carbono. Isso acarretaria possivelmente numa preferência ainda maior por essa fonte orgânica de N na natureza.

Folhas destacadas de *Vriesea gigantea* foram submetidas ao déficit hídrico por polietilenoglicol (PEG) 6000 por 8 dias, para garantir a limitação da entrada de CO₂ por meio do fechamento estomático. Ao mesmo tempo, foram feitas análises nas diferentes porções foliares (ápice, mediana e base) do teor relativo de água, de ácidos orgânicos e das atividades das enzimas fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) e malato desidrogenase (MDH), visando caracterizar se houve aumento da expressão do CAM durante o estabelecimento do déficit hídrico. Também foi fornecida uréia dissolvida na solução de PEG como fonte nitrogenada, e o ciclo de atividade da urease foi comparado aos resultados obtidos onde as folhas estiveram numa condição hídrica favorável (uréia dissolvida em água). Foi feita também a localização intracelular do CO₂ (gerado pela atividade dessa enzima) por meio de reação específica de precipitação do CO₂, cuja visualização foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão.

Após 8 dias de escassez hídrica, o teor de água da região basal das folhas caiu significativamente, ao contrário das regiões mediana e apical, sendo que a

adição de uréia no oitavo dia na solução não alterou esse padrão. Após o período de oito dias de exposição ao PEG, a porção apical mostrou um aumento significativo na atividade PEPC e acúmulo noturno de citrato e malato, sendo esse último o principal ácido acumulado. Esses resultados indicaram que a porção apical de folhas destacadas pode aumentar a expressão do CAM quando submetida à falta d'água. Adicionalmente, os resultados obtidos para as folhas mantidas em solução de PEG mostraram um aumento significativo da atividade da urease na porção apical no período noturno. Conjuntamente observou-se um maior acúmulo do CO₂ proveniente da quebra da uréia nas regiões próximas aos cloroplastos, vacúolos e paredes, indicando que provavelmente o gás carbônico esteja sendo utilizado. Numa condição em que o CO₂ é um fator limitante para a planta, a uréia poderia ser de grande importância ecofisiológica. Portanto, sugere-se que a uréia além de ser uma fonte nitrogenada, seja também uma fonte de carbono para as bromélias com tanque.

Palavras-chave: urease, fotossíntese CAM, uréia, bromélia, CO₂

VIII. ABSTRACT

Urease is a very important enzyme in the hydrolysis of urea, providing nitrogen to the plant. Previous studies developed in our Laboratory-IBUSP showed the preference of the epiphytic tank-bromeliad, *Vriesea gigantea*, for urea as a nitrogen source, and the localization of urease in the plasma membranes and cytoplasm of leaf cells. Recent evidences obtained also in our laboratory suggested a possible use of the CO₂ generated by hydrolysis of urea. Even with these results, it is not known yet if in a water shortage situation the plant would possess an even higher preference for urea (reflected by an increase of urease activity), as in this situation the stomata are closed and the influx of atmospheric CO₂ into the plant is limited. The analyses were made in three different leaf portions: apex, middle and basal. With the aim of characterizing the photosynthetic state of the leaf, was measured the relative water content, nocturnal organic acid storage, and enzymatic activities of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) and malate dehydrogenase (MDH). In addition, after 8 days of drought (by exposure to a solution containing 30% of polyethylene glycol - PEG), the detached leaves were treated with urea, and the urease activity and CO₂ accumulation by cytolocalization were measured. The apical portion showed a significant increase of PEPC activity and nocturnal storage of citrate and malate, indicating that the apical portion is capable of increasing Crassulacean acid metabolism (CAM) expression under water shortage. In addition, in the apical portion of leaves kept in PEG and urea showed higher urease activities and CO₂ accumulation at night than the control. CO₂ buildup from urea hydrolysis was observed next to the chloroplasts and wall cells. Once in a limited CO₂ situation to the plant, as is that case of water shortage, the results presented in this survey suggest that urea would be a highly important nitrogen source in the ecophysiology of plants. Therefore, besides urea being a nitrogen source, it could also be a source of carbon at least for epiphytic tank-bromeliads.

