Bruno Nobuya Katayama Gobara

**Caracterização da capacidade de indução ao CAM em plantas de
Vriesea gigantea (Bromeliaceae) sob déficit hídrico.**

**Characterization of the capacity to induce CAM in plants of *Vriesea*
gigantea (Bromeliaceae) under water deficit.**

São Paulo

2015

Bruno Nobuya Katayama Gobará

**Caracterização da capacidade de indução ao CAM em plantas de
Vriesea gigantea (Bromeliaceae) sob déficit hídrico.**

**Characterization of the capacity to induce CAM in plants of *Vriesea*
gigantea (Bromeliaceae) under water deficit.**

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

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

São Paulo

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Gobara, Bruno Nobuya Katayama

Caracterização da capacidade de indução ao CAM em plantas de *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae) sob déficit hídrico.

Número de páginas: 62

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

1.Déficit hídrico 2. Metabolismo ácido das crassuláceas 3. Bromélia epífita I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Helenice Mercier

Orientadora

RESUMO

Embora a água seja o componente mais abundante na natureza, ela é o fator limitante mais comum para o desenvolvimento das plantas. O estresse hídrico é um dos principais fatores abióticos que afeta os organismos vivos, incluindo as plantas epífitas. Esse sinal ambiental atua fortemente e seletivamente sobre a sobrevivência dessas plantas. Algumas espécies vegetais possuem a capacidade de alterar seu metabolismo fotossintético, sendo induzidas ao metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) em resposta a escassez d'água. *Vriesea gigantea* é uma bromélia C₃ tanque-epífita que pode estar sujeita a variações ambientais, como a sazonalidade hídrica. A expressão facultativa do CAM pode ser de extrema importância para essa bromélia lidar com a restrição hídrica sazonal. O CAM é uma adaptação caracterizada principalmente pela fixação do carbono atmosférico durante a noite por meio da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC). Em decorrência do fechamento estomático na maior parte do dia, a eficiência no uso da água das plantas CAM é maior do que a das plantas que realizam as fotossínteses C₃ ou C₄. O CAM pode ser expresso em diferentes intensidades o que levou à caracterização de diversos tipos de CAM, como o C₃-CAM facultativo. Estudos sobre o metabolismo fotossintético com *Vriesea gigantea* são raros na literatura. Apesar de *V. gigantea* ser considerada uma planta C₃ na literatura, resultados preliminares obtidos em nosso laboratório, utilizando folhas destacadas, sugeriram que essa espécie seria CAM-"cycling" quando bem hidratada e sob déficit hídrico passaria a expressar o CAM-"idling" na porção apical das folhas. Portanto, tendo em vista essa aparente contradição, nos propusemos a fazer um estudo mais aprofundado sobre o comportamento fotossintético de *V. gigantea*. Para tanto, plantas dessa espécie ($\pm$ 4 anos de idade) foram submetidas ao déficit hídrico por 7, 14 ou 21 dias por meio da suspensão de rega no tanque. Após o tratamento, as folhas dessa bromélia foram separadas em 3 grupos: jovens (G1) (1º ao 7º nó), intermediárias (G2) (8º ao 14º nó) e maduras (G3) (15º ao 21º nó). Os parâmetros utilizados para a análise da expressão do CAM foram as atividades das enzimas fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) e malato desidrogenase (MDH), juntamente com o acúmulo noturno de ácidos orgânicos (malato e citrato) nos diferentes grupos e porções foliares (ápice, mediana e base). Para melhor compreensão do metabolismo fotossintético, foi realizado um ciclo complementar de 24 horas, detalhando melhor a dinâmica do malato e citrato nas folhas de *V. gigantea* no

