Bruno Nobuya Katayama Gobará

Participação do ácido abscísico como mediador de respostas do metabolismo e desenvolvimento foliar em *Guzmania monostachia* sob restrição hídrica.

Participation of abscisic acid as a mediator of metabolism responses and leaf development in *Guzmania monostachia* under water restriction.

São Paulo

2019

Bruno Nobuya Katayama Gobara

Participação do ácido abscísico como mediador de respostas do metabolismo e desenvolvimento foliar em *Guzmania monostachia* sob restrição hídrica.

Participation of abscisic acid as a mediator of metabolism responses and leaf development in *Guzmania monostachia* under water restriction.

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Helenice Mercier

São Paulo

2019

RESUMO

A disponibilidade hídrica é um dos mais importantes fatores abióticos capazes de modular o metabolismo e o desenvolvimento das plantas. Acredita-se que no ambiente epifítico, o impacto da escassez hídrica possa ser ainda mais decisivo no metabolismo e desenvolvimento foliar de bromélias que vivem nesse habitat, uma vez que não possuem raízes para exploração do solo, sendo as folhas os principais órgãos vegetativos dessas plantas. O ácido abscísico (ABA) é um dos hormônios que frequentemente está relacionado à mediação de respostas morfofisiológicas com importância adaptativa em plantas sob condições ambientais desfavoráveis ao crescimento, como na deficiência hídrica. Bromélias que apresentam plasticidade fotossintética, como a espécie C₃-CAM facultativa, *Guzmania monostachia*, podem ser consideradas um bom modelo para estudos de efeitos de estresses ambientais. Entretanto, ainda pouco se conhece sobre como a disponibilidade hídrica pode interferir nos fatores metabólicos e na ontogenia foliar, alterando o crescimento das folhas dessa bromélia e se o ácido abscísico teria papel importante na sinalização de alterações morfofisiológicas. Diante disso, o presente trabalho visou investigar a influência da restrição hídrica a longo prazo sobre o crescimento e o desenvolvimento de plantas jovens de *Guzmania monostachia*, avaliando a possível participação do ácido abscísico como indutor de respostas morfofisiológicas, do metabolismo fotossintético e do desenvolvimento foliar. Para tanto, plantas jovens de *G. monostachia* foram submetidas a tratamento de limitação hídrica por até 120 dias. Ao longo do tratamento, as folhas dessa bromélia foram divididas em três grupos: folhas jovens, intermediárias e maduras, as quais foram subdivididas em duas porções, uma clorofilada (partes apical + mediana) e outra basal. Esses grupos foliares foram avaliados quanto ao seu “status” hídrico e condições fisiológicas, por meio das análises de teor relativo de água, fluorescência da clorofila, condutância estomática, acidez titulável e expressão do gene *PPC1* de CAM. O desenvolvimento e a morfologia foram estimados por meio de medidas da taxa relativa de crescimento foliar, área foliar total, área da região basal e densidade estomática. A participação do ABA nos eventos morfofisiológicos, de fotossíntese e de desenvolvimento foram inferidos por meio de sua quantificação endógena e da avaliação da expressão de alguns genes mais relevantes da rota de biossíntese (*NCED*), sinalização (*PYL8* e *SAPK10*) e resposta (*AI5L5* e *SLAC1*) a esse hormônio. Os resultados mostraram que o efeito prolongado da limitação hídrica provocou uma forte diminuição do teor hídrico foliar, assim como uma redução nos

parâmetros de fluorescência de clorofila, indicando perturbações no aparelho fotossintético causados pelo estresse hídrico. Morfologicamente, houve um aumento da densidade estomática no decorrer do tratamento de restrição hídrica. Além disso, houve reduções das áreas foliar total, da região basal e da taxa relativa de crescimento, prejudicando a expansão e desenvolvimento foliar. Isto ocasionou um atraso do desenvolvimento heteroblástico dessa bromélia, isto é, a formação do tanque foi afetada negativamente. A limitação hídrica induziu também a expressão do CAM e uma grande limitação da condutância estomática se estabeleceu em todos os grupos foliares. Com base nos dados bioquímicos e de expressão gênica, foi visto que o principal gene de síntese de ABA, o *NCED*, aumentou o número de transcritos, coincidindo com o incremento no teor de ABA, nas folhas do grupo jovem após 30 dias de tratamento e nas intermediárias aos 60 dias de restrição hídrica, aumentando também a expressão de *PEPC1* (gene que codifica para a enzima de CAM, a fosfoenlpiruvato carboxilase). O aumento de ABA endógeno em todos os grupos foliares ao longo do tratamento de limitação hídrica sugere um possível efeito inibitório desse hormônio sobre o crescimento e desenvolvimento foliar. Além disso, foi visto que as folhas jovens da roseta foram pouco sensíveis ao ABA, já que a expressão relativa dos genes da cascata de sinalização e de resposta ao ABA não se alterou após os 30 primeiros dias de deficiência hídrica. No entanto, com o passar do tempo, essa sensibilidade pôde ser adquirida em 60 dias em decorrência, possivelmente, da formação de novos estômatos durante esse período. Ontogeneticamente, as folhas intermediárias (G2), tiveram uma grande relevância na regulação metabólica de *G. monostachia*, já que mostraram sensibilidade ao ABA (maior transcrição de *PYL8* – receptor de ABA e de *SAPK10* – transdutor do sinal de ABA), apresentando certas respostas que estão envolvidas com o aumento da tolerância ao estresse hídrico, como, por exemplo, a forte redução na condutância estomática, coincidente com aumentos de transcritos de *SLAC1* (canais de fluxo lento de ânions) e de *AI5L5* (fator de transcrição ativador de gene responsivo ao ABA) e a realização da fotossíntese CAM, com aumento de transcritos de *PEPC1* (fosfoenlpiruvato carboxilase) em 60 dias de estresse hídrico. Por meio desse conjunto de modificações morfofisiológicas e das expressões gênicas estudadas aqui, observa-se que as plantas de *Guzmania monostachia*, submetidas a uma prolongada restrição de rega, são resilientes ao estresse hídrico, o que certamente favorece a sua ocorrência no ambiente epifítico.

ABSTRACT

Water availability is one of the most important abiotic factors that modulate plant metabolism and development. The impact of water scarcity may be even more decisive in the metabolism and leaf development of epiphytic bromeliads since these plants do not have roots for soil exploitation, while their leaves are the main vegetative organ. The abscisic acid (ABA) is one of the hormones often related to the morphophysiological adaptive responses of plants under unfavorable environmental conditions such as the water deficit. Bromeliads with photosynthetic plasticity, such as the C₃-CAM facultative species *Guzmania monostachia*, can be considered a good model for studies of the environmental stress effects. However, little is known about how water availability can affect metabolic factors and leaf ontogeny, altering the leaf growth and whether abscisic acid would play an important role in signaling morphophysiological changes. Thus, the present work aimed to investigate the influence of the long-term water restriction on the growth and development of young plants of *Guzmania monostachia*, evaluating the possible participation of abscisic acid as an inducer of morphophysiological responses, photosynthetic metabolism, and leaf development. To achieve these aims, young plants of *G. monostachia* were subjected to water limitation for up to 120 days. Throughout this period, bromeliad leaves were divided into three groups of young, intermediate and mature leaves, which were subdivided into two portions, the chlorophyll one (apical and middle) and the basal portion. Each leaf group had its water status and physiological conditions evaluated through the analysis of relative water content, chlorophyll fluorescence, stomatal conductance, titratable acidity and the gene expression of *PEPC₁* (the gene encoding the CAM enzyme phosphoenolpyruvate carboxylase). Leaf development and morphology were estimated by measurements of the relative growth rate, total leaf area, basal leaf area, and stomatal density. ABA participation in the morphophysiological, photosynthesis and developmental events were inferred by its endogenous quantification and expression of some genes involved in ABA biosynthesis (*NCED*), signaling (ABA receptor, *PYL8*; ABA signal transducer, *SAPK10*), and response (ABA-responsive gene activating transcription factor, *AI5L5*; slow-flowing anion channel, *SLAC1*). Our results showed that the prolonged water limitation caused a strong decrease in leaf water content, as well as a reduction in the chlorophyll fluorescence parameters, indicating disturbances in the photosynthetic apparatus. Morphologically, there was an increase in stomatal density during the period of water

restriction. In addition, there were reductions in total leaf area, basal leaf area, and relative growth rate, impairing leaf expansion and development. Thus, we observed a delay in the heteroblastic development of this bromeliad, *i.e.*, the tank formation was negatively affected by the water shortage. The water limitation also induced CAM expression and reduced the stomatal conductance in all leaf groups. The most relevant gene involved in ABA biosynthesis, *i.e.*, NCED, increased the number of transcripts, coinciding with the increase in ABA content in the young leaves after 30 days of water restriction, in the intermediate leaves at 60 days of water restriction, also increasing the expression of *PEPC₁*. The increase in endogenous ABA content in all leaf groups during water limitation suggests a possible inhibitory effect of this hormone on leaf growth and development. In addition, young leaves were poorly responsive to ABA, as the relative expression of genes encoding ABA signaling and response did not change after the first 30 days of water deficit. However, this sensitivity could be acquired within 60 days, possibly due to the formation of new stomata during this period. Ontogenetically, the intermediate leaves had a great relevance in the metabolic regulation of *G. monostachia*, as they were highly responsive to ABA (higher transcription of *PYL8* and *SAPK10*), increased *SLAC1* and *AI5L5* gene expressions, presented a strong reduction in stomatal conductance, and the expression of *PEPC₁* also increased in 60 days of water stress. The morphophysiological and gene expression results showed in this work suggest that *Guzmania monostachia* is resilient to water stress when subjected to prolonged periods of water shortage, which certainly favor its occurrence in the epiphytic environment.

I. INTRODUÇÃO

I.1. Plasticidade fenotípica e heteroblastia.