Key-words: urease, CAM photosynthesis, urea, bromeliad, CO₂

IX. ANEXO

IX. 1. Conteúdo hídrico em folhas de *Vriesea gigantea* coletadas na USP

Após um mês de condições de seca, foram coletadas folhas de *Vriesea gigantea* provenientes da Rua Lineu Prestes na Universidade de São Paulo (USP) (Setembro de 2012). Posteriormente (Outubro de 2012), com a chegada das chuvas, foram coletadas, novamente, folhas de *V. gigantea* das mesmas plantas amostradas no mês anterior. Foi analisado o conteúdo hídrico para corroborar a perda de água diferencial ao longo da folha numa situação de déficit hídrico imposta naturalmente (**anexo 1**).

Figura 26: Conteúdo hídrico $\left(\frac{MF-MS}{MS} \times 100\right)$, das porções apical e mediana de folhas de *V.gigantea* coletadas na USP, na época de chuva e na de seca. Os asteriscos indicam diferenças significativas segundo o teste T-Student em nível de 5%.

Somente foi possível coletar as porções mediana e apical das folhas, já que queria-se evitar maiores danos à planta, tendo em vista que seriam novamente amostradas na época de chuva. Isto, juntamente com a morfologia compacta da roseta dificultaram a coleta da porção basal. Entretanto, observou-se que na época de seca, as porções apical e mediana perderam aproximadamente 18% e 23 % de água respectivamente.

IX. 2. Acúmulo noturno de ácidos orgânicos em folhas de *Vriesea gigantea* coletadas na USP

Juntamente com as análises de conteúdo hídrico feitos nos períodos de seca e chuva (Setembro e Outubro de 2012, respectivamente), foi quantificado o

acúmulo noturno dos ácidos orgânicos, citrato e malato, nas porções foliares mediana e apical (**anexo 2**).

Figura 27: Acúmulo noturno de citrato e malato expresso em $\Delta\mu\text{mol. g}^{-1}\text{MS}$, nas porções apical e mediana de folhas de *V.gigantea* coletadas na USP, na época de chuva e na de seca. Os asteriscos indicam diferenças significativas segundo o teste T-Student em nível de 5%.

Foi possível observar que tanto na época de chuva quanto na de seca a porção apical foi a que apresentou uma maior capacidade em acumular ácidos orgânicos durante a noite. De maneira interessante, em ambos os períodos as regiões mediana e apical acumularam noturnamente citrato e malato, indicando que nas duas situações as folhas expressaram algum grau de CAM. Na porção apical, o principal ácido acumulado durante a época de chuva foi o malato, enquanto que na época de seca foi o citrato. Já para a porção mediana, na época de chuva o delta de acidez foi maior do que na época de seca, acumulando-se tanto citrato quanto malato.

X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, P.; NELSON, D. E.; YAMADA, S.; CHMARA, W.; JENSEN, R. G.; BOHNERT, H. J.; GRIFFITHS, H. (1998). Growth and development of *Mesembryanthemum crystallinum* (Aizoaceae). *New phytologist*, 138 (2): 171-190.
- ALEXANDERSSON, E.; FRAYSSE, L.; SJÖVALL-LARSEN, S.; GUSTAVSSON, S.; FELLERT, M.; KARLSSON, M.; JOHANSON, U.; KJELLBOM, P.(2005). Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Molecular Biology*, 59: 469–84.
- AMORÓS, A.; ZAPATA, P.; PRETEL, M. T.; BOTELLA, M. A.; SERRANO, M. (2003). Physicochemical and physiological changes during fruit development and ripening of five loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cultivars. *Food Science and Technology International*. 9 (1): 43-51.
- BENDER, S. J.; PARKER, M. S.; ARMBRUST, E. V. (2012). Coupled Effects of Light and Nitrogen Source on the Urea Cycle and Nitrogen Metabolism over a Diel Cycle in the Marine Diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Protist*, 163: 232–251.
- BENZING, D. H. & RENFROW, A. (1974). The mineral nutrition of Bromeliaceae. *Botanical Gazette*. 135: 281-288.
- BENZING, D. H.; HENDERSON, K.; KESSEL, B.; SULAK, J. (1976). The absorptive capacities of bromeliad trichomes. *American Journal of Botany*, 63: 1009-1014.
- BENZING, D.H. (1989). The evolution of epiphytism. In: Vascular Plants as Epiphytes: Evolution and Ecophysiology, U. Lüttge, (Ed.), 76: 15–41, Springer-Verlag Berlin, Germany.
- BENZING, D.H. (1990). Vascular epiphytes, general biology and related biota. Ashton P.S. Cambridge, *Cambridge University Press*. UK
- BENZING, D.H. (2000). Bromeliaceae: profile of an adaptative radiation. Cambridge, *Cambridge University Press*. UK.
- BOHNERT, H. J. & CUSHMAN, J. C. (2000). The Ice Plant Cometh: Lessons in Abiotic Stress Tolerance. *Journal of Plant Growth Regulation*, 19: 334–346.
- BORLAND, A. M.; TÉCSI, L. I.; LEEGOOD, R. C.; WALKER, R. P. (1998). Inducibility of crassulacean acid metabolism (CAM) in *Clusia* species; physiological/biochemical characterization and intercellular localization of

