

Filipe Christian Pikart

Modificações bioquímicas e moleculares ajustam o uso da energia da luz em plantas de *Guzmania monostachia* induzidas ao CAM por deficiência hídrica

Biochemical and molecular modifications adjust the light-energy use of *Guzmania monostachia* plants induced to CAM by water deficit

São Paulo
2019

Filipe Christian Pikart

Modificações bioquímicas e moleculares ajustam o uso da energia da luz em plantas de *Guzmania monostachia* induzidas ao CAM por deficiência hídrica

Biochemical and molecular modifications adjust the light-energy use of *Guzmania monostachia* plants induced to CAM by water deficit

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências, na área de concentração botânica.

Orientadora: Dra. Helenice Mercier

São Paulo
2019

Resumo

A fotossíntese consiste na absorção da energia proveniente da radiação solar resultando na síntese de NADPH e ATP, os quais são utilizados na fixação do CO₂ com a consequente formação de carboidratos. Em condições de estresse, pode ocorrer redução na fixação de carbono devido ao fechamento dos estômatos, como também, uma alteração na capacidade de absorção e uso da luz, adequando o metabolismo à nova condição ambiental. O ambiente epifítico é caracterizado por uma disponibilidade reduzida de água e nutrientes, devido à falta de acesso à água e aos nutrientes presentes no solo. O suprimento hídrico acaba dependendo do regime de chuvas, expondo as plantas a uma seca intermitente. Algumas espécies respondem ao déficit hídrico com a indução do metabolismo ácido das crassuláceas (CAM), contribuindo para a manutenção de um balanço positivo do carbono e para uma economia hídrica. Esse metabolismo é caracterizado pela carboxilação noturna e formação de ácidos orgânicos e pela descarboxilação desses ácidos durante o dia. Estudos sugerem uma modulação do uso da energia pelo fotossistema II (PSII) em plantas CAM por meio da disponibilização do CO₂, o qual é fornecido via reação de descarboxilação. Dessa forma, momentos com alta atividade de descarboxilação coincidiriam com um maior uso fotoquímico da energia pelo PSII. Um exemplo de espécie que ocupa o ambiente epifítico e que, em resposta ao déficit hídrico, apresenta indução ao CAM e uma regulação negativa na sua capacidade de absorção da luz é a bromélia *Guzmania monostachia*. Para avaliar a influência da CO₂ proveniente da descarboxilação sobre o uso fotoquímico da energia pelo PSII e investigar possíveis modulações na composição e organização das proteínas do tilacoide com a indução do CAM, plantas de *G. monostachia* foram submetidas a 20 dias de seca e foram avaliados os seguintes parâmetros: 1) atividade da enzima PEPCK e expressão do gene que codifica para essa proteína, 2) eficiência quântica e dissipação não fotoquímica do PSII, 3) conteúdo de ácidos, 4) trocas gasosas, 5) organização dos complexos proteicos do tilacoide e abundância de proteínas do PSII, 6) proporção de clorofilas e carotenoides e 7) expressão de genes envolvidos em mecanismos de regulação transcricional de proteínas dos fotossistemas. Foi observada uma regulação pós-traducional e sugerida uma regulação transcricional da PEPCK

que possivelmente resultou em uma maior atividade de descarboxilação às 12:00h. Essa maior atividade coincidiu com o mesmo momento em que houve um maior uso fotoquímico da energia pelo PSII e menor dissipação não fotoquímica. Esse resultado indica fortemente a influência da disponibilidade de CO₂, pela descarboxilação dos ácidos, sobre o uso da energia pelo PSII já que não havia assimilação de CO₂ atmosférico. Adicionalmente, os resultados indicaram uma maior expressão, principalmente às 12:00h, de genes que codificam para cinases responsáveis pela fosforilação de proteínas do tilacoide. Uma maior fosforilação dessas proteínas pode causar uma mudança na disposição das membranas do tilacoide, o que poderia facilitar o transporte linear de elétrons, favorecendo a fixação de CO₂ em plantas CAM no momento de sua maior disponibilidade. Os resultados também mostraram uma redução na proporção de proteínas do PSII/PSI após 20 dias de seca. Sendo assim, a indução do CAM por déficit hídrico parece ser acompanhada por modificações bioquímicas e moleculares que ajustam a absorção e o uso da energia, auxiliando a sobrevivência de *G. monostachia* no ambiente epifítico, o qual está sujeito a períodos de seca intermitentes.

Palavras chave: PEPCK, ácido málico, tilacoide, fotossíntese, PSII, CAM.

Abstract

Photosynthesis is a light-energy absorption process that results in NADPH and ATP production, which can be used to assimilate CO₂ and produce carbohydrates. Stress conditions can decrease the photosynthetic rate due to stomatal closure limiting the atmospheric carbon assimilation and downregulating the capacity of light absorption. Epiphytic plants normally do not have access to soil moisture and nutrients, which characterizes this habitat as reduced in water and nutrient availability. As a result, the plants depend on rain for their water provisions and are frequently submitted to periods of drought. Some species can induce Crassulacean acid metabolism (CAM) when under water deficit, and this metabolism can conserve water and keep a positive carbon balance. This photosynthetic metabolism is characterized by nocturnal acidification due to transient CO₂ fixation in acid molecules and by a diurnal decarboxylation. Previous studies suggested a photosystem II (PSII) light-energy use modulation in CAM plants through CO₂ availability by the decarboxylation reaction. As a result, it was expected that the major decarboxylation activity would coincide with the time of the highest PSII photochemical efficiency. The bromeliad *Guzmania monostachia* is an example of an epiphytic species that responds to water deficit with CAM induction and downregulation of the light absorption capacity. To test the influence of CO₂ provided by the decarboxylation reaction over the PSII photochemical efficiency and to investigate the adjustment in composition and organization of thylakoid proteins with the CAM induction, we submitted plants of *G. monostachia* to 20 days of drought and evaluated the following parameters: 1) PEPCK enzyme activity and expression of the encoding gene, 2) PSII quantum efficiency and non-photochemical yield, 3) acid content, 4) net CO₂ exchange, 5) the organization of thylakoid protein complexes and amount of photosystem proteins, 6) chlorophyll and carotenoid rate, and 7) expression of genes involved in transcriptional regulation mechanisms of photosystem proteins. The results indicated a post-translational and a transcriptional regulation of PEPCK, which probably resulted in a high decarboxylation activity at 12:00h. This major activity coincided with the highest PSII photochemical efficiency and a minor non-photochemical quenching. These results strongly indicated the influence of CO₂ availability by PEPCK activity over the PSII energy use since the atmospheric