O crescimento aberto das plantas, em que o número e a forma dos órgãos não são pré-definidos no embrião, possibilita alterar a expressão de caracteres morfológicos, anatômicos e/ou fisiológicos em função do habitat, conferindo aos vegetais uma plasticidade fenotípica de respostas às variações ambientais e contribuindo, assim, para sua estabilidade funcional e adaptação ao ambiente (RODRIGUES & KERBAUY, 2009; GRATANI, 2014). Variações microclimáticas como luz, temperatura, disponibilidade hídrica, promovem alterações estrutural e fisiológica das folhas durante o seu desenvolvimento (VOGELMANN & MARTIN, 1993; SVENNING, 2000; PORTLELA *et al.*, 2003). Para a maioria das espécies, essa plasticidade é relativamente sutil e gradual (espécies homoblásticas), embora haja espécies que apresentem essa plasticidade de forma mais abrupta (ZOTZ *et al.*, 2011; PETIT *et al.*, 2014).

Muitas epífitas da família Bromeliaceae apresentam heteroblastia, ou seja, grandes alterações no fenótipo vegetativo durante o desenvolvimento ontogenético (*p.ex.* tamanho, largura e angulação foliar, entre outros). Nessas espécies, os indivíduos juvenis com características morfológicas típicas de bromélias atmosféricas (rosetas compactas com folhas pequenas, lineares e densamente cobertas por tricomas), mudam sua arquitetura caulinar abruptamente com a formação de uma cisterna derivada da sobreposição das amplas bases foliares (característica morfológica típica de bromélias ditas formadoras de tanque). Tal cisterna permite o armazenamento de uma quantidade substancial de água e nutrientes que podem ser utilizados durante períodos de estiagem. Além disso, a formação do tanque representa uma importante especialização morfológica para sobrevivência das bromélias denominadas evitadoras da seca, ao passo que as

formas atmosféricas, em geral, são consideradas mais tolerantes ao estresse hídrico (ADAMS-III & MARTIN, 1986; REINERT & MEIRELLES, 1993; BENZING, 2000; SCHMIDT & ZOTZ, 2001).

A ocorrência de heteroblastia em bromélias epífitas é frequentemente associada ao curso ontogenético ao longo da vida dessas plantas; no entanto, o conjunto de evidências disponível sugere que a plasticidade morfofisiológica de tais bromélias seja resultado da combinação tanto de fatores ontogenéticos quanto da plasticidade adaptativa da espécie em questão. Por exemplo, a transição heretoblástica da forma atmosférica para tanque, em diversas bromélias epífitas, parece depender das flutuações na disponibilidade hídrica e/ou intensidade luminosa típicas do ambiente epifítico. De fato, para combater condições estressantes durante o crescimento vegetal, alterações significativas na arquitetura da planta podem decorrer de muitas respostas e processos fisiológicos induzidos, acelerados ou atrasados durante a ontogenia, tais como translocação de água e nutrientes. Um exemplo interessante é a redução na eficiência da captação de luz em algumas bromélias epífitas durante o desenvolvimento, em que o incremento no tamanho da planta leva a um maior auto sombreamento de suas folhas (ZOTZ *et al.*, 2002; LAUBE & ZOTZ, 2003; REYES-GARCÍA *et al.*, 2008; CAVALLERO *et al.*, 2009; MEISNER *et al.*, 2013; PETIT *et al.*, 2014; SPERDOULI & MOUSTAKAS, 2014).

1.2. Crescimento foliar, ontogenia e disponibilidade hídrica.

O crescimento foliar é um processo central que facilita a captura de energia e o desenvolvimento da planta como um todo, sendo um dos processos mais sensíveis a uma ampla gama de estresses abióticos (PANTIN *et al.*, 2011). O crescimento foliar ocorre por meio do aumento do volume celular em expansão e do acréscimo de matéria seca em crescimento estrutural, tornando a disponibilidade hídrica e de carbono os principais fatores limitantes do processo de crescimento (PARENT & TARDIEU, 2012).

O incremento da área foliar geralmente segue um padrão sigmoide, onde a fase inicial do crescimento exponencial é coordenada por frequentes e rápidos eventos de divisão e expansão celular, seguindo-se pela diferenciação dos tipos celulares e teciduais específicos. Entre a multiplicidade de fatores envolvidos na expansão foliar pode-se citar um controle biofísico, sobretudo relacionado à disponibilidade hídrica para células em crescimento. Há também um controle metabólico relacionado ao fornecimento de carboidratos para a formação de novas estruturas (*p. ex.* celulose, hemicelulose). Além disso, produtos adicionais da fotossíntese podem atuar como combustível para vários processos com consumo energético, tais como, o ciclo celular, síntese de proteínas, entre outros (WALTER *et al.*, 2009; PANTIN *et al.*, 2011; PANTIN *et al.*, 2012; SZYMANSKI, 2014).

A conexão entre as relações hídricas e o 'status' de carbono na expansão foliar vem sendo discutido há muito tempo, porém ainda não está claro até que ponto a ontogenia foliar pode interferir nos fatores metabólicos e hidráulicos capazes de restringir o crescimento foliar. Sabe-se que o metabolismo de carboidratos em folhas muda profundamente durante o desenvolvimento vegetal.

Em uma abordagem genética e ambiental foi visto em *Arabidopsis* que o controle da expansão da folha é predominantemente metabólico nos estágios iniciais, enquanto a influência hidráulica se estabelece à medida que a folha se desenvolve (PANTIN *et al.*, 2011), mostrando que folhas jovens dependem criticamente da importação de carbono a partir de folhas mais velhas. Isto ocorre tendo em vista que as expansões de folhas jovens são geralmente mais dependentes das flutuações no 'status' de carbono quando comparada com as folhas mais velhas. Além disso, sob condições ambientais adversas, o crescimento das folhas mais jovens pode ser priorizado de tal maneira que lhes é garantido o fornecimento de carbono, mesmo quando a disponibilidade de carbono da planta toda está diminuída (TURGEON, 1989; PANTIN *et al.*, 2011).

A disponibilidade hídrica, também está relacionada com o desenvolvimento e crescimento por expansão celular. A falta de água em determinado local faz com que as plantas apresentem modificações tanto morfológicas como fisiológicas para sobreviver. O estresse hídrico pode afetar o conteúdo hídrico da planta que decresce, causando a perda de pressão de turgor celular. A essa perda de turgor inibe atividades que dependem dessa pressão, como no caso da expansão celular, afetando assim o crescimento da folha (ARVE *et al.*, 2011).

I.3. Fisiologia das folhas de bromélias e limitação hídrica.

As folhas são indubitavelmente os principais órgãos vegetativos das bromélias epífitas e, portanto, além de possuírem as especializações morfológicas relacionadas ao desenvolvimento da roseta, também apresentam um elevado grau de especializações metabólicas que são fortemente reguladas pelas condições ambientais. Alguns trabalhos têm demonstrado que as folhas de bromélias-tanque apresentam heterogeneidade morfofuncional ao longo do seu comprimento, indicando que, possivelmente, a parte basal é mais especializada na absorção de nutrientes e a parte apical na realização da fotossíntese e assimilação do nitrogênio (TAKAHASHI & MERCIER, 2011; ABREU *et al.*, 2018; KLEINGESINDS *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2018; PIKART *et al.*, 2018).

Condições adversas, como alta luminosidade, deficiência nutricional e déficit hídrico, que as epífitas podem estar submetidas, implicam no aparecimento ao longo da evolução de adaptações morfológicas e anatômicas foliares que garantam a sobrevivência de espécies frente a esses fatores (BENZING, 1990; ZANENGAGODOY & COSTA, 2003). O Metabolismo Ácido das Crassuláceas (CAM), crescimento lento, desenvolvimento de tanque, baixa densidade estomática, tricomas, espessura de cutícula e cera são exemplos de estratégias morfofisiológicas que se encontram em plantas sob déficit hídrico e que afetam o crescimento foliar e contribuem para a economia hídrica

em espécies epifíticas (BENZING, 1990; KERSTEN, 2010). Os ajustes fisiológicos que costumam exercer importância crucial nas plantas da subfamília Tillandsioideae, na qual estão incluídos os gêneros *Tillandsia*, *Vriesea* e *Guzmania*, permitem manter o metabolismo ativo durante as condições ambientais extremas típicas do nicho epifítico.

Em geral, as bromélias epífitas com maior tolerância ao déficit hídrico, assim como a maioria dos vegetais, apresentam mecanismos fisiológicos que asseguram um baixo potencial osmótico celular como, por exemplo, o ocasionado pelo acúmulo de solutos compatíveis (*p. ex.* açúcares solúveis e/ou ácidos orgânicos) que podem agir como substâncias osmoreguladoras (ZOTZ & HIETZ, 2001; VERSLUES *et al.*, 2006).

O déficit hídrico também pode reduzir a fotossíntese, através do fechamento estomático, que também representa um mecanismo amplamente conservado entre as plantas, evitando a desidratação por transpiração durante a seca. Nesse contexto, a atividade fotossintética representa um dos pontos-chave na regulação integrada de todos os aspectos do crescimento e do desenvolvimento vegetal, uma vez que permite o uso de componentes comuns no meio ambiente [*i.e.* água, luz solar e dióxido de carbono (CO₂) atmosférico] para produzir carboidratos e, subsequentemente, outros produtos metabólicos mais complexos que, em conjunto, sustentam todas as fases no ciclo de vida das plantas (MÜLLER *et al.*, 1996; GUICHERD *et al.*, 1997; TIMPA *et al.*, 1986; SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007; HUMMEL *et al.*, 2010; PINHEIRO & CHAVES, 2011; PINHEIRO *et al.*, 2011; TARDIEU *et al.*, 2011; SPERDOULI & MOUSTAKAS, 2014).

I.4. Controle hormonal do desenvolvimento foliar.