- carboxylation and decarboxylation processes in three species which exhibit different degrees of CAM. *Planta*, 205(3): 342–351.
- BORLAND, A. M.; GRIFFITHS, H.; HARTWELL, J.; SMITH, J. A. C. (2009). Exploiting the potential of plants with crassulacean acid metabolism for bioenergy production on marginal lands. *Journal of Experimental Botany*, 60(10): 2879-2896.
- 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.
- BOTA, J.; FLEXAS, J.; MEDRANO, H. (2004). Is photosynthesis limited by decreased Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress?. *New Phytologist*, 162: 671–681.
- BRITTO, D. T. & KRONZUCKER, H. J. (2002). NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. *Journal of Plant Physiology*, 159: 567–584.
- CAMBUÍ, C. A. (2009). Absorção e assimilação de uréia pela bromélia epífita com tanque *Vriesea gigantea*. Tese. Instituto de Biociências IBUSP. São Paulo. Brasil.
- CAMBUI, C. A.; GASPAR, M.; MERCIER, H. (2009). Detection of urease in the cell wall and membranes from leaf tissues of bromeliad species. *Physiologia Plantarum*, 136: 86-93.
- CHAPIN, F. S. III.; MOILAINEN, L.; KIELLAND, K. (1993). Preferential use of organic nitrogen by a nonmicorrhizal arctic sedge. *Nature*, 361: 150-153.
- CHAVES, M. M.; MAROCO, J. P.; PEREIRA, J. S. (2003). Understanding plant response to drought: from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, 30: 239–264.
- CHERNYAD'EV, I. I. (2005). Effect of Water Stress on the Photosynthetic Apparatus of Plants and the Protective Role of Cytokinins: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41(2): 115–128.
- CORNIC, G.; GHASHGHAIE, J.; GENTY, B.; BRIANTAIS, J. M. (1992) Leaf photosynthesis is resistant to a mild drought stress. *Photosynthetica*, 27: 295-309.

- CORNIC, G. (2000). Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture not by affecting ATP synthesis. *Trends in Plant Science*, 5(5): 187-188.
- CRAYN, D. M.; WINTER, K.; SMITH, J. A. C. (2004). Multiple origins of Crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the Neotropical family Bromeliaceae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(10): 3703-3708.
- CUEVAS, I. C. & PODESTA, F. E. (2000). Purification and physical and kinetic characterization of an NAD⁺-dependent malate dehydrogenase from leaves of pineapple (*Ananas comosus*). *Physiologia Plantarum*, 108: 240-248.
- CUSHMAN, J. C. & BOHNERT, H. J. (1999). Crassulacean acid metabolism: Molecular genetics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50: 305-332.
- CUSHMAN, J. C.; BORLAND, A. M. (2002). Induction of Crassulacean acid metabolism by water limitation. *Plant, Cell & Environment*, 24: 31-40.
- 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.
- DRENNAN, P. M. & NOBEL, P. S. (2000). Responses of CAM species to increasing atmospheric CO₂ concentrations. *Plant, Cell & Environment*, 23: 767-781.
- ENDRES, L. & MERCIER, H. (2001). Influence of nitrogen forms on the growth and nitrogen metabolism of bromeliads. *Journal of Plant Nutrition*, 24(1): 29-42.
- FLORES, M. E. (1996). Nitrogen regulation of urease synthesis in *Saccharopolyspora erythraea* ATCC 11365. *FEMS Microbiology Letters*, 139: 57-62.
- FRANCO, A. C.; BALL, E.; LÜTTGE, U. (1992). Differential effects of drought and light levels on accumulation of citric and malic acids during CAM in *Clusia minor*. *Plant, Cell & Environment*, 15: 821-829.
- FRESCHI, L.; TAKAHASHI, C. A.; CAMBUÍ, C. A.; SEMPREGOM, M. T. R.; CRUZ, A. B.; MIOTO, P. T.; VERSIEUX, L. M.; CALVENTE, A.; LATANSIO-AIDAR, S. R.; AIDAR, M. P. M.; MERCIER, H. (2010a). 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.