CO₂ uptake was null in water deficit plants. In addition, the results showed an upregulation, especially at 12:00h, of kinases transcript levels responsible for thylakoid protein phosphorylation. The increase in the phosphorylation of these proteins can induce changes in the thylakoid membrane conformation, which facilitates the linear electron transport, consequently powering the CO₂ assimilation in CAM plants, particularly at the time with the major availability of this gas. The results also indicated a reduction in PSII/PSI protein proportion after 20 days of drought. As a result, the CAM induction appears to be followed by biochemical and molecular modulations adjusting the light-energy absorption and use, which could facilitate the survival of this species under stressful conditions.

Key words: PEPCK, malic acid, thylakoid, photosynthesis, PSII, CAM.

1. Introdução geral

1.1. Fotossíntese: da luz ao açúcar

A fotossíntese é o processo biológico pelo qual a energia luminosa, proveniente da radiação solar, é convertida em energia química e estocada em moléculas de NADPH e ATP. Posteriormente essa energia química poderá ser utilizada para a construção de esqueletos carbônicos, como os açúcares, que serão utilizados para o crescimento e desenvolvimento dos organismos fotossintetizantes e de toda a cadeia alimentar (Junge, 2019). A fotossíntese costuma ser dividida em duas etapas ou fases: a fotoquímica e a bioquímica e ambas acontecem em uma organela denominada de cloroplasto. Essa organela é delimitada por um envoltório externo e um outro interno e no seu interior encontra-se o tilacoide, um extenso sistema de membranas de bicamada lipídica que pode se apresentar empilhado, denominada de lamela granal, formando uma estrutura conhecida como *granum*. O tilacoide pode também estar na forma não empilhada, conhecida como lamela estromal (Mechela *et al.*, 2019). Essa bicamada é responsável por delimitar dois espaços importantes para as reações fotossintéticas, sendo o espaço externo o estroma e o espaço interno conhecido como lume. A seguir serão apresentados detalhes sobre essas duas etapas que constituem a fotossíntese.

1.1.1. Etapa fotoquímica

A etapa fotoquímica consiste na obtenção de energia proveniente da radiação solar que dá início a uma cadeia de sucessivas oxidações e reduções com consequente formação de NADPH e ATP. A absorção de energia é desempenhada principalmente por duas estruturas compostas por proteínas e moléculas de clorofilas e carotenoides, denominadas de complexo antena I ou II (Drop *et al.*, 2014). As proteínas que compõem o complexo antena II (LHCII, sigla em inglês para light-harvesting complex II) podem ser classificadas em dois tipos: proteínas do complexo antena maior e proteínas do complexo antena menor (Dekker & Boekema, 2005). As primeiras são encontradas em maior abundância e na forma de trímeros, resultado de diferentes combinações entre três proteínas, Lhcb1, Lhcb2 e Lhcb3, codificadas pelos genes *Lhcb1*, *Lhcb2* e *Lhcb3* (Jansson, 1994; Gao *et al.*, 2018). Já as proteínas do complexo antena menor,

conhecidas como CP29, CP26 e CP24, codificadas pelos genes *Lhcb4*, *Lhcb5* e *Lhcb6*, ocorrem normalmente como monômeros e apresentam funções de 1) conexão entre os trímeros do complexo antena maior e a estrutura do fotossistema II (PSII, sigla em inglês para photosystem II), 2) regulação na transferência de energia, além de apresentar pequena capacidade de 3) captação da energia proveniente da radiação solar (Dekker & Boekema, 2005; Nicol & Croce, 2018). Após absorvida pelo LHCII, a energia é direcionada até o PSII, uma estrutura dimerizada composta por proteínas, moléculas de clorofila a e de feofitina (Ferreira *et al.*, 2004), levando à excitação de elétrons e ao início da cadeia de transporte de elétrons (Krause & Weis, 1991). O centro catalítico do PSII é composto pelas proteínas D1, D2, CP47 e CP43, codificadas pelos genes *PsbA*, *PsbD*, *PsbB* e *PsbC*. Em conjunto, D1 e D2 compõem o centro de reação e são responsáveis pelo processo de separação de carga e início do transporte de elétrons (Gao *et al.*, 2018). Já as proteínas CP47 e CP43 atuam como antena e na transferência de energia de outras partes do LHCII para o centro de reação.

O complexo antena I (LHCI), de igual modo, é composto por pigmentos (clorofilas a e b e carotenoides) e proteínas. A antena do fotossistema I (PSI) é organizada em dois dímeros, um composto por Lhca1 e Lhca4 e o outro por Lhca2 e Lhca3, codificados por *Lhca1* e *4* e *Lhca2* e *3* (Croce & van Amerongen, 2013; Nicol & Croce, 2018). Já o PSI apresenta uma estrutura menor que o PSII e o centro de reação é composto pelos monômeros PsaA (*PsaA*) e PsaB (*PsaB*), as maiores unidades nas quais a maior parte das clorofilas estão ancoradas, entretanto algumas unidades proteicas menores também coordenam alguns pigmentos (Caffarri *et al.*, 2014). No centro de reação do PSI também ocorre a separação de cargas e, conseqüentemente, o transporte de elétrons.