Sabe-se que os fatores ambientais influenciam o crescimento e o desenvolvimento foliar, requerendo que as plantas apresentem uma resposta rápida, adaptando-se às mudanças ambientais. Para isso, as plantas apresentam uma elaborada rede de sinalização

mediando sua plasticidade por meio de fitormônios (LIU *et al.*, 2019). Estes não apenas exercem o controle do crescimento intrínseco, mas também medeiam a adaptação do desenvolvimento da planta a condições ambientais transitoriamente mutáveis (WOLTERS & JURGENS, 2009).

São vários os hormônios que podem atuar na sinalização promovendo o crescimento e desenvolvimento foliar, como as auxinas (regulam o crescimento e desenvolvimento das plantas, bem como desenvolvimento vascular da folha), citocininas (CKs) (regulam o crescimento foliar, supressão de senescência foliar), giberelinas (GAs)(regulam expansão celular e divisão celular), bem como o ácido abscísico (ABA) (regulam senescência foliar) (SREENIVASULU *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2019).

No entanto, em condições adversas como estresses abióticos e bióticos, o papel do ABA tem tomado o centro das atenções. Esse hormônio é considerado um mensageiro essencial envolvido na resposta adaptativa das plantas contra esses estresses, ajudando no redirecionamento dos recursos necessários ao crescimento para a proteção ou para mecanismo de defesa. (UMEZAWA *et al.*, 2006). Por exemplo, sabe-se que a exposição a algum tipo de estresse retarda o crescimento vegetativo da parte aérea, incluindo o crescimento das folhas, de maneira dependente da proteína DELLA, e o ABA, parece mediar essas respostas, modulando e inibindo transitoriamente as ações auxinas, citocininas e as respostas GA, revertendo o efeito promotor desses hormônios sobre o crescimento (WOLTERS & JURGENS, 2009).

I.4.1. Ácido abscísico, estresse e desenvolvimento foliar.

O ácido abscísico é o hormônio mais estudado para se compreender as respostas aos estresses sofridos pelas plantas, (SEKI *et al.*, 2002; SREENIVASULU *et al.*, 2007; CUTLER *et al.*, 2010; HIRAYAMA & SHINOZAKI, 2010; RAGHAVENDRA *et al.*, 2010; SREENIVASULU *et al.*, 2012). No entanto, a atuação de outros hormônios

também é importante, apesar dos estudos sobre respostas aos estresses serem mais limitados. São exemplo desses hormônios as citocininas, auxinas, giberelinas, jasmonatos, ácido salicílico, brassinosteróides, estrigolactonas, etileno e óxido nítrico (NO) (SANTNER *et al.*, 2009; WOLTERS & JULHO, 2009; KLINGLES *et al.*, 2010; LOPEZ-RAEZ *et al.*, 2010; PELEG & BLUMWALD, 2011; SANTINO *et al.*, 2013).

O ABA é frequentemente relacionado a eventos de sinalização em respostas a condições de baixa disponibilidade de água, baixas ou altas temperaturas, salinidade elevada, entre outros (FINKELSTEIN *et al.*, 2002; JONES, 2016). Sua biossíntese ocorre a partir do β -caroteno e segue várias etapas (Figura 1). A zeaxantina, que é oriunda da via dos carotenoides, é convertida rapidamente em violaxantina via anteroxantina através da atividade da zeaxantina epoxidase (ZEP), podendo ser interconvertida através da atividade da violaxantina de-epoxidase (VDE). A violaxantina pode originar isômeros *cis* de neoxantina via formação de neoxantina através da neoxantina sintase (NSY) ou pode originar isômeros *cis* de violaxantina. A formação dos dois isômeros ocorre via isomerases. A clivagem das *cis*-xantofilas é catalisada por meio de uma família de dioxigenases 9-*cis*-epoxicarotenoides (NCED), gerando um produto intermediário de 15 carbonos, a xantoxina, no qual é convertida em ABA aldeído através de uma desidrogenase alcoólica de cadeia curta (ABA2). A oxidação do ABA aldeído em ácido carboxílico é o último estágio da biossíntese de ABA e é realizada por uma aldeído oxidase (AAO3) (VISHWAKARMA *et al.*, 2017).

Figura 1. Representação esquemática da biossíntese do ABA. A zeaxantina através da enzima zeaxantina epoxidase (ZEP) é convertida em violaxantina, no qual origina cis-neoxantina através da neoxantina sintase (NSY) ou cis-violaxantina através de isomerasas. Essas cis-xantofilas são catalisadas via dioxigenases 9-cis-epoxicarotenoides (NCED), gerando xantoxina, o qual é convertido em ABA aldeído através de uma desidrogenase alcoólica de cadeia curta (ABA2). O ABA aldeído é oxidado via aldeído oxidase (AAO3), dando origem ao ABA.

O ABA pode regular a expressão de vários conjuntos de genes responsivos ao estresse, incluindo aqueles envolvidos no acúmulo de osmólitos compatíveis e na síntese de proteínas LEA e de outras proteínas induzidas por estresses (INGRAM & BARTELS, 1996; VERSLUES *et al.*, 2006). Essas proteínas protetoras ajudam a manter o ‘status’ hídrico celular e protegem outras proteínas / enzimas e organelas celulares do colapso sob estresse hídrico, por exemplo (KISHOR *et al.*, 2005).

Outra função que o ABA pode desempenhar é na evitação de germinação precoce de embriões prematuros. Esse hormônio também é conhecido por aumentar seus teores em resposta a déficits hídricos e, em coordenação com outros hormônios, regula o crescimento das raízes, desempenhando um papel fundamental nas plantas para manter o suprimento de água adequado durante a seca (SHARP *et al.*, 2004).

O ABA também tem importância na manutenção das relações hídricas nas plantas regulando o fechamento estomático que, por sua vez, também afeta a capacidade fotossintética, limitando a absorção de CO₂. (IMBER & TAL ,1970; JONES & MANSFIELD, 1970; TAL *et al.*, 1970). Diante disso, algumas plantas desenvolveram mecanismos que otimizam o uso eficiente da água, como, por exemplo, passando a expressar o CAM. Nessa situação, o ABA também apresenta uma importância na regulação da expressão do CAM, em plantas conhecidas como C₃- CAM facultativas, estando relacionado com a indução da transição do metabolismo C₃ para o CAM, frente às condições ambientais ou fases de desenvolvimento (SLESACK *et al.*, 2003). Em planta de *Mesembryanthemum crystallinum*, a transição de C₃ para CAM pode ser desencadeada por estímulos ambientais, como salinidade e seca. No entanto, a aplicação de ABA também pode causar essa mudança fotossintética, estimulando o aumento da expressão da Fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC), enzima chave do CAM. Sugere-se que o ABA pode mediar a interpretação dos sinais ambientais e a transição bioquímica (CHU *et al.*, 1990). Essa mudança de C₃ para CAM, induzida via ABA, também foi observada em folhas jovens de plantas de *Kalanchoe blossfeldiana* (TAYBI *et al.*, 1995) e de abacaxizeiro (*Ananas comosus*) cultivadas *in vitro* (NIEVOLA *et al.*, 1995).

O ácido abscísico pode desempenhar uma função sinalizadora para que haja uma redução na taxa de crescimento foliar. Além disso, ele pode desempenhar um papel como sinalizador para a abertura e fechamento estomático, atuando na modulação do balanço entre a transpiração e assimilação de CO₂. Assim, à primeira vista, o ABA promove o

crescimento expansivo, evitando perda de água e redução da tensão do xilema, mas altera provavelmente o crescimento estrutural, limitando a entrada de CO₂ (ARVE *et al.*, 2011; PANTIN *et al.*, 2012).

De fato, muitos dos processos fisiológicos relacionados a estresses ambientais são correlacionados com os teores endógenos de ABA, sendo que alguns pontos-chave na sua rota de síntese, conjugação, transporte e sinalização são frequentemente sujeitas à regulação por sinais ambientais.

Recentemente, estudos têm mostrado que a biossíntese foliar de ABA é ativamente regulada em resposta a uma queda no volume celular, provocando rapidamente o fechamento estomático (McADAM & BRODRIBB, 2016; McADAM *et al.*, 2016b; SACK *et al.*, 2017, SUSSMILCH *et al.*, 2017). Essa biossíntese pode ocorrer no próprio local de sua ação, porém esse hormônio é frequentemente translocado entre órgãos da planta via xilema, agindo, portanto, como um sinal químico de longa distância entre raiz e parte aérea em plantas sob estresse hídrico.

Além desse tipo de sinalização bioquímica, o ABA também pode promover o fechamento estomático por seu efeito hidráulico indireto através da diminuição da permeabilidade hídrica dos tecidos vasculares foliares (WILKINSON & DAVIES, 2002; GALLÉ *et al.*, 2013; PANTIN *et al.*, 2013a). Essa sinalização do ABA frente às repostas ambientais é realizada por meio de uma regulação sofisticada de cascata de eventos bioquímicos que envolvem o complexo de sinalização ABA:PYR / PYL-PP2C-SnRK2 (Figura 2).

O ABA é percebido por receptores, do complexo PYR/PYL/RCAR. Esses receptores interagem com fosfatases da proteína A do tipo 2C (PP2C) de maneira dependente do ABA para regular a atividade a jusante de proteínas serinas/treoninas cinases da família sucrose non-Fermenting Related Kinase 2 (SnRK2). Em ausência de ABA, essas PP2Cs ligam-se ao C-terminal de SnRK2 e bloqueiam a atividade da SnRK2-

cinase desfosforilando-as e, conseqüentemente, bloqueando o desencadeamento da sinalização. Em presença do ABA, os receptores ao se ligarem à molécula de ABA mudam sua conformação para permitir ou intensificar a interação com PP2C e, assim, reprimir a atividade da PP2C-fosfatase. Isso interrompe o bloqueio de SnRK2-cinases, o que, subsequentemente, permite a ativação de SnRK2s (provavelmente por autofosforilação) e a fosforilação de proteínas alvos, incluindo canais iônicos e fatores de transcrição que se ligam aos elementos de resposta ao ABA (ABFs), ativando a expressão gênica responsiva ao ABA (CUTLER *et al.*, 2010; KLINE *et al.*, 2010; RAGHAVENDRA *et al.*, 2010; SREENIVASULU *et al.*, 2012).