- FRESCHI, L.; RODRIGUES, M. A.; DOMINGUES, D. S.; PURGATTO, E.; VAN-SLUYS, M-A.; MAGALHAES, J. R.; KAISER, W. M.; MERCIER, H. (2010b). Nitric Oxide Mediates the Hormonal Control of Crassulacean Acid Metabolism Expression in Young Pineapple Plants. *Plant Physiology*, 154(4): 1971-1985.
- GALLUCI, E.; MICELLI, C.; LIPPE, C. (1971). Non-electrolyte permeability across thin lipid membranes. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*, 79: 881-887.
- GASPAR, M.; BOUSSER, A.; SISOËFF, I.; ROCHE, O.; HOARAU, J.; MAHE, A. (2003). Cloning and characterization of ZmPIP1-5b, an aquaporin transporting water and urea. *Plant Science*, 165: 21-31.
- GERENDÁS, J. & SATTELMACHER, B. (1997). Significance of Ni supply for growth, urease activity and the concentrations of urea, amino acids and mineral nutrients of urea grow plants. *Plant Soil*, 190: 153-162.
- HAAG-KERWER, A.; GRAMS, T. E. E.; OLIVARES, E.; BALL, E.; ARNDT, S.; POPP, M.; MEDINA, E.; LÜTTGE, U. (1996). Comparative measurements of gas exchange, acid accumulation and chlorophyll a fluorescence of different species of *Clusia* showing C₃-photosynthesis or crassulacean acid metabolism (CAM) at the same field site in Venezuela. *New Phytologist*, 134: 215-226.
- HARTUNG, W.; WILKINSON, S.; DAVIES, W. J. (1998). Factors that regulate abscisic acid concentrations at the primary site of action at the guard cell. *Journal of Experimental Botany*, 49: 361-367.
- HASEGAWA, P. N.; FARIA, A. F.; MERCADANTE, A. Z.; CHAGAS, E. A.; PIO, R.; LAJOLO, F. M.; CORDENUNSI, B. R.; PURGATTO, E. (2010). Chemical composition of five loquat cultivars planted in Brazil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30 (2): 552-559.
- 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.
- HOGAN, M. E.; SWIFT, I. E.; DONE, J. (1983). Urease assay and ammonia release from leaf tissues. *Phytochemistry*, 22: 663-667.

- HUCHZERMEYER, B.; KOYRO, H.W. (2005). Salt and drought stress effects on photosynthesis. In: PESSARAKLI, M. Handbook of Photosynthesis. 2^o ed. CRC Press. Tucson, Arizona.
- INSELSBACHER, E.; CAMBUI, C. A.; RICHTER, A.; STANGE, C. F.; MERCIER, H.; WANEK, W. (2007). Microbial activities and foliar uptake of nitrogen in the epiphytic bromeliad *Vriesea gigantea*. *New Phytologist*, 175(2): 311-320.
- KIELLAND, K. (1994). Amino acid absorption by arctic plants: implications for plant nutrition and nitrogen cycling. *Ecology*, 75(8): 2373-2383.
- KJELLBOM, P.; LARSSON, C.; JOHANSSON, I.; KARLSSON, M.; JOHANSON, U. (1999). Aquaporins and water homeostasis in plants. *Trends in Plant Science*, 4(8): 308-314.
- KRAJEWSKA, J. (2009). Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59: 9-21.
- KUSANO, T.; YAMAGUCHI, K.; BERBERICH, T.; TAKAHASHI, Y. (2007). Advances in polyamine research. *Journal of Plant Research*, 120: 345-350.
- LAM, H. M.; COSCHIGANO, K.; SCHULTZ, C.; MELO-OLIVEIRA, J.; TJADEN, G.; OLIVEIRA, I. NGAI, N.; HSIEH, M. H.; CORUZZI, G. (1995). Use of Arabidopsis Mutants and Genes To Study Amide Amino Acid Biosynthesis. *The Plant Cell*, 7: 887-898.
- LAM, H. M.; COSCHIGANO, K. T.; OLIVEIRA, I. C.; MELO-OLIVEIRA, R.; CORUZZI, G. M. (1996). The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47:569-593.
- LAWLOR, D. W. (1995). The effect of water deficit on photosynthesis. Environmental and plant metabolism. BIOS Scientific publishers, pp. 129-160. Oxford.
- LAWLOR, D.W. & CORNIC, G. (2002). Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell & Environment*, 25: 275-294.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. (2005). Lehninger Principles of Biochemistry. Chapter 18. Amino Acid Oxidation and the Production of Urea. 4^o ed. W.H. Freeman and Company. New York, USA.