O transporte de elétrons que se dá entre o PSII e o PSI tem a participação de alguns outros elementos, como por exemplo as plastoquinonas e o complexo citocromo b₆f (Rochaix, 2011). Após o PSI, ainda se tem a participação, entre outros elementos, da FERREDOXIN-NADP⁺ REDUCTASE (FNR), resultando no armazenamento de energia em moléculas de NADPH. Uma singularidade marcante que diferencia o PSII do PSI é a presença de um complexo capaz de oxidar água, responsável pela reposição dos elétrons doados à cadeia de transporte de elétrons (Ferreira *et al.*, 2004). Por outro lado, os elétrons doados

pelo PSI são repostos pelos elétrons provenientes do PSII, mantendo a continuidade da cadeia e garantindo a produção de poder redutor.

O transporte de elétrons também é responsável pela formação de um potencial eletroquímico que é utilizado como força motriz pela ATP sintase, um complexo proteico responsável pela produção de ATP. Esse potencial eletroquímico é estabelecido pelo bombeamento de prótons H⁺ do estroma para o lume através da ação de plastoquinonas, e pelos prótons provenientes da oxidação da água, causando a acidificação do lume do tilacoide (Allen, 2002). Dessa forma, a intensificação do transporte de elétrons leva à uma redução acentuada do pH o que, por sua vez, induz uma via de dissipação de energia conhecida como ciclo das xantofilas. Na condição de pH ácido ocorre a ativação da enzima VIOLAXANTHIN DE-EPOXIDASE (VDE), responsável por converter a xantofila violaxantina em zeaxantina (Baker, 2008). As zeaxantinas associadas ao PSII apresentam grande capacidade em dissipar energia na forma de calor, protegendo o PSII de possíveis danos devido ao excesso de energia (Bilger & Björkman, 1990). Com o aumento do pH do lume ocorre a desativação da VDE e a ativação da ZEAXANTHIN EPOXIDASE (ZE), responsável por converter zeaxantina em violaxantina, resultando na redução da dissipação de energia (Baker, 2008). Assim, esse mecanismo atua regulando a energia que é utilizada por via não fotoquímica (por exemplo, dissipação de energia na forma de calor) e fotoquímica (transporte de elétrons para produção de NADPH) (Adams & Demmig-Adams, 1992).

1.1.2. Etapa bioquímica

A etapa bioquímica é responsável pela fixação do CO₂, através da atividade carboxilase da enzima **RIBULOSE-1,5-BISPHOSPHATE CARBOXYLASE/OXYGENASE** (RUBISCO) no ciclo de Calvin-Benson. Esse ciclo é composto por três etapas, sendo a carboxilação a primeira delas, seguido da etapa de redução e por último a de recuperação. Na primeira ocorre a carboxilação da ribulose-1,5-bisfosfato, levando à formação de duas moléculas de 3-fosfoglicerato. Esse produto, então, será convertido a 1,3-bisfosfoglicerato, com o consumo de ATP, que por sua vez será reduzido a gliceraldeído-3-fosfato. Percebe-se, então, que na fase de redução ocorre o consumo de NADPH e ATP e a produção de trioses fosfato. Já a terceira fase é chamada de regeneração,

quando o substrato inicial do ciclo, ribulose-1,5-bisfosfato é regenerado com o consumo de ATP (Gutteridge & Jordan, 2001). Essa etapa ocorre no estroma dos cloroplastos, onde as trioses podem ser convertidas e estocadas na forma de amido ou exportadas para o citosol, onde podem ser convertidas a sacarose e exportadas via floema para outras partes da planta (Eaton-Rye *et al.*, 2012). Dessa forma, é possível notar que as duas etapas da fotossíntese estão interligadas pela redução/oxidação do NADPH e consumo/síntese do ATP.

A reação de carboxilação pode ser regulada por diversos fatores, entre eles, a proporção na disponibilidade de CO₂ e O₂ tem importante papel, já que a RUBISCO apresenta tanto a atividade carboxilase quanto oxigenase. Essa característica é definida pela afinidade do sítio ativo da enzima por ambos os substratos e em condições em que ocorre um aumento na quantidade de O₂ em relação ao CO₂ a atividade oxigenase é favorecida (Kangasjärvi *et al.*, 2012). A oxigenação da ribulose-1,5-bisfosfato resulta na produção de 3-fosfoglicerato, mas também de 2-fosfoglicolato, que precisará passar por uma série de reações para ser convertido novamente a 3-fosfoglicerato. Essas reações ocorrem em três organelas, sendo cloroplasto, peroxissomo e mitocôndria e em cada uma ocorre a produção de alguns compostos marcantes, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) através da ação da GLYCOLATE OXIDASE (GLO1) no peroxissomo, o amônio (NH₄⁺) e o CO₂ através da mesma reação, realizada pela GLYCINE DECARBOXYLASE (GDP1) na mitocôndria (Busch, 2013). Esse conjunto de reações é conhecido como fotorrespiração e uma das suas características é a perda de carbono através do CO₂, o que é desvantajoso, quando se avalia a produtividade na forma de acúmulo de carbono. Além da perda de carbono, ocorre o consumo de energia para recuperar o 2-fosfoglicolato, para eliminar o H₂O₂ e assimilar o NH₄⁺.