Figura 2. Representação esquemática de sinalização do ácido abscísico. (A) Sob condições de homeostase (níveis basais de ABA) alguns receptores de ABA formam homodímeros e não estão ligados a proteínas fosfatases PP2Cs. PP2Cs por sua vez, bloqueiam a função das proteínas cinases SnRK2, desfosforilando-as. Assim, não há ativação de respostas ao ABA como expressão dos elementos responsivos a fatores de transcrição (ABFs) e canais iônicos. (B) Sob condição de estresse, os níveis de ABA aumentados pelo estímulo ambiental, ligam-se a receptores PYR/PYL/RCAR. Estes interagem com as fosfatases PP2Cs que são subsequentemente inibidas na sua função de bloquear as cinases SnRK2s. As proteínas SnRK2 se

autofosforilam, ativando-se e posteriormente fosforilando alvos seguintes, tais como, canais iônicos ou fatores de transcrição ABF (os quais acarretam na ativação de genes responsivos a ABA) .

Trabalhos recentes sobre os potenciais pontos de ligação entre o 'status' de carbono e a sinalização por ABA em *Arabidopsis* investigaram o efeito da aplicação desse hormônio na transpiração, condutância estomática e condutância hídrica foliar em diferentes mutantes de *Arabidopsis thaliana* insensíveis ao ABA (PANTIN *et al.*, 2012). Foi observado que a transpiração foliar decresceu, afetando a condutância estomática, que decresceu tanto em mutantes insensíveis como no controle. Em outros estudos (PANTIN *et al.*, 2012; PANTIN *et al.*, 2013a,b), analisando a sensibilidade estomática ao ABA em folhas de *A. thaliana*, foram observados que a sensibilidade estomática ao ABA é adquirida durante o desenvolvimento foliar. As folhas jovens que se desenvolvem no centro da roseta apresentam uma insensibilidade a esse hormônio, uma vez que os estômatos não fecham mesmo quando foi aplicado o ABA. Com o aumento do tamanho foliar, as folhas são naturalmente expostas a um maior contato com o ar seco e, como consequência, há uma modificação do arranjo espacial das folhas e o desencadeamento da aquisição da sensibilidade ao ABA.

1.5. Metabolismo Ácido das Crassuláceas e *Guzmania monostachia*

Plantas que apresentam o Metabolismo Ácido das Crassuláceas tem uma grande interação entre ontogenia, metabolismo e condutância hidráulica no controle do crescimento foliar (PANTIN *et al.*, 2012). Sabe-se que a maioria das bromélias possui uma boa capacidade para se adaptar às condições ambientais em que elas se encontram. Dentre as adaptações, o CAM exhibe uma ampla plasticidade, sob influência do desenvolvimento dos tecidos dessas plantas (JONES, 1975). Este metabolismo é caracterizado por proporcionar aos vegetais uma maior eficiência no uso da água, uma

vez que desloca parcialmente ou totalmente a captação atmosférica líquida do CO₂ para o período de maior umidade relativa do ar, geralmente durante a noite (FRESCHI *et al.*, 2010a,b,c). Em plantas com esse tipo de fotossíntese, o CO₂ é fixado durante o período noturno numa sequência de reações que culmina na formação e acúmulo de ácidos orgânicos, causando a acidificação noturna característica de plantas CAM. Durante o período de luz, por sua vez, ocorre a descarboxilação desses ácidos orgânicos com a refixação do CO₂ via ciclo de Calvin-Benson. O fato da assimilação do carbono ocorrer majoritariamente à noite permite que os estômatos permaneçam fechados a maior parte do dia, fazendo com que as plantas CAM tenham uma maior eficiência no uso da água em comparação com plantas de fotossínteses C₃ (CUSHMAN & BORLAND, 2002; WEST-EBERHARD *et al.*, 2011).

Sabe-se, no entanto, que muitas espécies competentes para expressar o CAM quando adultas exibem, de preferência, a fotossíntese C₃ na fase juvenil (WINTER *et al.*, 2008). Há relatos de que tecidos foliares jovens de algumas espécies só desenvolvem a capacidade de expressar esse tipo de fotossíntese quando maduros, sendo que tal limitação frequentemente é relacionada à capacidade de armazenamento de malato nos vacúolos (JONES, 1975; MARKOVSKA & DIMITROV, 2001). Por exemplo, em *Mesembryanthemum crystallinum* ocorre uma transição gradual do metabolismo C₃ para o CAM ao longo do desenvolvimento, sendo que o CAM é estabelecido mesmo na ausência dos sinais ambientais indutores do CAM, tais como alterações no fotoperíodo, déficit hídrico ou salinidade (HERPPICH *et al.*, 1992; SCHMITT & PIEPENBROCK, 1992; THOMAS *et al.*, 1992; TAYBI & CUSHMAN, 1999; CUSHMAN, 2001; CUSHMAN & BORLAND, 2002; TAYBI *et al.*, 2002). Em algumas espécies, as condições ambientais ou de desenvolvimento são capazes de desencadear uma mudança no metabolismo de C₃ para CAM, otimizando os balanços hídrico e de carbono (BORLAND *et al.*, 2011). Nessas espécies, chamadas de CAM facultativas, as

folhas operam rotineiramente em modo C_3 e são induzidas ao CAM sobre diversas condições ambientais, especialmente sob estresse hídrico (SMITH *et al.*, 1986; MAXWELL *et al.*, 1995; ZOTZ & WINTER, 1993; BORLAND *et al.*, 1998; CUSHMAN & BORLAND, 2002; LÜTTGE, 2006; PANTIN *et al.*, 2012).

Guzmania monostachia é um bromélia epífita formadora de tanque capaz de realizar a fotossíntese C_3 quando bem hidratada e CAM quando em déficit hídrico. A intensidade luminosa também pode afetar a expressão do CAM nessa espécie, sendo que há uma diminuição da expressão do CAM quando mantida sob baixa intensidade luminosa (MAXWELL *et al.*, 1994, 2002; FRESCHI *et al.*, 2010a, MIOTO & MERCIER, 2013; PEREIRA *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2014). Além disso, *G. monostachia* é uma bromélia-tanque na fase adulta que apresenta uma intensa mudança morfológica durante a ontogenia (heteroblastia). Na fase juvenil as plantas são morfológicamente semelhantes às bromélias atmosféricas (sem tanque formado). Além disso, alguns trabalhos propõe que concomitantemente às alterações na forma, a estratégia fisiológica dessas bromélias passaria de tolerante à seca na fase juvenil para evitadora da seca na fase adulta (ZOTZ & THOMAS, 1999; ZOTZ *et al.*, 2011; HAMACHI, 2013).

Dentre os membros da família Bromeliaceae, *Guzmania monostachia* é uma planta-modelo que vem sendo investigada no laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal do IB-USP há vários anos. Trabalhos provenientes desse Laboratório têm focado suas pesquisas nos aspectos fisiológico/bioquímicos e de sinalização, investigando fatores como deficiência nutricional e de água na expressão do CAM tanto em plantas atmosféricas (juvenis) como também em plantas adultas. Resultados desses estudos têm demonstrado que plantas atmosféricas de *G. monostachia*, sob déficit hídrico, apresentam plasticidade fotossintética alternando entre fotossíntese C_3 e CAM dependendo da disponibilidade hídrica. Foi observado também que o crescimento

das plantas atmosféricas pode ser influenciado por diferentes fontes nitrogenadas, apresentando um grau mais elevado de CAM quando cultivadas com nitrato, como fonte exclusiva de nitrogênio (NETO, 2017). Essa plasticidade fotossintética também pode ser observada em plantas adultas (com tanque) de maneira rápida após um período de 7 dias déficit hídrico, mostrando um aumento intenso na intensidade do CAM na região apical foliar (FRESCHI *et al.*, 2010a; MIOTO & MERCIER, 2013; PIKART *et al.*, 2018). Alguns outros estudos também sugeriram a participação do ABA como um sinal sistêmico da seca ao longo do limbo foliar e na roseta (MIOTO & MERCIER, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2016).

As pesquisas realizadas no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal têm gerado uma série de informações relevantes a respeito das relações entre déficit hídrico, ontogenia e modulação da expressão do CAM em *Guzmania monostachia*. No entanto, naturalmente, no âmbito ontogenético, surgiram questionamentos interessantes envolvendo o desenvolvimento dessa bromélia frente a estresses ambientais como a escassez hídrica. Sabe-se que o ABA não apenas regula a resposta ao estresse, como, por exemplo, o movimento estomático, mas também influencia o desenvolvimento de vários tecidos por meio de eventos maciços de reprogramação transcricional afetando vários estágios do ciclo de vida da planta. Uma das questões mais intrigantes que ainda não está esclarecida para *Guzmania monostachia* é se o ABA regularia a tolerância ao estresse abiótico, conferindo um atraso no crescimento heteroblástico. Portanto, o papel da ABA deve não apenas ser avaliado no processo de sinalização e de adaptação ao estresse em curto prazo, mas também é necessário considerar o impacto de mais longo prazo sobre o crescimento. Com isso, surgiram mais algumas questões: 1) a restrição hídrica em longo prazo atrasaria o desenvolvimento heteroblástico de plantas jovens de *G. monostachia*? Há mudanças morfofisiológicas no decorrer do desenvolvimento foliar? Há participação do ácido abscísico (ABA) como mediador do controle do desenvolvimento dessa

bromélia? Será que as folhas mais jovens da roseta teriam menor sensibilidade ao ácido abscísico durante o estresse abiótico?