- LIAN, H-L.; XIN, Y.; QIN, Y.; DING, X-S.; KITAGAWA, Y.; KWAK, S-S.; SU, W-A.; TANG, Z-C. (2004). The role of aquaporin RWC3 in drought avoidance in rice. *Plant and Cell Physiology*, 45(4): 481-489.
- LIU, L. H.; LUDEWIG, U.; FROMMER, W. B.; VON WIRÉN, N. (2003a). AtDUR3 Encodes a New Type of High-Affinity Urea/H⁺ Symporter in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 15: 790-800.
- LIU, L. H.; LUDEWIG, U.; GASSERT, B.; FROMMER, W. B.; VON WIRÉN, N.(2003b). Urea transport by nitrogen-regulated tonoplast intrinsic proteins in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 133: 1220-28.
- LOPEZ, L. C. S.; RODRIGUES, P. J. F. P.; RIOS, R. I. (1999). Frogs and snakes as phoretic dispersal agents of bromeliad ostracods (Limnocytheridae: Elpidium) and annelids (Naididae: Dero). *Biotropica*, 31: 705-708.
- LÜTTGE, U. (2004). Ecophysiology of Crassulacean Acid Metabolism (CAM). *Annals of Botany*, 93: 629-652.
- LÜTTGE, U. (2006). Photosynthetic flexibility and ecophysiological plasticity : questions and lessons from *Clusia*, the only CAM tree, in the neotropics. *New phytologist*, 171(1): 7-25.
- MARSCHNER, H. (1995). Mineral nutrition of higher plants. Second edition. Academic Press London.
- MARTINOIA, E.; RENTSCH, D. (1994). Malate compartmentation- responses to a complex metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 45: 447-467.
- MAXWELL, C.; GRIFFITHS, H.; YOUNG, A. J. (1994). Photosynthetic acclimation to light regime and water stress by the C₃-CAM epiphyte *Guzmania monostachia*: gas-exchange characteristics, photochemical efficiency and the xanthophyll cycle. *Functional Ecology*, 8: 746-754.
- MCCULLOUGH, H. (1967). The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clinica Chimica Acta*. 17(2): 297-304.
- 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. *Functional Ecology*, 8: 298-305.