Estresses abióticos muitas vezes podem influenciar as etapas fotoquímica e/ou bioquímica. Por exemplo, o fechamento estomático devido à falta de água, resulta na redução da taxa de trocas gasosas entre o mesófilo e a atmosfera, o que pode resultar no aumento da concentração de O₂ em relação ao CO₂ e assim, estimular a fotorrespiração. Outro exemplo de fator abiótico é a exposição excessiva à luz, podendo, por exemplo, afetar a forma como a energia provinda da luz é utilizada na etapa fotoquímica, onde possivelmente mais energia será destinada a via não fotoquímica e uma menor quantidade usada de fato para a

produção de poder redutor (Demmig-Adams & Adams III, 1992). A alta intensidade luminosa pode também regular o sistema de absorção e uso da energia através da modulação da transcrição de componentes da cadeia de transporte de elétrons. A proteína CHLOROPLAST SENSOR KINASE (CSK) apresenta capacidade de inibir a transcrição de genes que codificam para componentes do PSII e PSI. A atividade cinase dessa proteína é regulada pelo estado redox do cloroplasto, sendo inibida pela tiorredoxina reduzida, e conseqüentemente, removendo o efeito negativo da fosforilação sobre o fator de iniciação SIGMA FACTOR 1 (SIG1), promovendo a ligação do PLASTID-ENCODED RNA POLYMERASE (PEP) e a transcrição dos genes (Puthiyaveetil *et al.*, 2012). Outras proteínas também respondem ao estado redox da célula e desencadeiam respostas de transcrição, como a PROTEIN PLASTID REDOX INSENSITIVE 2 (PRIN2) (Kindgren *et al.*, 2012; Díaz *et al.*, 2018) e a SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE STN7 (STN7) (Wunder *et al.*, 2013). Essas respostas levam a uma adequação do metabolismo a mudanças nas condições do ambiente. Um ambiente em que as plantas estão submetidas a diversos fatores estressantes é o hábitat epifítico, o qual será apresentado no próximo tópico.

1.2. O hábito epifítico e a família Bromeliaceae

O hábito epifítico é caracterizado pelo estabelecimento de um indivíduo vegetal sobre um hospedeiro, estando assim sem acesso a água e nutrientes presentes no solo (Benzing, 2000). Adicionalmente, as plantas epífitas estão submetidas à intermitência na disponibilidade hídrica e, em alguns casos, à exposição sazonal ou até mesmo permanente à radiação solar excessiva (Maxwell *et al.*, 1995). Dessa forma, o ambiente epifítico impõe algumas limitações ao desenvolvimento dos vegetais, sendo comum registrar baixas taxas de crescimento desses indivíduos (Zotz & Hietz, 2001). Mesmo com essas condições adversas, esse habitat é ricamente ocupado, especialmente na região neotropical (Nieder *et al.*, 2001), típica região de ocorrência da família Bromeliaceae, que se destaca pelo alto número de espécies epífitas (Givnish *et al.*, 2011).

Bromélias epífitas apresentam algumas adaptações morfológicas e fisiológicas associadas à obtenção e economia hídrica, que podem estar

relacionadas com o sucesso na ocupação do ambiente epifítico. Essas adaptações podem ser exemplificadas pela abundância de tricomas absortivos, formação do tanque e o metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) (Crayn *et al.*, 2004). Os tricomas absortivos estão relacionados principalmente com a função de absorver água e nutrientes. De forma geral, as bromélias apresentam uma redução na proporção entre parte aérea e parte radicular e as raízes apresentam função majoritária de fixação ao hospedeiro, ao invés de absorção de nutrientes, a qual é desempenhada principalmente pelas folhas (Males, 2016). Nesse ponto os tricomas desempenham papel fundamental no suprimento de água e nutrientes, apresentando inclusive capacidade de absorver a água presente na neblina (Martorell & Ezcurra, 2007). Algumas espécies de bromélias apresentam maior densidade de tricomas na base foliar (Takahashi *et al.*, 2007; Kleingesinds *et al.*, 2018). Já outras espécies podem apresentar as folhas com uma distribuição mais uniforme dos tricomas, como é o caso de algumas espécies do gênero *Tillandsia* (Matiz *et al.*, 2013; Males, 2016). Muitas vezes a maior abundância de tricomas na base das folhas está acompanhada da presença do tanque, o que facilita a absorção de água e nutrientes, já que o tanque propicia o acúmulo de uma solução composta por água da chuva, detritos e excretas de animais (Benzing, 2000; Gonçalves *et al.*, 2016). O tanque pode ser descrito como uma estrutura constituída pela sobreposição da base das folhas, formando uma espécie de reservatório (Zotz *et al.*, 2011). Assim é possível notar que essas duas estratégias estão relacionadas com a aquisição de água pelo vegetal. Por outro lado, o CAM está mais associado a um uso mais eficiente da água já obtida. Mais detalhes serão apresentados a seguir.

1.3. *Metabolismo ácido das Crassuláceas*

O CAM é um tipo de metabolismo fotossintético caracterizado por uma variação diurna no conteúdo de ácidos, isto é, uma forma transiente de armazenamento do CO₂. Durante a noite ocorre a obtenção de CO₂ atmosférico, pela abertura dos estômatos e a sua fixação através da ação em sequência das enzimas PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE (PEPC) e MALATE DEHYDROGENASE (MDH), resultando na formação de malato que é armazenado no vacúolo na forma de ácido málico (Ranson & Thomas, 1960;

Winter, 2019). A abertura estomática durante a noite, resulta em uma menor perda de água por mol de CO₂ absorvido, já que a umidade relativa do ar normalmente é mais alta nesse período do dia, resultando em um uso mais eficiente da água quando comparado com espécies C₃ e C₄. Durante o período claro, ocorre a redução no conteúdo de ácidos devido a sua descarboxilação, e como os estômatos normalmente estão fechados, o CO₂ é acumulado no sítio ativo da RUBISCO (Niechayev *et al.*, 2019).