21º dia de deficiência hídrica. Para conhecer o "status" hídrico das plantas, foram determinados o potencial hídrico e o teor relativo de água (TRA) por meio das análises de massa fresca, massa túrgida e massa seca. Ao final do período de 21 dias de suspensão de rega, as plantas alcançaram o nível mais baixo de potencial hídrico o qual se estabilizou, indicando que *V. gigantea* possivelmente estava sob estresse hídrico. A queda do TRA já tinha sido observada, no entanto, a partir do 14º dia de déficit hídrico, sendo mais intenso no 21º dia. Notou-se uma tendência de remobilização hídrica entre os tecidos foliares dessa planta, principalmente de folhas maduras (G3) para folhas jovens (G1). Após 21 dias de deficiência hídrica, as atividades enzimáticas de PEPC e MDH apresentaram um comportamento que não seguiu um padrão de expressão característico do CAM, ou seja, uma alta atividade noturna de PEPC e MDH em situação de deficiência hídrica. A princípio, encontrou-se um acúmulo noturno de ácidos orgânicos (malato e citrato) no grupos foliares G1, G2 e G3 ao longo dos 21 dias de tratamento. Entretanto, foi observado no ciclo de 24 horas de acúmulo de ácidos orgânicos, que essa variação de malato e citrato encontrada inicialmente, era decorrente de pequenas flutuações e que estas não estariam relacionadas ao CAM. Assim, sugere-se que *V. gigantea* não utilize o CAM como estratégia de evitação à seca. Conjuntamente, observou-se um acúmulo de açúcares solúveis ao longo do ciclo de 24 horas em todas as porções foliares, indicando que *Vriesea gigantea* apresenta, talvez, mecanismos eficientes de abaixamento de seu potencial hídrico, acumulando compostos que possuem função osmoreguladora (glicose e frutose, por exemplo). Essa estratégia pode ser considerada como um mecanismo importante que ajudaria a tolerar o período de estresse hídrico de 21 dias de suspensão de rega no tanque.

ABSTRACT

Although water is the most abundant component in nature, it is also the most common limiting factor for plant growth. Drought stress is a major abiotic factor that affect living organisms, including epiphytes. This environmental signal acts strongly and selectively on the survival of plants. Some plant species have the ability to change their photosynthetic metabolism, being induced to crassulacean acid metabolism (CAM) in response to water shortage. *Vriesea gigantea* is a C₃ epiphyte tank bromeliad that may be subject to environmental variations such as the water seasonality. The facultative expression of CAM can be extremely important for this bromeliad deal with seasonal water restriction. CAM is an adaptation characterized mainly by the fixation of atmospheric carbon overnight by phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC), to power photosynthesis during daytime with closed stomata. As a result, the water use efficiency of CAM plants is higher than that of the plants that perform photosynthesis C₃ or C₄. CAM can be expressed in different intensities leading to the characterization of various types of CAM, such as C₃-CAM facultative. Studies on the photosynthetic metabolism with *Vriesea gigantea* are rare in the literature. Although *V. gigantea* is considered a C₃ plant, preliminary results obtained in our Laboratory using detached leaves suggested that this species would become CAM-cycling when well hydrated, while under water deficit it would express CAM-idling in the apical portion of the leaves. Therefore, in light of this apparent contradiction, we set out to further study the photosynthetic behavior of *V. gigantea*. Plants of this species ($\pm$ 4 years) were submitted to drought for 7, 14 or 21 days by suspending watering in the tank. After the treatment, the leaves of this bromeliad were separated into 3 groups: young (G1) (1st to 7th node), intermediate (G2) (8th to 14th node) and mature (G3) (15th to 21th node). The parameters used for the analysis of CAM expression were the activities of the enzymes phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) and malate dehydrogenase (MDH), along with nighttime accumulation of organic acids (malate and citrate) in the different groups and leaf portions (apex, middle and base). To better understand the photosynthetic metabolism, there was a complementary 24-hour cycle, further detailing the dynamics of malate and citrate in *V. gigantea* leaves on the 21st day of water stress. To evaluate the water status of the plants, water potential and relative water content (TRA) were determined, the latter through the fresh, turgid and dry weight analysis. At the end of 21 days of

watering suspension, the plants reached the lowest level of water potential, indicating that the plants were under drought stress. The drop in the TRA had already been noted, however, from the 14th day of water stress, intensifying in the 21th day. A tendency of water remobilization among the leaf tissues of the plant, especially from mature leaves (G3) to young leaves (G1) was observed. After 21 days of drought, the enzymatic activities of PEPC and MDH showed a behavior that did not follow a characteristic pattern of expression of CAM, *i.e.* a high nocturnal activity of PEPC and MDH in water stress situation. Initially it was found a nighttime accumulation of organic acids (citrate and malate) on the leaf groups G1, G2 and G3 during the 21 days of treatment. However, it was observed in a 24-hour quantification of organic acids that the variation of malate and citrate concentrations found initially was due to small fluctuations probably unrelated to CAM. Thus, it is suggested that *V. gigantea* can not undergo CAM as an avoidance strategy to drought. We observed an accumulation of soluble sugars over the 24 hour cycle in all leaf portions, indicating that *Vriesea gigantea* has perhaps efficient mechanisms to lower its water potential by accumulating compounds with osmorregulator function (glucose and fructose, for example). This strategy can be seen as an important mechanism that helps tolerate water stress during 21 days of watering suspension in the tank.