- MERCIER, H.; KERBAUY, G. B.; SOTTA, B.; MIGINIAC, E. (1997). Effects of NO_3^- , NH_4^+ and urea nutrition on endogenous levels of IAA and four cytokinins in two epiphytic bromeliads. *Plant Cell & Environment*, 20(3):387-392.
- MÉRIGOUT, P.; LELANDIS, M.; BITTON, F.; RENOU, J-P.; BRIAND, X.; MEYER, C.; DANIEL-VEDELE, F. (2008). Physiological and Transcriptomic Aspects of Urea Uptake and Assimilation in Arabidopsis Plants. *Plant Physiology*, 147: 1225-1238.
- MILLANES, A. M.; FONTANIELLA, B.; GARCIA, M. L.; SOLAS, M. T.; VICENTE, C.; LEGAZ, M. E. (2004). Cytochemical location of urease in cell wall of two different lichen phycobionts. *Tissue and Cell*, 36: 373-377.
- MIOTO, P. T. (2011). Sinalização da indução do metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) por Ácido abscísico e óxido nítrico em *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae). Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, SP. Brasil.
- NÄSHOLM, T.; KIELLAND, K.; GANETEG, U. (2009). Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytologist*, 182: 31-48.
- NIEVOLA, C. C.; MERCIER, H.; MAJEROWICZ, N. (2001). Uréia: uma possível fonte de nitrogênio orgânico para as bromélias com tanque. *Bromélia*, 3: 44-48.
- NIEVOLA, C. C.; KRAUS, J. E.; FRESCHI, L.; SOUZA, B. M.; MERCIER, H. (2005). Temperature determines the occurrence of CAM or C_3 photosynthesis in pineapple plantlets grown in vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41: 832-837.
- NIMMO, H. G. (2000). The regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in CAM plants. *Trends in Plant Science*, 5(2): 75-80.
- PITTENDRIGH, C. S. (1948). The bromeliad-Anopheles-malaria complex in Trinidad. I-The bromeliad flora. *Evolution*, 2: 58-89. Em: Lüttge, U. 1989. Vascular plants as epiphytes. Evolution and Ecophysiology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 112-115. Germany.
- POLACCO, J. C.; HOLLAND, M. A. (1993). Roles of urease in plant cells. *International Review of Cytology-a Survey of Cell Biology*, 145: 65-103.
- POPP, M.; JANETT, H.P.; LÜTTGE, U.; MEDINA, E. (2003). Metabolite gradients and carbohydrate translocation in rosette leaves of CAM and C_3 bromeliads. *New Phytologist*, 157: 649-656.

- ROBREDO, A.; PEREZ-LÓPEZ, U.; SAINZ DE LA MAZA, H.; GONZALEZ-MORO, B.; LACUESTA, M.; MENA-PETITE, A.; MUNOZ-RUEDA, A. (2007). Elevated CO₂ alleviates the impact of drought on barley improving water status by lowering stomatal conductance and delaying its effects on photosynthesis. *Environmental and Experimental Botany*, 59: 252–263.
- ROMERO, G. Q.; MAZZAFERA, P.; VASCONCELLOS-NETO, J.; TRIVELIN, P. C. O. (2006). Bromeliad-living spiders improve host plant nutrition and growth. *Ecology*, 87(4): 803-808.
- ROMERO, G. Q.; VASCONCELLOS-NETO, J.; TRIVELIN, P. C. O. (2008). Spatial variation in the strength of mutualism between a jumping spider and a terrestrial bromeliad: Evidence from the stable isotope ¹⁵N. *Acta Oecologica*, 33(3): 380–386.
- ROMERO, G. Q.; NOMURA, F.; GONÇALVES, A. Z.; DIAS, N. Y. N.; MERCIER, H.; CONFORTO, E. C.; ROSSA-FERES, D. C. (2010). Nitrogen fluxes from treefrogs to tank epiphytic bromeliads: an isotopic and physiological approach. *Oecologia*, 162: 941–949.
- SAKAI, W. S.; SANDFORD, W. G. (1980). Ultrastructure of the water-absorbing trichomes of pineapple (*Ananas comosus*, Bromeliaceae). *Annals of Botany*, 46: 7-11
- SAMPAIO, J. A. T.; ZANELLA, C. M.; GOETZE, M.; PAGGI, G. M.; BRUXEL, M.; BÜTTOW, M. V.; BERED, F.; PALMA-SILVA, C. (2012). Inbreeding depression in *Vriesea gigantea*, a perennial bromeliad from southern Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 169: 312–319.
- SCHIMEL, J. P. & CHAPIN, F. S. III. (1996). Tundra plant uptake of amino acid and NH₄⁺ nitrogen *in situ*: Plants compete well for amino acid N. *Ecology*, 77: 2141-2147.
- SILVERA, K.; SANTIAGO, L. S.; CUSHMAN, J. C. ; WINTER, K. (2009). Crassulacean Acid Metabolism and Epiphytism Linked to Adaptive Radiations in the Orchidaceae. *Plant Physiology*, 149(4): 1838-1847.
- SILVERA, K.; NEUBIG, K. M.; WHITTEN, M.; WILLIAMS, N. H.; WINTER, K.; CUSHMAN, J. C. (2010). Evolution along the Crassulacean acid metabolism continuum. *Functional Plant Biology*, 37(11): 995-1010.