Foi hipotetizado que frente à restrição hídrica a longo prazo, o ABA atue na regulação do CAM, assim como mediando a sinalização do estresse hídrico na roseta e da planta e provocando o atraso do crescimento foliar com consequências negativas para o desenvolvimento heteroblástico da espécie.

II. CONCLUSÕES

Baseado nos dados obtidos neste trabalho foi possível indicar algumas conclusões acerca da participação do ácido abscísico (ABA) no desenvolvimento e morfologia foliar de plantas de *Guzmania monostachia* submetida à restrição hídrica:

- 1) O tratamento de restrição hídrica prolongado foi efetivo, uma vez que todos os grupos foliares da roseta mostraram diminuição no teor relativo de água já nos 30 primeiros dias, o qual se estabilizou ao longo do tratamento. Da mesma forma, os parâmetros de fluorescência de clorofila apresentaram redução em 30 dias, seguindo-se uma leve recuperação que indicaria um certo grau de adaptabilidade fisiológica às condições de escassez hídrica.
- 2) Com base nos parâmetros morfológicos, a baixa disponibilidade hídrica prejudicou o desenvolvimento foliar e, conseqüentemente, a formação do tanque em plantas jovens, atrasando assim o desenvolvimento heteroblático das plantas.
- 3) O aumento do ABA endógeno nas folhas, conjuntamente com a inibição do desenvolvimento foliar, indica que possivelmente o ABA atuou como mediador da inibição do crescimento dessa bromélia sob condição de menor disponibilidade d'água.
- 4) O principal gene de síntese de ABA, o *NCED*, aumentou o número de transcritos, coincidindo com o incremento no teor de ABA, nas folhas do grupo jovem em 30 dias de tratamento e nas intermediárias em 60 dias de restrição hídrica.
- 5) De acordo com os resultados de acúmulo noturno de ácidos orgânicos, expressão relativa do gene *PECI* e de condutância estomática, a fotossíntese CAM que se estabeleceu foi a do tipo *idling* em todos os grupos foliares.

- 6) As análises da expressão relativa dos genes ligados à sinalização e transdução do ABA, indicam uma interação entre os genes *PYL8*, *SAPK10*, *AI5L5* e *SLAC1*, constituindo uma possível via de sinalização e resposta a esse hormônio em bromélia.
- 7) As folhas jovens da roseta pareceram insensíveis (ou num grau menor) ao ABA em 30 dias de tratamento. No entanto, num período mais prolongado de estresse (60 dias) a sensibilidade foi adquirida em decorrência da formação de novos estômatos, os quais responderam de forma mais eficaz à falta d'água, fechando os poros estomáticos.
- 8) Ontogeneticamente, as folhas mais centrais da roseta, chamadas de intermediárias, tiveram uma grande importância na regulação metabólica, respondendo eficientemente ao estresse hídrico por meio da redução da condutância estomática e na realização da fotossíntese CAM.
- 9) As plantas de *Guzmania monostachia*, submetidas a uma prolongada restrição de rega, se mostraram resilientes ao estresse hídrico; característica essa que pode ter favorecido a sua adaptação e sobrevivência no ambiente epifítico.

III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, M. E.; CARVALHO, V.; MERCIER, H. Antioxidant capacity along the leaf blade of the C₃-CAM facultative bromeliad *Guzmania monostachia* under water deficit conditions. **Functional Plant Biology**, 45: 620-629, 2018.
- ADAMS-III, W. W.; MARTIN, C. E. Morphological changes accompanying the transition from juvenile (atmospheric) to adult (tank) forms in the mexican epiphyte *Tillandsia deppeana* (Bromeliaceae). **American Journal of Botany**, 73:1207-1214, 1986.
- ARVE, L. E.; TORRE, S.; OLSEN, J. E.; TANINO, K. K. Stomatal responses to drought stress and air humidity. In: SHANKER, A. Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations. **InTech**, 267-280, 2011.
- BACON, M. The biochemical control of leaf expansion during drought. **Plant Growth Regulation**, 29:101-112, 1999.
- BAKER, N. R.; ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: An examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, 55:1607-1621, 2004.
- BELTRÁN, J. LASSO, E. MADRIÑÁN, S. VIRGO, A. WINTER, K. Juvenile tank-bromeliads lacking tanks: do they engage in CAM photosynthesis? **Photosynthetica**, 51:55-62, 2013.
- BENZING, D. H. in: **Vascular Epiphytes: General Biology and Related Biota**. Cambridge, Cambridge University Press, 1990.
- BENZING, D. H. **Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation**. Cambridge University Press. Cambridge. Cambridge, 724p, 2000.
- BERTOLINO, L. T.; CAINE, R. S.; GRAY, J. E. Impact of stomatal density and morphology on water-use efficiency in a changing world. **Frontiers in Plant Science**, 10:225, 2019.
- BORLAND, A. M.; TECSI, L. I.; LEEGOOD, R. C.; WALKER, R. P. 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**, 205:342-351, 1998.
- BORLAND, A. M.; ZAMBRANO, V. A. B.; CEUSTERS, J.; SHOROOK, K. The photosynthetic plasticity of crassulacean acid metabolism: an evolutionary innovation for sustainable productivity in a changing world. **The New phytologist**, 191:619-633, 2011.
- CACH-PEREZ, M. J.; ANDRADE, J. L.; CETZAL, I. X.; REYES-GARCIA, C. Environmental influence on the inter-and intraspecific variation in the density and morphology Of stomata and trichomes of epiphytic bromeliads of the Yucatan Peninsula. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 181:441-458, 2016.
- CAVALLERO, L.; LÓPEZ, D.; BARBERIS, I. M. Morphological variation of *Aechmea distichantha* (Bromeliaceae) in a chaco forest: habitat and size-related effects. **Plant Biology**, 11:379-391, 2009.
- CHU, C.; DAI, Z.; KU, M. S. B.; EDWARDS, G. E. Induction of crassulacean acid metabolism in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* by abscisic acid. **Plant Physiology**, 93:1253-1260, 1990.
- CLAEYS, H.; INZÉ, D. The agony of choice: how plants balance growth and survival under water-limiting conditions. **Plant Physiology**, 162: 1768-1779, 2013.
- CUTLER, S.R.; RODRIGUEZ, P. L.; FINKELSTEIN, R. R.; ABRAMS, S. R. Absciscic acid: emergence of a core signaling network. **Annual Review Plant Biology**, 61: 651-679, 2010.
- CUSHMAN, J. C. Crassulacean acid metabolism. A plastic photosynthetic adaptation to arid environments. **Plant Physiology**, 127:1439-1448, 2001.
- CUSHMAN, J. C.; BORLAND, A. M. Induction of crassulacean acid metabolism by water limitation. **Plant, Cell & Environment**, 25:295-310, 2002.
- DAI, Z.; KU, M. S. B.; ZHANG, D. EDWARDS, G. E. Effects of growth regulators on the induction of Crassulacean acid metabolism in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L. **Planta**, 192:287-294, 1994.

- DOW, G. J.; BERGMANN, D. C. Patterning and processes: how stomatal development defines physiological potential. *Current Opinion in Plant Biology*, 21:67-74, 2014.
- DRAKE, P. L.; FROEND, R. H.; FRANKS, P. J. Smaller, faster stomata: scaling of stomatal size, rate of response, and stomatal conductance. *Journal of Experimental Botany*, 64: 495-505, 2013.
- EVANS, G. C. The quantitative analysis of growth. Berkeley: University of California Press, 1972.
- FINKELSTEIN, R. R.; GAMPALA, S. S. L; ROCK, C. D. Absciscic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell*, 14:15-45, 2002.
- FRANKS, P. J.; LEITCH, I. J.; RUSZALA, E. M.; HETHERINGTON, A. M.; BEERLING, D. J. Physiological framework for adaptation of stomata to CO₂ from glacial to future concentrations. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences*, 367:537-546, 2012.
- FRESCHI, L.; TAKAHASHI, C. A.; CAMBUI, C. A.; SEMPREBOM, T. R.; CRUZ, A. B.; MIOTO, P. T.; VERSIEUX, L. M.; CALVENTE, A.; LATANSIO-AIDAR, S. R.; AIDAR, M. P. M.; MERCIER, H. Specific leaf areas of the tank bromeliad *Guzmania monostachia* perform distinct functions in response to water shortage. *Journal of Plant Physiology*, 167:526-533, 2010a.
- FRESCHI, L.; RODRIGUES, M. A.; DOMINGUES, E. S.; PURGATTO, E.; SLUYS, M. A. V.; MAGALHÃES, J. R.; KAISER, W. M.; MERCIER, H. Nitric oxide mediates de hormonal control of crassulacean acid metabolism expression in young pineapple plants. *Plant Physiology*, 152:1-15, 2010b.
- FRESCHI, L.; RODRIGUES, M. A.; TINÉ, M. A. S.; MERCIER, H. Correlation between citric acid and nitrate metabolisms during CAM cycle in the atmospheric bromeliad *Tillandsia pohliana*. *Journal of Plant Physiology*, 167:1577-1583, 2010c.
- FUJII, H.; CHINNUSANY, V.; RODRIGUES, A.; ANTONI, R. SANG-YOUL, P.; CUTLER, S. R.; SHEEN, J.; RODRIGUEZ, P. L.; ZHU, J. K. In vitro reconstitution of an ABA signaling pathway. *Nature*, 462:660-664, 2009.