Alguns autores sugerem que o CAM surgiu em diversos momentos na história evolutiva das plantas e a ausência da necessidade de enzimas além das já presentes em espécies C₃ provavelmente contribuiu para esse surgimento em diferentes momentos e grupos (Crayn *et al.*, 2004; Mioto *et al.*, 2015). Baseado nisso, foi proposta a existência de um gradiente entre espécies C₃ e CAM onde diferentes níveis de absorção noturna de CO₂ e de acúmulo de ácidos podem ser notados (Winter *et al.*, 2015; Niechayev *et al.*, 2019). Dentro desse gradiente, temos espécies que apresentam um padrão de abertura estomática típico de plantas C₃, ou seja, sem absorção de CO₂ durante a noite, denominadas de CAM cycling. Já um outro grupo, classificado como CAM idling, apresenta os estômatos fechados tanto durante o dia como durante a noite. Em ambos grupos a acidificação noturna é devido a refixação do CO₂ proveniente da respiração e o nível de acúmulo de ácidos normalmente é menor do que o apresentado por plantas CAM clássicas, ou seja, as que apresentam o padrão noturno de abertura estomática.

Algumas espécies ainda apresentam a fotossíntese C₃ quando em boas condições hídrica, de temperatura, nutricional e de luz, porém são induzíveis a algum nível de CAM quando ocorre variação nessas condições (Maxwell *et al.*, 1995; Nievola *et al.*, 2005; Herrera, 2009; Winter & Holtum, 2014). Essas espécies são caracterizadas como CAM facultativas e normalmente retornam ao estado C₃ com o reestabelecimento de boas condições ambientais, propiciando crescimento e desenvolvimento. Nesses casos o CAM é visto como uma estratégia de enfrentamento às condições adversas, principalmente o CAM idling, já que é um metabolismo que não promove o crescimento devido ao constante fechamento estomático.

O estudo do CAM em espécies facultativas tem gerado avanços importantes no entendimento sobre esse tipo fotossintético, como dos processos

de sinalização em resposta aos estresses abióticos (Freschi *et al.*, 2010a; Mioto & Mercier, 2013; Pereira *et al.*, 2013); efeito na economia hídrica, atividade fotossintética e produtividade durante períodos de seca (Pikart *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2019); relações filogenéticas entre C₃ e CAM (Crayn *et al.*, 2015); e tem sido de essencial importância no entendimento de quais genes são recrutados para o funcionamento do CAM (Cushman *et al.*, 2008b). Exemplo disso é a identificação de uma isoforma da PEPC que apresenta transcrição induzida com a transição do C₃ para o CAM (Cushman *et al.*, 1989). Recentemente, pesquisadores têm proposto estratégias para programar o CAM em espécies C₃ de interesse agrícola com o objetivo de aumentar a eficiência no uso da água por essas espécies (Borland *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2015; Winter, 2019). No entanto, ainda são necessárias outras investigações visando entender melhor o funcionamento desse metabolismo, assim como compreender o efeito da seca sobre a expressão de genes relacionados ao metabolismo fotossintético. Nesse sentido, espécies com fotossíntese CAM facultativa são excelentes modelos de estudo e podem contribuir para o avanço do conhecimento sobre a expressão do CAM nos vegetais. Um exemplo de espécie CAM facultativa é a *Guzmania monostachia* (L.) Rusby ex Mez (Medina, 1974).

1.4. *Guzmania monostachia* como modelo de estudo

Guzmania monostachia é uma bromélia epífita que apresenta tanque na sua fase adulta e que é induzida ao CAM idling após sete dias de déficit hídrico (Freschi *et al.*, 2010b; Kleingesinds *et al.*, 2018). Pode ser encontrada desde o sul da América do norte, em regiões da América central e norte da América do Sul (Pittendrigh, 1948; Smith *et al.*, 1986; Maxwell *et al.*, 1994). No Brasil é classificada como uma espécie vulnerável e pode ser encontrada principalmente no estado do Ceará nas formações vegetais de floresta ombrófila densa e estacional semidecidual e em brejos de altitude da Caatinga (Martinelli *et al.*, 2008; Martinelli & Moraes, 2013).

Estudos anteriores realizados no laboratório de fisiologia do desenvolvimento vegetal (IB-USP) demonstraram a existência de uma divisão funcional nas folhas dessa bromélia em três regiões distintas (base, mediana e ápice) (Freschi *et al.*, 2010b; Mioto & Mercier, 2013; Pereira *et al.*, 2013; Abreu *et al.*, 2018; Kleingesinds *et al.*, 2018; Pikart *et al.*, 2018). Onde a base estaria

mais relacionada à função de absorção de água e nutrientes, atuando como uma porção drenos por apresentar maior quantidade de hidrênquima e de tricomas e uma maior concentração de açúcares solúveis, tais como glicose, frutose e sacarose. Já o ápice é a porção com maior expressão de parâmetros relacionados ao CAM, como atividade da PEPC e MDH e acúmulo noturno de ácidos, quando exposta ao déficit hídrico. Entre as porções, o ápice é a que apresenta a maior exposição à luz, densidade estomática, quantidade de pigmentos fotossintetizantes e de amido, atuando dessa forma como fonte. Ainda para *G. monostachia*, foi demonstrado que o CAM pode contribuir de forma significativa para manter um balanço positivo de carbono, sugerindo que esse tipo fotossintético atua como uma estratégia para manutenção da atividade fotossintética durante períodos de seca (Pikart *et al.*, 2018). Além disso, os resultados desse mesmo estudo sugeriram que a disponibilidade de ácidos poderia influenciar o uso da energia pelo PSII devido a regulação na disponibilidade de CO₂ pela descarboxilação desses ácidos. Entretanto, existem poucas informações a respeito da fase clara do CAM, especificamente sobre a descarboxilação dos ácidos orgânicos, e da influência da seca, a qual essa espécie está submetida em seu ambiente natural, sobre a estrutura e funcionamento do PSII. Além disso, o significado fisiológico das alterações observadas na expressão de genes responsivos à seca, incluindo genes relacionados à fotossíntese, ainda é muito pouco compreendido (Pinheiro & Chaves, 2011). Com base nessas informações, algumas questões foram propostas:

- 1) Ocorreria modulação na atividade de descarboxilação e, conseqüentemente, na disponibilidade de CO₂ através de regulação transcricional e pós-traducional da enzima PEPCCK?
- 2) A modulação no uso da energia pelo PSII acompanharia a atividade de descarboxilação dos ácidos?
- 3) Com a indução do CAM ocorreria um ajuste no conteúdo de pigmentos e proteínas do tilacoide, o que poderia ajustar o aporte de energia para a planta?
- 4) Esse ajuste nas proteínas estaria sob algum controle transcricional, como o já conhecido controle da cinase CSK sobre certos genes do centro de reação do PSII e PSI?