- SIPES, D. L. & TING, I. P. (1985). Crassulacean Acid Metabolism and Crassulacean Acid Metabolism Modifications in *Peperomia camptotricha*. *Plant Physiology*, 77: 59-63.
- SIRKO, A. & BRODZIK, R. (2000). Plant ureases: roles and regulation. *Acta Biochimica Polonica*, 47: 1189-1195.
- SMITH, J.A.C. & LÜTTGE, U. (1985). Day-night changes in leaf water relations associated with the rhythm of crassulacean acid metabolism in *Kalanchoë diagremontiana*. *Planta*, 163: 272-282.
- SUNG, F. J. M. & KRIEG, D. R. (1979). Relative sensitivity of photosynthetic assimilation and translocation of ¹⁴carbon to water stress. *Plant Physiology*, 64: 852-856.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. (2009). Fisiologia Vegetal. 4 ed. Artmed. Brazil.
- TAKAHASHI, 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. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19 (2): 119-126.
- TAKAHASHI, C. A. (2008). Localização da assimilação do nitrogênio em diferentes regiões foliares em uma bromélia epífita com tanque. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, SP. Brasil.
- TAKAHASHI, C.A. & MERCIER, H. (2011). Nitrogen metabolism in leaves of a tank epiphytic bromeliad: Characterization of a spatial and functional division. *Journal of Plant Physiology*, 168: 1208-1216.
- TODD, C. D.; TIPTON, P. A.; BLEVINS, D. G.; PIEDRAS, P.; PINEDA, M.; POLACCO, J. C. (2006). Update on ureide degradation in legumes. *Journal of Experimental Botany*, 57: 5-12.
- TOMLINSON, P. B. (1969). Anatomy of monocotyledons. iii Commelinales-Zingiberales. *Oxford University Press*. Em: Lüttge, U. (1989). Vascular plants as epiphytes. Evolution and Ecophysiology. Ed Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 112-115. Germany.
- VERA-ESTRELLA, R.; BARKLA, B. J.; AMEZCUA-ROMERO, J. C.; PANTOJA, O. (2012). Day/night regulation of aquaporins during the CAM cycle in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant, Cell & Environment*, 35: 485-501.
- WANG, W. H.; KÖHLER, B.; CAO, F. Q.; LIU, L. H. (2008). Molecular and physiological aspects of urea transport in higher plants. *Plant Science*, 175: 467-477.

- WEATHERBURN, M. W. (1967). Phenol-Hypochlorite Reaction for Determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, 39: 971-974.
- WIETH, J. O.; FUNDER, J.; GUNN, R. B.; BRAHM, J. (1974). Passive transport pathways for chloride and urea through the red cell membrane. In: Comparative Biochemistry and Physiology of Transport. Bolis, K., Bloch, K., Luria, S.E., Lynen, F., eds. pp. 317–337. Elsevier/North- Holland, Amsterdam
- WILSON, M. R.; O'DONOGHUE, S. I.; WALKER, N. A. (1988). The transport and metabolism of urea in *Chara australis*: III. Two specific transport systems. *Journal of Experimental Botany*, 39: 763–774.
- WINKLER, R. G.; BLEVINS, D. G.; POLACCO, J. C.; RANDALL, D. D. (1988). Ureide catabolism in nitrogen-fixing legumes. *Trends Biochemical Science*, 13: 97-100.
- WINTER, K.; ARANDA, J.; HOLTUM, J. A. M. (2005). Carbon isotope composition and water use efficiency in plants with crassulacean acid metabolism. *Functional Plant Biology*, 32: 381-388.
- 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(7): 1829–1840.
- WITTE, C. P.; ROSSO, M. G.; ROMEIS, T. (2005). Identification of three urease accessory proteins that are required for urease activation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 139, 1155–1162.
- ZAMBELLI, B.; MUSIANI, F.; BENINI, S.; CIURLI, S. (2011). Chemistry of Ni²⁺ in Urease: Sensing, Trafficking, and Catalysis. *Accounts of Chemical Research*, 44(7): 520–530.
- ZOTZ, G.; REICHLING, P.; VALLADARES, F. (2002). A simulation study on the importance of size-related changes in leaf morphology and physiology for carbon gain in an epiphytic bromeliad. *Annals of Botany*, 90: 437-443.