- GALLÉ, A.; LAUTNER, S.; FLEXAS, J. RIBAS-CARBO, M.; HANSON, D.; ROESGEN, J.; FROMM, J. Photosynthetic responses of soybean (*Glycine max* L.) to heat-induced electrical signalling are predominantly governed by modifications of mesophyll conductance for CO₂. *Plant Cell Environment*, 36: 542-552, 2013.
- GENTY, B.; BRIANTAIS, J.; BAKER, R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* , 990:87-92, 1989.
- GOBARA, B.N.K. **Caracterização da capacidade de indução ao CAM em plantas de *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae) sob déficit hídrico.** Dissertação (Mestrado em Ciências)- Universidade de São Paulo. São Paulo, 2015.
- GRATINI, L. Plant phenotypic plasticity in response to environmental factors. **Advances in Botany**, 1-17, 2014.
- GRIFFITHS, H. SMITH, J. A. C. Photosynthetic pathways in the Bromeliaceae of Trinidad: relations between life-forms, habitat preference and the occurrence of CAM. *Oecologia*, 60:176-184, 1983.
- GUICHERD, P.; PELTIER, J. P.; GOUT, E.; BLIGNY, R.; MARIGO, G. Osmotic adjustment in *Fraxinus excelsior* L.: malate and mannitol accumulation in leaves under drought conditions. *Trees*, 11:155-161, 1997.
- HAMACHI, L. **Competência para a expressão da fotossíntese CAM em plantas de *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae) em diferentes fases ontogenéticas.** Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2013.
- HIRAYAMA, T.; SHINOZAKI, K. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. **Plant Journal**, 61:1041-1052, 2010.
- HERPPICH W, HERPPICH M, VONWILLERT DJ (1992). The irreversible C₃ to CAM shift in well-watered and salt-stressed plants of *Mesembryanthemum crystallinum* is under strict ontogenic control. **Botanica Acta**, 105: 34-40, 1992.
- HOLTHE, P. A. STERNBERG, L. S. L. TING, I. P. Developmental control of CAM in *Peperomia scandens*. **Plant Physiology**, 84:242-247, 1987.

- HUMMEL, L.; PANTIN, F.; SULPICE, R.; PIQUES, M.; ROLLAND, G.; DAUZAT, M.; CHRISTOPHE, A.; PERVENT, M.; BOUTEILLE, M.; STITT, M.; GIBON, Y.; MULLER, B. *Arabidopsis* plants acclimate to water deficit at low cost through changes of carbon usage: an integrated perspective using growth, metabolite, enzyme, and gene expression analysis. **Plant Physiology**, 154:353-372, 2010.
- IMBER, D.; TAL, M. Phenotypic reversion of flacca, a wilted mutant of tomato, by abscisic acid. **Science**, 169:592, 1970.
- INGRAM, J.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 47:377-403, 1996.
- JONES, M. B. The Effect of leaf age on leaf resistance and CO₂ exchange of the CAM plant *Bryophyllum fedtschenkoi*. **Planta**, 123:91-96, 1975.
- JONES, R. J.; MANSFIELD, T. Suppression of stomatal opening in leaves treated with abscisic acid. **Journal Experimental of Botany**, 21:714, 1970.
- JONES, A. M. A new look at stress: abscisic acid patterns and dynamics at high resolution. **New Phytologist**, 210:38-44, 2016.
- KERSTEN, R. A. Epífitas vasculares – histórico, participação taxonômica e aspectos relevantes, com ênfase na Mata Atlântica. **Hoehnea**, 37: 9-38, 2010.
- KISHOR, P. B. K.; SANGAM, S.; AMRUTHA, R. N.; LAXMI, P. S.; NAIDU, K. R.; RAO, K. R. S. S.; RAO, S.; REDDY, K. J.; THERIAPPAN, P.; SREENIVASULU, N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current Science**, 88:424-438, 2005.
- KLEIGESINDS, C. K.; GOBARA, B. N. K.; MANCILHA, D., RODRIGUES, M. A.; DEMARCO, D.; MERCIER, H. Impact of tank formation on distribution and cellular organisation of trichomes within *Guzmania monostachia* rosette. **Flora**, 243: 11-18, 2018.

- KLINGLER, J. P.; BATELLI, G.; ZHU, J. K. ABA receptors: the START of a new paradigm in phytohormone signalling. **Journal Experimental of Botany**, 61:3199-3210, 2010.
- KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination for orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, 15:214-217, 1946.
- KOBAYASHI, Y.; MURATA, M.; YAMAMOTO, S.; KAGAYA, Y.; HATTORI, T. Absciscic acid-activated SNRK2 protein kinases function in the gene-regulation pathway of ABA signal transduction by phosphorylating ABA response element-binding factors. **The Plant Journal**, 44:939-949, 2005.
- LAUBE, S.; ZOTZ, G. Which abiotic factors limit vegetative growth in a vascular epiphyte? **Functional Ecology**, 17:598-604, 2003.
- LAWSON, T.; BLATT, M. R. Stomatal size, speed, and responsiveness impact on photosynthesis and water use efficiency. **Plant Physiology**, 164:1556-1570, 2014.
- LEE, H. Y.; JANG, G.; UM, T.; KIM, J. K.; LEE, J. S.; CHOI, Y. D. The soluble ABA receptor PYL8 regulates drought resistance by controlling ABA signaling in Arabidopsis. **Plant Biotechnology Reports**, 9: 319-330, 2015.
- LIU, J.; FENG, K. HOU, X.; LI, H.; WANG, G.; XU, Z.; XIONG, A. Transcriptome profiling reveals the association of multiple genes and pathways contributing to hormonal control in celery leaves, **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, 51:524-534, 2019.
- LOCKHART, J. A. An analysis of irreversible plant cell elongation. **Journal of Theoretical Biology**, 8: 264-275, 1965.
- LOPEZ-RAEZ, J. A.; KOHLEN, W.; CHARNIKHOVA, T.; MULDER, P.; UNDAS, A. K.; SERGEANT, M. J.; VERSTAPPEN, F.; BUGG, T. D. H.; THOMPSON, A. J.; RUYTER-SPIRA, C.; BOUWMEESTER, H. Does absciscic acid affect strigolactone biosynthesis?. **New Phytologist**, 187:343-354, 2010.

- LÜTTGE, U.; STIMMEL, K. H.; SMITH, J. A. C.; GRIFFITHS, H. Comparative ecophysiology of CAM and C₃ Bromeliads. 2. Field-measurements of gas-exchange of CAM bromeliads in the humid tropics. **Plant Cell Environment**, 9:377-383, 1986.
- LÜTTGE, U. Photosynthetic flexibility and ecophysiological plasticity: questions and lessons from *Clusia*, the only CAM tree, in the neotropics. **New Phytologist**, 171:7-25, 2006.
- MALECKOVA, E.; BRILHAUS, D.; WROBEL, T. J.; WEBER, A. P. M. Transcript and metabolite changes during the early phase of abscisic acid-mediated induction of crassulacean acid metabolism in *Talinum triangulare*, **Journal of Experimental Botany**, erz189, 2019. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz189>
- MANCILHA, D. **Respostas à deficiência hídrica relacionadas à ontogenia foliar em *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae): variações do potencial hídrico e expressão de diferentes padrões do Metabolismo Ácido das Crassuláceas (CAM)**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2017.
- MARKOVSKA, Y. K., DIMITROV, D. S. The effect of leaf age on gas exchange and malate accumulation in C₃-CAM plant *Marrubium frivaldszkyanum* (Lamiaceae). **Photosynthetica**, 39: 191-195, 2001.
- MARTIN, C. E. Physiological Ecology of the Bromeliaceae. **Botanical Review**, 60:1-82, 1994.
- MARTINEZ, J. P.; SILVA, H.; LEDENT, J. F.; PINTO, M. Effect of drought stress on the osmotic adjustment, cell wall elasticity and cell volume of six cultivars of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **European Journal of Agronomy**, 26:30-38, 2007.
- MAXWELL, C. GRIFFITHS, H. BORLAND, A. M. BROADMEADOW, M. S. J. MCDAVID, C. R. Photosynthetic responses of the epiphytic bromeliad *Guzmania monostachia* during the dry season in Trinidad maintain photochemical integrity under adverse conditions. **Plant cell and environment**, 15:37-47, 1992.

- MAXWELL, C.; GRIFFITHS, H.; YOUNG, A. J. 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, 1994.
- MAXWELL, C.; GRIFFITHS, H.; BORLAND, A. M.; YOUNG, A. J.; BROADMEADOW, M. S. J.; FORDHAM, M. C. Short-term photosynthetic responses of the C₃-CAM epiphyte *Guzmania monostachia* var *monostachia* to tropical seasonal transitions under field conditions. **Australian Journal of Plant Physiology**, 22:771-781, 1995.
- MAXWELL, C. MARRISON, L. LEECH, R. M. GRIFFITHS, H. HORTON, P. Chloroplast acclimation in leaves of *Guzmania monostachia* in response to high light. **American Society of Plant Physiologists**, 121:89-95, 1999.
- MAXWELL, K. Resistance is useful: diurnal patterns of photosynthesis in C₃ and crassulacean acid metabolism epiphytic bromeliads. **Functional Plant Biology**, 29:679-687, 2002.
- McADAM, S. A.; BRODRIBB, T. J. Linking turgor with ABA biosynthesis: implications for stomatal responses to vapor pressure deficit across land plants. **Plant Physiology**, 171:2008-2016, 2016.
- McADAM, S. A.; SUSSMILCH, F. C.; BRODRIBB, T. J. Stomatal responses to vapour pressure deficit are regulated by high speed gene expression in angiosperms. **Plant, Cell and Environment**, 39:485-491, 2016b.
- MEDINA, E.; DELGADO, M.; TROUGHTTON, J. H.; MEDINA, J. D. Physiological ecology of CO₂ fixation in Bromeliaceae. **Flora**, 166:137-152, 1977.
- MEISNER, K.; WINKLER, U.; ZOTZ, G. Heteroblasty in bromeliads-anatomical, morphological and physiological changes in ontogeny are not related to the change from atmospheric to tank form. **Functional Plant Biology**, 40:251-262, 2013.
- MIN, M. K.; CHOI, E. H.; KIM, J. A.; YOON, I. S.; HAN, S.; LEE, Y.; LEE, S.; KIM, B. G. Two Clade A Phosphatase 2Cs Expressed in Guard Cells Physically Interact With Abscissic Acid Signaling Components to Induce Stomatal Closure in Rice. **Rice**, 12:37. 2019.