2. Objetivo

Investigar modulações da atividade de descarboxilação diurna dos ácidos orgânicos, da composição pigmento-proteica das membranas do tilacoide e do uso da energia pelo PSII de plantas de *G. monostachia* induzidas ao CAM como resposta ao déficit hídrico. Para alcançar esse objetivo algumas estratégias foram adotadas:

- 1) Avaliar a atividade de descarboxilação por meio de ensaio seletivo à forma ativa da enzima PEPCCK e a expressão do gene que codifica para essa proteína.
- 2) Mensurar o uso fotoquímico e não-fotoquímico da energia pelo fotossistema II.
- 3) Investigar modificações no conteúdo de clorofilas e na proporção entre clorofilas e carotenoides.
- 4) Avaliar possíveis modulações na composição proteica e arranjo dos complexos proteicos das membranas do tilacoide.
- 5) Averiguar abundância de proteínas do PSII e PSI e a expressão dos respectivos genes codificantes.
- 6) Investigar o perfil transcricional de elementos reguladores da transcrição e da fosforilação de componentes do PSII e PSI.

3. Considerações finais

Plantas de *Guzmania monostachia* apresentaram indução ao CAM com 20 dias de déficit hídrico imposto pela suspensão da rega, observado pelo aumento significativo no acúmulo noturno de ácidos, característica marcante desse tipo fotossintético. Após sete dias de reidratação, as plantas que passaram pelo período de seca recuperaram o conteúdo hídrico, a obtenção de CO₂ atmosférico, assim como apresentaram valores equivalentes aos do controle em relação à máxima capacidade fotoquímica. Sugere-se dessa forma que plantas de *G. monostachia* possuem capacidade de sobreviver a períodos de seca de, pelo menos, 20 dias.

A espécie quando submetida à seca apresentou regulação transcricional e pós-traducional da enzima PEPCK, observado pelo aumento nos transcritos da *PEPCK* e na modulação da atividade de descarboxilação, possivelmente devido a um controle por fosforilação. Essa regulação resultou na maior atividade de descarboxilação observada às 12:00h, momento em que também ocorreu uma redução no conteúdo de ácidos, resultando em uma provável elevação da concentração interna de CO₂. Os resultados indicam fortemente uma modulação no uso da energia pelo PSII de plantas CAM, já que foi observada uma flutuação no uso fotoquímico e não-fotoquímico da energia pelo PSII. De forma interessante, ocorreu aumento no uso fotoquímico e redução no não-fotoquímico no mesmo momento em que ocorreu a máxima atividade de descarboxilação. Adicionalmente, sugere-se que o incremento no nível de transcritos das cinases STN7 e STN8, principalmente ao meio dia, acarretou a fosforilação de componentes do centro de reação do PSII e do LHCII. A fosforilação desses componentes pode ter levado a alterações na conformação das membranas do tilacoide, propiciando o transporte linear de elétrons e a produção de NADPH, necessário para a fixação do CO₂.

A condição de seca resultou na regulação positiva da transcrição de *PRIN2* e *CSK*, o que, possivelmente, resultou em acréscimo do aparato que regula a transcrição de genes do PSII e PSI e que é responsivo ao estado redox, principalmente a tiorredoxina reduzida. De fato, foi observado aumento na transcrição de *PsbA*, *PsbC* e *PsaA* às 7:00h e 17:00h, momentos do dia com menor eficiência fotoquímica do PSII e, possivelmente, abundância da

tioredoxina na sua forma reduzida. Adicionalmente, os resultados indicam que a regulação positiva na transcrição de *PsaA* foi mantida ao meio dia, já que os níveis de seus transcritos e do seu regulador (*STN7*) estavam aumentados. Entretanto, mesmo com o acréscimo na abundância de transcritos de genes *Psb*, foi observado redução nos níveis das proteínas analisadas, sugerindo um controle na tradução/processamento dessas proteínas do PSII. Dessa forma, os resultados indicam uma modulação na maquinaria fotossintética, caracterizada pela redução no conteúdo de proteínas do PSII e aumento de componentes do PSI. Foi observado também incremento na abundância da subunidade gama da ATP sintase, o que, possivelmente, resultou na adequação da capacidade de síntese de ATP, ajustando o metabolismo à demanda energética da fotossíntese CAM.

Dessa forma, os resultados apresentados indicam um ajuste tanto bioquímica quanto molecular, influenciando o uso da energia pelo PSII de plantas induzidas ao CAM como resposta à seca.

Referências bibliográficas

- Abreu ME, Carvalho V, Mercier H. 2018. Antioxidant capacity along the leaf blade of the C₃-CAM facultative bromeliad *Guzmania monostachia* under water deficit conditions. *Functional Plant Biology* 45, 1–10.
- Adams WW, Demmig-Adams B. 1992. Operation of the xanthophyll cycle in higher plants in response to diurnal changes in incident sunlight. *Planta* 186, 390–398.
- Allen JF. 2002. Photosynthesis of ATP-electrons, proton pumps, rotors, and poise. *Cell* 110, 273–276.
- Baker NR. 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annual review of plant biology* 59, 89–113.
- Benzing DH. 2000. Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation. *Systematic Biology* 54, 340–344.
- Bilger W, Björkman O. 1990. Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research* 25, 173–185.
- Borland AM, Hartwell J, Weston DJ, Schlauch KA, Tschaplinski TJ, Tuskan GA, Yang X, Cushman JC. 2014. Engineering Crassulacean acid metabolism to improve water-use efficiency. *Trends in Plant Science* 19, 327–338.
- Busch FA. 2013. Current methods for estimating the rate of photorespiration in leaves. *Plant Biology* 15, 648–655.
- Caffarri S, Tibiletti T, Jennings R, Santabarbara S. 2014. A comparison between plant photosystem I and photosystem II architecture and functioning. *Current Protein & Peptide Science* 15, 296–331.
- Crayn DM, Winter K, Schulte K, Smith JAC. 2015. Photosynthetic pathways in Bromeliaceae: phylogenetic and ecological significance of CAM and C₃ based on carbon isotope ratios for 1893 species. *Botanical Journal of the Linnean Society* 178, 169–221.
- Crayn DM, Winter K, Smith JAC. 2004. Multiple origins of Crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the neotropical family Bromeliaceae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 3703–8.