I. INTRODUÇÃO

I.1. A família Bromeliaceae e o hábito epifítico

O hábitat epífita representa um ambiente muito dinâmico, sujeito a variações temporais e espaciais de intensidade luminosa, disponibilidade de água e de nutrientes (FRESCI *et al.*, 2010a). Estima-se que cerca de 10% das plantas vasculares sejam epífitas, porém poucos táxons estão representados nesse ambiente, sendo a grande maioria monocotiledôneas (BENZING, 1990). Em algumas florestas pluviais neotropicais, as espécies epífitas podem constituir até 50% do total da flora vascular (BENZING, 2000). Dessa maneira, as plantas epífitas são responsáveis por grande parte da diversidade biológica, tornando as florestas tropicais, o mais complexo de todos os sistemas terrestres (GENRY & DODSON, 1987; BENZING, 2000).

Dentro das monocotiledôneas, destaca-se a família Bromeliaceae, a segunda maior representante em número de espécies epífitas entre as angiospermas (BENZING, 1987). Essa família possui aproximadamente 3.140 espécies distribuídas em 58 gêneros e em 8 subfamílias: Bromelioideae, Puyoideae, Pitcairnioideae, Navioideae, Hechtioideae, Tillandsioideae, Lindmanioideae e Brocchinioideae (GIVNISH *et al.*, 2007; GIVNISH *et al.*, 2011; STEVENS, 2013; GIVNISH *et al.*, 2014). As espécies dessa família sofreram uma extensa radiação adaptativa, podendo ocupar ambientes extremos e apresentar hábitos que variam de terrestre a epifítico (RANKER *et al.*, 1990). Podem ser encontradas desde o nível do mar até altitudes que chegam a 4000 metros, em regiões úmidas e desérticas, em locais com muita ou pouca luminosidade, apresentando adaptabilidade a vários tipos de ambientes (LEME & MARIGO, 1993; MEDINA, 1990). As bromélias mostram pouca variação no número de cromossomos e possuem seu centro de diversidade em quatro regiões montanhosas, incluindo a América Central, Andes, Escudo das Guianas e a Serra do Mar (GIVNISH *et al.*, 2011, 2014).

Devido ao seu pronunciado epifitismo e à sua importância ecológica em zonas tropicais e subtropicais, por muitos anos a família Bromeliaceae tem atraído a atenção de pesquisadores (CAMBUI, 2009). Dentre os vários interesses de investigação, está a elucidação das diversas adaptações que permitem às bromélias viver em habitats tão inóspitos. Exemplos são os trabalhos publicados por BENZING (1973), BENZING *et al.* (1976), BENZING *et al.* (1978), NYMAN *et al.* (1987) dentre muitos outros, que

documentaram a existência da combinação de especializações funcionais e morfológicas únicas para sobreviver no ambiente epifítico. Uma das adaptações constatada foi a presença de tanque, isto é, a estrutura formada por folhas parcialmente sobrepostas e dispostas em torno do eixo caulinar em forma de roseta, criando um reservatório de água e de detritos orgânicos (BENZING, 2000). Devido às bromélias epífitas com tanque serem extremamente dependentes das reservas de água no tanque, as suas folhas passaram a ser consideradas o mais importante órgão vegetativo, devido à sua capacidade de absorver e assimilar os nutrientes através de tricomas (estruturas especializadas localizadas na superfície da folha) (PITTENDRIGH, 1948; McWILLIAMS, 1974; BENZING, 1980, 1990, 2000; CRAYN *et al.*, 2004; TAKAHASHI *et al.*, 2007; SCHULTE *et al.*, 2009).

1.2. *Vriesea gigantea* e a fisiologia das folhas das bromélias

A subfamília Tillandsioideae, à qual pertence o gênero *Vriesea*, apresenta nove gêneros e aproximadamente 1100 espécies, sendo que os gêneros *Tillandsia*, *Vriesea* e *Guzmania*, comportam o maior número de espécies: 540, 230 e 175, respectivamente (COSTA, 2002; PAGGI, 2009; DONADÍO *et al.*, 2014). A bromélia epífita *Vriesea gigantea* Gaud é endêmica da Mata Atlântica, podendo ser encontrada desde o estado do Espírito Santo até o Rio Grande do Sul (SILVA, 2008).