- MULLER, J.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Pools of non-structural carbohydrates in soybean root nodules during water stress. **Physiologia Plantarum**, 98:723-730, 1996.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15:473-497, 1962.
- MIOTO, P. T.; MERCIER, H. Absciscic acid and nitric oxide signaling in two different portions of detached leaves of *Guzmania monostachia* with CAM up-regulated by drought. **Journal of Plant Physiology**, 2013.
- NEGIN, B.; MOSHELION, M. The evolution of the role of ABA in the regulation of water-use efficiency: From biochemical mechanisms to stomatal conductance. **Plant in Science**, 251: 82-89, 2016.
- NETO, A. A. C. **Efeitos de diferentes fontes de nitrogênio e do deficit hídrico sobre o desenvolvimento e a modulação de metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) em plantas atmosféricas de *Guzmania monostachia*.** Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2017.
- NIEVOLA, C.; KRAUS, J.; FRESCHI, L.; SOUZA, B.; MERCIER, H. Temperature determines the occurrence of CAM or C₃ photosynthesis in pineapple plantlets grown in vitro. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 41:832-837, 2005.
- NORTH, G. B.; BRINTON, E. K.; BROWNE, M. G.; GILLMAN, M. G.; RODDY, A. B.; KHO, T. L.; WANG, E.; FUNG, V. A.; BRODERSEN, C. R. Hydraulic conductance, resistance, and resilience: how leaves of a tropical epiphyte respond to drought. **American Journal of Botany**, 106(7):943-957, 2019.
- O'LEARY, B.; PARK, J.; PLAXTON, W. C. The remarkable diversity of plant PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase): recent insights into the physiological functions and post-translational controls of non-photosynthetic PEPCs. **The Biochemical Journal**, 436:15–34, 2011.
- PANTIN, F.; SIMONNEAU, T.; ROLLAND, G.; DAUZAT, M.; MULLER, B. Control of leaf expansion: a developmental switch from metabolics to hydraulics. **Plant Physiology**, 156:803-815, 2011.

- PANTIN, F.; SIMONNEAU, T.; MULLER, B. Coming of leaf age: control of growth by hydraulics and metabolics during leaf ontogeny. **The New Phytologist**, 196:349-66, 2012.
- PANTIN, F.; MONNET, F.; JANNAUD, D.; COSTA, J. M.; RENAUD, J.; MULLER, B.; SIMONNEAU, T.; GENTY, B. The dual effect of abscisic acid on stomata. **New Phytologist**, 197:65-72, 2013a.
- PANTIN, F.; RENAUD, J.; BARBIER, F.; VAVASSEUR, A.; LETHIEC, D.; ROSE, C.; BARIAC, T.; CASSON, S.; MCLACHLAN, D. H.; HETHERINGTON, A. M.; MULLER, B.; SIMONNEAU, T. Developmental priming of stomatal sensitivity to abscisic acid by leaf microclimate. **Current Biology**, 23:1805-1811, 2013b.
- PARENT, B.; TARDIEU, F. Temperature responses of developmental processes have not been affected by breeding in different ecological areas for 17 crop species. **New Phytologist**, 194:760-774, 2012.
- PELEG, Z.; BLUMWALD, E. Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. **Current Opinion Plant Biology**, 14:290-295, 2011.
- PEREIRA, P. N.; PURGATTO, E.; MERCIER, H. Spatial division of phosphoenolpyruvate carboxylase and nitrate reductase activity and its regulation by cytokinins in CAM-induced leaves of *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae). **Journal of Plant Physiology**, 170:1067-1074, 2013.
- PEREIRA, P. N.; GASPAR, M.; SMITH, J. A. C. MERCIER, H. Ammonium intensifies CAM photosynthesis and counteracts drought effects by increasing malate transport and antioxidant capacity in *Guzmania monostachia*. **Journal of Experimental Botany**, 69:1993-2003, 2018.
- PETIT, M.; CÉRÉGHINO, R.; CARRIAS, J. F.; CORBARA, B.; DÉZERALD, O.; PETITCLERC, F.; DEJEAN, A.; LEROY, C. Are ontogenetic shifts in foliar structure and resource acquisition spatially conditioned in tank-bromeliads?. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 175:299-312, 2014.
- PIKART, F. C.; MARABESI, M. A.; MIOTO, P. T.; GONÇALVES, A. Z.; MATIZ, A.; ALVES, F. R. R.; MERCIER, H.; AIDAR, M. P. M. The contribution of weak

CAM to the photosynthetic metabolic activities of a bromeliad species under water deficit. **Plant Physiology and Biochemistry**, 123:297-303, 2018.

PINHEIRO, C.; ANTÔNIO, C.; ORTUÑO, M. F.; DOBREV, P. I.; HARTUNG, W.; THOMAS-OATES, J.; RICARDO, C. P.; VANKOVÁ, R.; CHAVES, M. M.; WILSON, J. C. Initial water deficit effects on *Lupinus albus* photosynthetic performance, carbon metabolism, and hormonal balance: metabolic reorganization prior to early stress responses. **Journal of Experimental Botany**, 62:4965-4974, 2011.

PINHEIRO, C.; CHAVES, M. M. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data?. **Journal of Experimental Botany**, 62:869-882, 2011.

PORTELA, R. C.; SANTOS, F. A. M. Alometria de plântulas e jovens espécies arbóreas: copa x altura. **Biota Neotropica**. 3:1-5, 2003.

QUARRIE, S. A.; JONES, H. G. Effects of abscisic acid and water stress on development and morphology of wheat. **Journal of Experimental Botany**, 28:192-203, 1977.

RABAS, A.; MARTIN, C. Movement of water from old to young leaves in three species of succulents. **Annals of Botany**, 92:529-536, 2003.

RAGHVENDRA, A. S.; GONUGUNTA, V. K.; CHIRSTMANN, A.; GRILL, E. ABA perception and signalling. **Trends Plant Science**, 15:395-401, 2010.

R CORE TEAM. 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL: <http://www.R-project.org/>

REINERT, F.; MEIRELLES, S. T. Water acquisition strategy shifts in the heterophyllous saxicolous Bromeliad, *Vriesea geniculata* (Wawra) Wawra. **Selbyana**, 14:80-88, 1993.

REYES-GARCÍA, C.; GRIFFITHS, H.; RINCÓN, E.; HUANTE, P. Niche differentiation in tank and atmospheric epiphytic bromeliads of a seasonally dry forest. **Biotropica**, 40:168-175, 2008.

- ROCHER, J. P.; PRIOUL, J. L.; LECHARNY, A.; JOUSSAUME, M. Genetic variability in carbon fixation, sucrose-P-synthase and ADP glucose pyrophosphorylase in maize plants of differing growth rate. **Plant Physiology**, 89: 416-420, 1989.
- RODRIGUES, M. A.; FRESCHI, L.; PEREIRA, P. N.; MERCIER, H. Interactions between nutrients and Crassulacean acid metabolism. **Progress in Botany**, 75: 167-186, 2014.
- RODRIGUES, M. A.; KERBAUY, G. B. Meristems: sources of youth and plasticity in plant development. **Hoehnea**, 36:525-549, 2009.
- RODRIGUES, M. A.; HAMACHI, L. MIOTO, P. T.; PURGATTO, E.; MERCIER, H. Implications of leaf ontogeny on drought-induced gradients of CAM expression and ABA levels in rosettes of the epiphytic tank bromeliad *Guzmania monostachia*. **Plant Physiology and Biochemistry**, 108:400-411, 2016.
- ROESSNER, U.; WAGNER, C.; KOPKA, J.; TRETHEWEY, R. N.; WILLMITZER, L. Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. **The Plant Journal**, 23:131-142, 2000.
- ROSENBERGER, C. L.; CHEN, J. To Grow or Not to Grow: TOR and SnRK2 Coordinate Growth and Stress Response in Arabidopsis. **Molecular Cell**, 69:3-4, 2018.
- SACK, L.; JOHN, G. P.; BUCKLEY, T. N. ABA accumulation in dehydrating leaves is associated with decline in cell volume not turgor pressure. **Plant Physiology**, 176:489-493, 2017.
- SANTINO, A.; TAURINO, M.; De DOMENICO, S.; BONSEGNA, S.; POLTRONIERI, P.; PASTOR, V.; FLORS, V. Jasmonate signaling in plant development and defense response to multiple (a)biotic stresses. **Plant Cell Report**, 32:1085-1098, 2013
- SANTNER, A.; CALDERON-VILLALOBOS, L. I. A.; ESTELLE, M. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. **Nature Chemical Biology**, 5:301-307, 2009.

- SCHMITT, J. M.; PIEPENBROCK, M. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase and crassulacean acid metabolism induction in *Mesembryanthemum crystallinum* L by cytokinin-modulation of leaf gene expression by roots. **Plant Physiology**, 99:1664-1669, 1992.
- SCHMIDT, G.; ZOTZ, G. Ecophysiological consequences of differences in plant size: *in situ* carbon gain and water relations of the epiphytic bromeliad, *Vriesea sanguinolenta*. **Plant, Cell & Environment**, 24:101-111, 2001.
- SEGATTO, F. B.; BISOGNIN, D. A.; BENEDETTI, M.; COSTA, L. C. da; RAMPELOTTO, M. V.; NICOLOSO, F. T. Técnica para o estudo da anatomia da epiderme foliar de batata. **Ciência Rural**, 34(5):1597-1601, 2004.
- SEKI, M.; ISHIDA, J.; NARUSAKA, M.; FUJITA, M.; NANJO, T.; UMEZAWA, T.; KAMIYA, A.; NAKAJIMA, M.; ENJU, A.; SAKURAI, T.; SATOU, M.; AKIYAMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; CARNINCI, P.; KAWAI, J.; HAYASHIZAKI, Y.; SHINOZAKI, K. Monitoring the expression pattern of around 7,000 Arabidopsis genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. **Functional & Integrative Genomics**, 2:282-291, 2002.
- SHARP, R. E.; POROYKO, V.; HEJLEK, L. G.; SPOLLEN, W. G.; SPRINGER, G. K.; BOHNERT, H. J.; NGUYEN, H. T. Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. **Journal Experimental of Botany**, 55: 2343-2351, 2004.
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, 58:221-227, 2007.
- SLESLAK, I.; KARPINSKA, B.; SURÓWKA, E.; MISZALSKI, Z.; KARPINSKI, S. (2003) Redox changes in the chloroplast and hydrogen peroxide are essential for regulation of C3/C4 transition and photooxidative stress responses in the facultative CAM plant *Mesembryanthemum crystallinum*. **Plant Cell Physiology**, 44:573-581, 2003.