- Croce R, van Amerongen H. 2013. Light-harvesting in photosystem I. *Photosynthesis Research* 116, 153–166.
- Cushman JC, Agarie S, Albion RL, Elliot SM, Taybi T, Borland AM. 2008a. Isolation and characterization of mutants of common ice plant deficient in crassulacean acid metabolism. *Plant physiology* 147, 228–38.
- Cushman JC, Meyer G, Michalowski CB, Schmitt JM, Bohnert HJ. 1989. Salt stress leads to differential expression of two isogenes of phosphoenolpyruvate carboxylase during Crassulacean acid metabolism induction in the common ice plant. *The Plant cell* 1, 715–725.
- Cushman JC, Tillett RL, Wood JA, Branco JM, Schlauch KA. 2008b. Large-scale mRNA expression profiling in the common ice plant, *Mesembryanthemum crystallinum*, performing C₃ photosynthesis and Crassulacean acid metabolism (CAM). *Journal of Experimental Botany* 59, 1875–1894.
- Dekker JP, Boekema EJ. 2005. Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1706, 12–39.
- Demmig-Adams B, Adams III WW. 1992. Responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43, 599–626.
- Díaz MG, Hernández-Verdeja T, Kremnev D, Crawford T, Dubreuil C, Strand Å. 2018. Redox regulation of PEP activity during seedling establishment in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Communications* 9, 1–12.
- Drop B, Webber-Birungi M, Yadav SKN, Filipowicz-Szymanska A, Fusetti F, Boekema EJ, Croce R. 2014. Light-harvesting complex II (LHCII) and its supramolecular organization in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1837, 63–72.
- Eaton-Rye JE, Tripathy BC, Sharkey TD. 2012. *Photosynthesis* (JJ Eaton-Rye, BC Tripathy, and TD Sharkey, Eds.). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Ferreira KN, Iverson TM, Maghlaoui K, Barber J, Iwata S. 2004. Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science* 303, 1831–1838.
- Freschi L, Rodrigues MA, Domingues DS, Purgatto E, Van Sluys M-A, Magalhaes JR, Kaiser WM, Mercier H. 2010a. Nitric oxide mediates the hormonal control of Crassulacean acid metabolism expression in young pineapple plants. *Plant physiology* 152, 1971–85.

- Freschi L, Takahashi CA, Cambui CA, Semprebom TR, Cruz AB, Mioto PT, Versieux LM, Calvente A, Latansio-Aidar SR, Aidar MPM, Mercier H. 2010b. Specific leaf areas of the tank bromeliad *Guzmania monostachia* perform distinct functions in response to water shortage. *Journal of Plant Physiology* 167, 526–533.
- Gao J, Wang H, Yuan Q, Feng Y. 2018. Structure and function of the photosystem supercomplexes. *Frontiers in Plant Science* 9, 1–7.
- Givnish TJ, Barfuss MHJ, Van Ee B, et al. 2011. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *American journal of botany* 98, 872–95.
- Gonçalves AZ, Mercier H, Oliveira RS, Romero GQ. 2016. Trade-off between soluble protein production and nutritional storage in Bromeliaceae. *Annals of Botany* 118, 1199–1208.
- Gutteridge S, Jordan DB. 2001. Dynamics of photosynthetic fixation: control, regulation and productivity. In: *Regulation of photosynthesis*. Kluwer Academic Publishers, 297–312.
- 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.
- Inoue E, Yamauchi J. 2006. AMP-activated protein kinase regulates PEPCCK gene expression by direct phosphorylation of a novel zinc finger transcription factor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 351, 793–799.
- Jansson S. 1994. The light-harvesting chlorophyll a b-binding protein. *BBA - Bioenergetics* 1184, 1–19.
- Junge W. 2019. Oxygenic photosynthesis: history, status and perspective. *Quarterly Reviews of Biophysics* 52, e1.
- Kangasjärvi S, Neukermans J, Li S, Aro EM, Noctor G. 2012. Photosynthesis, photorespiration, and light signaling in defense responses. *Journal of Experimental Botany* 63, 1619–1636.
- Kindgren P, Kremnev D, Blanco NE, De Dios Barajas López J, Fernández AP, Tellgren-Roth C, Small I, Strand Å. 2012. The plastid redox insensitive 2 mutant of *Arabidopsis* is impaired in PEP activity and high light-dependent plastid redox signalling to the nucleus. *Plant Journal* 70, 279–291.