A folha de uma bromélia tanque pode ser dividida em pelo menos três regiões principais: a porção basal, a qual forma o tanque e, portanto, geralmente em contato com a água e nutrientes (BENZING, 1990) e as porções mediana e apical que estão mais expostas à luz do que a basal (POPP *et al.*, 2003).

São raros os trabalhos que apresentam a existência de diferenças morfológicas, anatômicas ou fisiológicas entre regiões distintas de uma mesma folha em bromélias, sendo o Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal do IB-USP um dos poucos que prioriza em suas pesquisas as análises dessas diferenças fisiológicas entre as três porções foliares citadas anteriormente (TAKAHASHI *et al.*, 2007, TAKAHASHI & MERCIER, 2011). TAKAHASHI *et al.* (2007) sugeriram a existência de uma divisão espacial de funções ao longo da folha de bromélias tanque, uma vez que foram observadas diferenças anatômicas e fisiológicas nas distintas regiões foliares.

Popp *et al.* (2003) verificaram que nos tecidos foliares de *Bromelia humilis*, *Aechmea fendler*, *Tillandsia flexuosa* e *Ananas comosus* há um gradiente de

concentração de ácidos orgânicos ao longo da folha, aumentando da base para o ápice. Esse gradiente de concentração de ácidos orgânicos ao longo da folha também foi observado em *Guzmania monostachia* (PIKART, 2014).

TAKAHASHI & MERCIER (2011) observaram para *Vriesea gigantea* que as atividades da nitrato redutase (NR) e glutamina sintetase (GS) variaram nas diferentes porções foliares, sendo que, no período iluminado, a atividade de ambas as enzimas foi maior na porção foliar apical do que na basal. Portanto, há fortes indícios da existência de uma divisão funcional entre as diferentes regiões das folhas de bromélias, em relação à assimilação do nitrogênio.

I.3. Déficit hídrico e metabolismo ácido das crassuláceas (CAM)

A seca é um dos principais fatores abióticos que afeta os organismos vivos, principalmente as plantas epífitas que vivem ancoradas nas copas das árvores, atuando fortemente sobre a sobrevivência dessas espécies (BENZING, 1990). As plantas epífitas tendem a apresentar xeromorfismo. Possuem certas adaptações que lhes permite sobreviver às mudanças nas condições ambientais, principalmente em relação à falta de água. (AKINCI & LOSER, 2012). As plantas sob condições severas de estresse hídrico tendem a desenvolver características xeromórficas, como o menor número de estômatos por unidade de área foliar, menores estômatos, células da epiderme e células do mesófilo menores, maior densidade de pelos e paredes da epiderme externa mais espessas e apresentando cutícula (AKINCI & LOSER, 2012). Essas adaptações foliares estão entre os principais fatores que favorecem o sucesso de uma espécie em um ambiente com restrições hídricas (KUMMEROW, 1980). Dentre outras respostas fisiológicas ao estresse hídrico, em relação à proteção contra desidratação, pode ser destacado o controle do fechamento estomático, o qual reduz sensivelmente a transpiração (TAIZ & ZAIGER, 2009).

Com desencadeamento do fechamento estomático ocorre uma maior conservação do conteúdo hídrico na planta, o qual pode resultar em um aumento no uso eficiente da água. Algumas espécies epífitas possuem a capacidade de alterar o seu metabolismo fotossintético, sendo induzidas ao metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) em resposta à escassez de água.

A fotossíntese CAM ocorre em aproximadamente 16.000 espécies de 328 gêneros pertencentes a 33 famílias (HERRERA, 2009). Esse metabolismo é uma importante adaptação das plantas a ambientes com baixa disponibilidade hídrica, uma

vez que os estômatos das plantas CAM se abrem à noite, quando a umidade relativa do ar é mais alta e se fecham durante o dia, comportamento oposto ao apresentado pelas plantas C_3 ou C_4 (WINTER *et al.*, 2005). Algumas espécies apresentam grande plasticidade quanto ao tipo de fotossíntese que realizam, podendo regular a fotossíntese CAM de acordo com as condições ambientais.