- SMITH, J. A. C.; GRIFFITHS, H.; LÜTTGE, U.; CROOK, C. E.; GRIFFITHS, N. M.; STIMMEL, K. H. Comparative ecophysiology of CAM and C3 bromeliads - Plant water relations. **Plant Cell and Environment**, 9:395-410, 1986.
- SPENCE, R. D.; WU, H.; SHARPE, P.J. H.; CLARK, K. G. Water stress effects on guard cell anatomy and the mechanical advantage of the epidermal cells. **Plant, Cell and Environment**, 9:197-202, 1986.
- SPERDOULI, I.; MOUSTAKAS, M. Leaf developmental stage modulates metabolite accumulation and photosynthesis contributing to acclimation of *Arabidopsis thaliana* to water deficit. **Journal of Plant Research**, 127:481-489, 2014.
- SREENIVASULU, N.; SOPORY, S. K.; KISHOR, P. B. K. Deciphering the regulatory mechanisms of abiotic stress tolerance in plants by genomic approaches. **Gene**, 388, 1-13, 2007.
- SREENIVASULU, N.; HARSHAVARDHAN, V.; GOVIND, G.; SEILER, C.; KOHLI, A. Contrapuntal role of ABA: does it mediate stress tolerance or plant growth retardation under long-term drought stress?. **Gene**, 506:265-273, 2012.
- SULPICE, R.; PYL, E. T.; ISHIHARA, H.; TRENKAMP, S.; STEINFATH, M.; WITUCKA-WALL, H.; GIBON, Y.; USADEL, B.; POREE, F.; PIQUES, M. C.; KORFF, M. V.; STEINHAUSER, M. C.; JOOST, J.; KEURENTJES, B.; GUENTHER, M.; HOEHNE, M.; SELBIG, J. FERNIE, A. R.; ALTMANN, T. STITT, M. Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 106:10348-10353, 2009.
- SULPICE, R.; TRENKAMP, S.; STEINFATH, M.; USADEL, B.; GIBON, Y.; WITUCKA-WALL, H.; PYL, E. T.; TSCHOEP, H.; STEINHAUSER, M. C.; GUENTHER, M.; ROHWER, J. M.; ALTMANN, T.; FERNIE, A. R.; STITT, M. Network analysis of enzyme activities and metabolite levels and their relationship to biomass in a large panel of *Arabidopsis* accessions. **Plant Cell**, 22:2872–2893, 2010.
- SUSSMILCH, F. C.; BRODRIBB, T. J.; McADAM, S. A. What are the evolutionary origins of stomatal responses to abscisic acid in land plants? **Journal of Integrative Plant Biology**, 59:240-260, 2017.

- SVENNING, J. C. Small canopy gaps influence plant distribution in the rain forest understory. **Biotropica**, 32:252-261, 2000.
- SZYMANSKI, D. B. The kinematics and mechanics of leaf expansion: new pieces to the *Arabidopsis* puzzle. **Current Opinion in Plant Biology**, 22:141-148, 2014.
- TAKAHASHI, C. A.; MERCIER, H. Nitrogen metabolism in leaves of a tank epiphytic bromeliad: characterization of a spatial and functional division. **Journal of Plant Physiology**, 168:1208-1216, 2011.
- TAL, M.; IMBER, D. ITAI, C. Abnormal stomatal behavior and hormonal imbalance in flacca, a wilted mutant of tomato: I. Root effect and kinetin-like activity. **Plant Physiology**, 46:367-372, 1970.
- TANG, A. C.; BOYER, J. S. Growth-induced water potentials and the growth of maize leaves. **Journal of Experimental Botany**, 53:489-503, 2002.
- TARDIEU, F.; GRANIER, C.; MULLER, B. Water deficit and growth. Co-ordinating processes without an orchestrator?. **Current Opinion in Plant Biology**, 14:283-289, 2011.
- TAYBI, T.; SOTTA, B.; GEHRIG, H.; GUCLU, S.; KLUGE, M.; BRULFERT, J. Differential effects of abscisic acid on phosphoenolpyruvate carboxylase and CAM operation in *Kalanchoe blossfeldiana*. **Botanica Acta**, 198: 240-246, 1995.
- TAYBI, T.; CUSHMAN, J. C. Signaling events leading to Crassulacean acid metabolism induction in the common ice plant. **Plant Physiology**, 121:545-555, 1999.
- TAYBI, T.; CUSHMAN, J. C.; BORLAND, A. M. Environmental, hormonal and circadian regulation of crassulacean acid metabolism expression. **Functional Plant Biology**, 29: 669-678, 2002
- THALMANN, M.; PAZMINO, D.; SEUNG, D.; HERRER, D.; NIGRO, A.; MEIER, T.; KOLLING, K.; PFEIFHOLER, H. W.; ZEEMAN, S. C.; SANTELIA, D. Regulation of leaf starch degradation by abscisic acid is important for osmotic stress tolerance in plants. **The Plant Cell**, 28:1860-1878, 2016.

- THOMAS, J. C.; MCELWAIN, E. F.; BOHNERT, H. J. Convergent induction of osmotic stress responses. Absciscic acid, cytokinin, and the effects of NaCl. **Plant Physiology**, 100: 416-423, 1992.
- TIMPA, J. D.; BURKE, J. J.; QUISENBERRY, J. E.; WENDT, C. W. Effects of water stress on the organic acid and carbohydrate compositions of cotton plants. **Plant Physiology**, 82:724-728, 1986.
- TURGEON, R. The sink-source transition in leaves. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40:119-138, 1989.
- TURNER, N. C.; BEGG, J. E.; TONNET, M. L. Osmotic adjustment of sorghum and sunflower crops in response to water deficits and its influence on the water potential at which stomata close. *Australian Journal of Plant Physiology*, 5:597-608, 1978.
- VERSLUES, P. E.; AGARWAL, M.; KATIYAR-AGARWAL, S.; ZHU, J.; ZHU, J. K. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. **The Plant Journal**, 45:523-539, 2006.
- VISWAKARMA, K.; UPADHYAY, N.; KUMAR, N.; YADAV, G.; SINGH, J.; MISHRA, R. K.; KUMAR, V.; VERMA, R.; UPADHYAY, R. G.; PANDEY, M.; SHARMA, S. Absciscic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: A review on current knowledge and future prospects. **Frontiers Plant in Science**, 8:161, 2017.
- VOGELMANN, T. C.; MARTIN, G. The functional significance of palisade tissue: penetration of directional versus diffuse light. **Plant, Cell and Environment**, 16: 65-72, 1993.
- WALTER, A.; SILK, W. K.; SCHURR, U. Environmental effects on spatial and temporal patterns of leaf and root growth. **Annual review of plant biology**, 60:279-304, 2009.
- WEST-EBERHARD, M. J.; SMITH, J. A. C.; WINTER, K. Photosynthesis reorganized. **Science**, 332:311-312, 2011.

- WILKINSON, S. DAVIES, W. J. ABA-based chemical signaling: the coordination of responses to stress in plants. **Plant Cell Environment**, 25:195-210, 2002.
- WINTER, K.; GARCIA, M.; HOLTUM, J. A. M. On the nature of facultative and constitutive CAM: environmental and developmental control of CAM expression during early growth of *Clusia*, *Kalanchoë*, and *Opuntia*. **Journal of Experimental Botany**, 59:1829-1840, 2008.
- WOLTERS, H.; JURGENS, G. Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development. **Nature Reviews Genetic**, 10:305-317, 2009.
- XU, Z., ZHOU, G. Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. **Journal of Experimental Botany**, 59: 3317-3325, 2008.
- YOSHIDA, T.; CHRISTMANN, A.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; GRILL, E.; FERNIE, A. R. Revisiting the Basal Role of ABA - Roles Outside of Stress. **Trends in Plant Science**, 24: 625-635, 2019.
- ZANENGA-GODOY, R.; COSTA, C. G. Foliar anatomy of four species of genus *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) of the Brazilian Central Planalt. **Acta Botanica Brasilica**, 17(1):101-118, 2003.
- ZOTZ, G.; ANDRADE, J. L. Water Relations of Two co-Occurring Epiphytic Bromeliads. **Journal Plant Physiology**, 152: 545-554, 1997.
- ZOTZ, G.; HIETZ, P. The physiological ecology of vascular epiphytes: current knowledge, open questions. **Journal of Experimental Botany**, 52:2067-2078, 2001.
- ZOTZ, G.; REICHLING, P.; VALLADARES, F. 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, 2002.
- ZOTZ, G.; THOMAS, V. How much water is in the tank? Model calculations for two epiphytic bromeliads. **Annals of Botany**, 83:183-192, 1999.
- ZOTZ, G.; WILHELM, K.; BECKER, A. Heteroblasty: a review. **The Botanical Review**, 77:109-151, 2011.

ZOTZ, G.; WINTER, K. Short-term regulation of crassulacean acid metabolism activity in a tropical hemiepiphyte, *Clusia uvitana*. **Plant Physiology**, 102:835-841, 1993.