- Kleingesinds CK, Gobara BNK, Mancilha D, Rodrigues MA, Demarco D, Mercier H. 2018. Impact of tank formation on distribution and cellular organization of trichomes within *Guzmania monostachia* rosette. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 243, 11–18.
- Krause GH, Weis E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42, 313–349.
- Males J. 2016. Think tank: water relations of Bromeliaceae in their evolutionary context. *Botanical Journal of the Linnean Society* 181, 415–440.
- Martinelli G, Moraes M. 2013. Livro vermelho da flora do Brasil. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Martinelli G, Vieira CM, Gonzalez M, Leitman P, Piratininga A, Costa AF da, Forzza RC. 2008. Bromeliaceae da Mata Atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. *Rodriguésia* 59, 209–258.
- Martorell C, Ezcurra E. 2007. The narrow-leaf syndrome: A functional and evolutionary approach to the form of fog-harvesting rosette plants. *Oecologia* 151, 561–573.
- Matiz A, Tamaso P, Yepes A, Freschi L, Mercier H. 2013. CAM photosynthesis in bromeliads and agaves: What can we learn from these plants? *Photosynthesis. InTech*, 91–134.
- Maxwell C, Griffiths H, Borland A, Young A, Broadmeadow M, Fordham M. 1995. Short-term photosynthetic responses of the C₃-cCAM epiphyte *Guzmania monostachia* var. *monostachia* to tropical seasonal transitions under field conditions. *Functional Plant Biology* 22, 771–781.
- Maxwell C, Griffiths H, Young AJ. 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.
- Mechela A, Schwenkert S, Soll J. 2019. A brief history of thylakoid biogenesis. *Open Biology* 9, 1–12.
- Medina E. 1974. Dark CO fixation, habitat preference and evolution within the Bromeliaceae. *Evolution* 28, 677–686.
- Mioto PT, Mercier H. 2013. Abscisic acid and nitric oxide signaling in two different portions of detached leaves of *Guzmania monostachia* with CAM up-

- regulated by drought. *Journal of Plant Physiology* 170, 996–1002.
- Mioto PT, Rodrigues MA, Matiz A, Mercier H. 2015. CAM-like traits in C₃ plants: biochemistry and stomatal behavior. In: *Progress in Botany. Progress in Botany*. Cham: Springer International Publishing, 195–209.
- Nicol L, Croce R. 2018. Light harvesting in higher plants and green algae. In: *Light Harvesting in Photosynthesis*. CRC Press, 59–76.
- Niechayev NA, Pereira PN, Cushman JC. 2019. Understanding trait diversity associated with crassulacean acid metabolism (CAM). *Current Opinion in Plant Biology* 49, 74–85.
- Nieder J, Prosperí J, Michaloud G. 2001. Epiphytes and their contribution to canopy diversity. *Entomologia Experimentalis et Applicata*.51–63.
- Nievola CC, Kraus JE, Freschi L, Souza BM, Mercier H. 2005. Temperature determines the occurrence of CAM or C₃ photosynthesis in pineapple plantlets grown in vitro. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 41, 832–837.
- Pereira PN, Purgatto E, Mercier H. 2013. Spatial division of PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE and nitrate reductase activity and its regulation by cytokinins in CAM-induced leaves of *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae). *Journal of Plant Physiology* 170, 1067–1074.
- Pikart FC, Marabesi MA, Mioto PT, Gonçalves AZ, Matiz A, Alves FRR, Mercier H, Aidar MPM. 2018. The contribution of weak CAM to the photosynthetic metabolic activities of a bromeliad species under water deficit. *Plant Physiology and Biochemistry* 123, 297–303.
- Pinheiro C, Chaves MM. 2011. Photosynthesis and drought: Can we make metabolic connections from available data? *Journal of Experimental Botany* 62, 869–882.
- Pittendrigh CS. 1948. The bromeliad-anopheles-malaria complex in Trinidad. I- The bromeliad flora. *Evolution* 2, 58–89.
- Puthiyaveetil S, Ibrahim IM, Allen JF. 2012. Oxidation-reduction signaling components in regulatory pathways of state transitions and photosystem stoichiometry adjustment in chloroplasts. *Plant, Cell and Environment* 35, 347–359.
- Ranson SL, Thomas M. 1960. Crassulacean acid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology* 11, 81–110.

- Rochaix J. 2011. Regulation of photosynthetic electron transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1807, 375–383.
- Shen Z, Dong XM, Gao ZF, Chao Q, Wang BC. 2017. Phylogenic and phosphorylation regulation difference of PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE of C₃ and C₄ plants. *Journal of Plant Physiology* 213, 16–22.
- Silva LD, Gomes FP, Oliveira PS, Almeida FR, Pirovani CP, Laviola BG, do Amaral JFT. 2019. Plasticity of photosynthetic metabolism in *Jatropha curcas* genotypes under water deficit. *Genetics and Molecular Research* 18, 1–17.
- Smith JAC, Griffiths H, Luttge U. 1986. Comparative ecophysiology of CAM and C₃ bromeliads. I. The ecology of the Bromeliaceae in Trinidad. *Plan* 9, 359–376.
- Takahashi CA, Ceccantini GCT, 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, 119–126.
- Winter K. 2019. Ecophysiology of constitutive and facultative CAM photosynthesis. *Journal of experimental botany*, 1–14.
- Winter K, Holtum JAM. 2014. Facultative Crassulacean acid metabolism (CAM) plants: Powerful tools for unravelling the functional elements of CAM photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 65, 3425–3441.
- Winter K, Holtum J a M, Smith JAC. 2015. Crassulacean acid metabolism: a continuous or discrete trait? *New Phytologist*, 1–6.
- Wunder T, Liu Q, Aseeva E, Bonardi V, Leister D, Pribil M. 2013. Control of STN7 transcript abundance and transient STN7 dimerisation are involved in the regulation of STN7 activity. *Planta* 237, 541–558.
- Yang X, Cushman JC, Borland AM, et al. 2015. A roadmap for research on crassulacean acid metabolism (CAM) to enhance sustainable food and bioenergy production in a hotter, drier world. *New Phytologist* 207, 491–504.
- Zotz G, Hietz P. 2001. The physiological ecology of vascular epiphytes: current knowledge, open questions. *Journal of experimental botany* 52, 2067–2078.
- Zotz G, Wilhelm K, Becker A. 2011. Heteroblasty—A Review. *The Botanical Review* 77, 109–151.