O CAM tem por característica proporcionar às plantas uma maior eficiência no uso da água, uma vez que desloca parcialmente ou totalmente a captação atmosférica do CO_2 para o período de maior umidade relativa do ar, que geralmente é durante a noite. Adicionalmente, o CAM (clássico) é caracterizado também por um fluxo intenso de carbono diário proveniente dos carboidratos, como amido e sacarose, para a síntese de ácidos orgânicos, como malato, citrato e isocitrato, que são armazenados durante o período escuro para seu uso durante o período de luz (FRESCHI *et al.*, 2010b). Em plantas com esse tipo de fotossíntese, o CO_2 é fixado durante o período escuro através da ação da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC), que utiliza o CO_2 como substrato, além do fosfoenolpiruvato (PEP), dando origem ao oxaloacetato (OAA). Este, então, é convertido em malato por ação da enzima malato desidrogenase (MDH). O malato é transportado para o interior do vacúolo, juntamente com íons H^+ , causando a acidificação noturna característica de plantas CAM. Durante o período de luz, o malato é liberado para fora do vacúolo e descarboxilado, sendo o CO_2 gerado refixado pela enzima ribulose bifosfato carboxilase oxigenase (RUBISCO - ciclo C_3). A descarboxilação do malato no citossol provoca uma diminuição da acidez nas células (KERBAUY *et al.*, 2012). Há uma discussão ainda no meio científico se esse metabolismo, além de proporcionar uma maior eficiência no uso da água, pode trazer outras vantagens à planta, como a proteção do aparato fotossintético contra a fotoinibição, quando há baixa disponibilidade de água ou alta irradiância (LUTTGE, 2004; PIKART, 2014).

O CAM pode se expressar em diferentes intensidades, gerando um contínuo entre o metabolismo C_3 e o CAM forte (SILVERA *et al.*, 2010). Outros tipos de CAM (diferentes do clássico explicado anteriormente) são encontrados como o CAM “*idling*”, o qual é capaz de reciclar o CO_2 respirado, numa condição extrema quando os estômatos encontram-se fechados tanto durante o dia quanto à noite (por exemplo, sob condição de déficit hídrico severo). Dessa maneira, as flutuações na acidez dos tecidos fotossintéticos no ciclo dia/noite são devidas ao malato produzido proveniente da reciclagem do CO_2 respirado. O CAM “*cycling*”, por sua vez, mostra flutuações na

acidez nos tecidos fotossintéticos no ciclo diurno e pouca ou nenhuma assimilação noturna de carbono, sendo considerado uma forma basal do CAM. Existem também espécies chamadas CAM constitutivas ou obrigatórias, em que o CAM é expresso nos tecidos fotossintéticos dependendo única e exclusivamente da maturidade dos tecidos fotossintéticos. O C₃-CAM facultativo, também conhecido como CAM induzível, tem sua ocorrência em plantas que manifestam o CAM em respostas a estímulos ambientais (SILVEIRA *et al.*, 2010). Essa capacidade de indução ao CAM parece ser mais importante para o balanço hídrico, a fotoproteção e a reprodução da planta do que para a aquisição de carbono, já que a maioria das plantas induzíveis já estudadas apresenta, em média, uma assimilação noturna menor do que 30% do balanço de carbono (HERRERA *et al.*, 2009).

A maioria dos estudos em relação aos sinais ambientais que regulam a expressão do CAM tem se focado na espécie *Mesembryanthemum crystallinum* (THOMAS *et al.*, 1992; SCHIMITT & PIEPENBROCK, 1992; TAYBI & CUSHMAN, 1999; CUSHMAN, 2001; TAYBI *et al.*, 2002). Essa espécie tem sido proposta por alguns autores como uma planta modelo para estudos da indução do CAM, tendo em vista sua facilidade de cultivo em condições de laboratório, seu rápido ciclo de vida e seu genoma relativamente pequeno (CUSHMAN, 2001; CUSHMAN & BORLAND, 2002; CUSHMAN *et al.*, 2008). Entretanto, assim como outras espécies pertencentes à família Aizoaceae, *M. crystallinum* sofre uma transição gradual do metabolismo C₃ para o CAM ao longo da ontogenia. Essa transição pode ocorrer mesmo na ausência dos sinais ambientais indutores do CAM, tais como, alterações no fotoperíodismo, déficit hídrico ou salinidade (HERPPICH *et al.*, 1992; CUSHMAN, 2001; CUSHMAN & BORLAND, 2002). Além disso, a indução do CAM nessa espécie ocorre de modo irreversível, impossibilitando, portanto, avaliar os mecanismos de sinalização envolvidos na reversão da fotossíntese CAM para C₃.

Em compensação, sabe-se que as espécies C₃-CAM facultativas pertencentes às famílias Clusiaceae e Bromeliaceae podem alternar entre a fotossíntese C₃ e CAM de maneira rápida e reversível em resposta a alterações ambientais, independentemente da ontogenia foliar ou da planta (SMITH *et al.*, 1986; MAXWELL *et al.*, 1995; ZOTZ & WINTER, 1993; BORLAND *et al.*, 1998; CUSHMAN & BORLAND, 2002; LUTTGE, 2006).

FRESCHI *et al.* (2010b), em um trabalho realizado no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal do IB-USP, verificaram que diferentes regiões das folhas

de *Guzmania monostachia*, uma bromélia epífita com tanque, podiam ter papéis distintos durante as respostas fisiológicas provocadas por uma das variáveis mais importantes no nicho das epífitas: a disponibilidade de água. A ausência quase completa de estômatos e os baixos níveis de clorofila e carotenoides sugeriram pouca atividade fotossintética na região basal da folha. Diferentemente, as regiões foliares fora da área do tanque exibiram um conjunto de características indicativas de alta capacidade fotossintética, como elevada densidade estomática, grande contribuição do clorênquima para a espessura do mesofilo e grande quantidade de clorofilas e carotenoides. Além do mais, os níveis de acidez noturna e atividades de algumas enzimas do CAM, na porção basal, mostraram pouca ou nenhuma mudança em resposta ao déficit hídrico. Por outro lado, o tratamento de indução ao CAM por suspensão da rega aumentou a acidez noturna principalmente na porção apical da folha, onde foi detectada a maior atividade das enzimas do metabolismo CAM.

Anteriormente, POPP *et al.* (2003) obtiveram resultados semelhantes em sete espécies de bromélias submetidas ao déficit hídrico, sendo uma delas do gênero *Guzmania* (*Guzmania mucronata*). Eles detectaram uma menor acumulação de malato na região basal da folha em comparação às porções apical e mediana e propuseram que, provavelmente, existiria um gradiente longitudinal de concentração de ácidos orgânicos na folha que acompanharia um aumento de idade dos tecidos e da exposição à luz no sentido da base para o ápice da lâmina foliar.

Os resultados obtidos por POPP *et al.* (2003) e por FRESCHI *et al.* (2010b) relativos às respostas fisiológicas ao longo da folha são fortes indícios de que a intensificação do CAM no ápice da folha de *Guzmanias* sp. pode estar associada com o desenvolvimento foliar, com o incremento geral da capacidade fotossintética do tecido, com a maior incidência de luz e com a menor restrição à realização de trocas gasosas nessa porção. Portanto, a intensificação do CAM em resposta à seca não ocorre homogeneamente ao longo da lâmina foliar nessas bromélias.

Há relatos de ocorrência de espécies C₃-CAM facultativas também nos gêneros *Greigia*, *Puya*, *Billbergia*, *Wittrockia*, *Catopsis*, *Nidularium* e *Vriesea* (MARTIN, 1994; BENZING, 2000).

Embora existam poucos estudos sobre fotossíntese em *Vriesea gigantea*, essa bromélia tem sido classificada na literatura como C₃ (BENZING, 2000). Entretanto, estudos preliminares conduzidos em nosso laboratório demonstraram que essa espécie, também apresenta certa flexibilidade em expressar o CAM quando submetida a certo

período de escassez de água. MATIZ (2012), trabalhando com folhas destacadas de *V. gigantea*, observou que após 8 dias de escassez hídrica (induzida por PEG 6000 30%), houve uma queda significativa no teor de água na região basal da folha, em comparação com as regiões mediana e apical. Também foi observado que a porção apical apresentou um aumento significativo na atividade da PEPC e nos acúmulos noturnos de citrato e malato, sugerindo que essa porção pode expressar o CAM quando submetida ao déficit hídrico. No entanto, quando folhas de plantas adultas de *Vriesea gigantea* foram coletadas na natureza após um período de seca (1 mês), e posteriormente no início do período de chuva, foi observado que em ambas as épocas tanto a região mediana quanto a apical acumularam citrato e malato à noite, indicando que nas duas situações as folhas expressam algum grau de CAM. Portanto, essa bromélia epífita seria um bom modelo de estudo, para aprofundar os conhecimentos existentes sobre uma possível transição metabólica de C₃ para CAM quando exposta à escassez hídrica.

I.3.1. CAM e ontogenia foliar

Sabe-se que a expressão do CAM apresenta grande plasticidade sob influência do desenvolvimento dos tecidos, podendo estar relacionado com a capacidade de armazenamento de malato nos vacúolos (JONES, 1975). Além disso, sabe-se que os transcritos da fosfoenolpiruvato carboxilase cinase, a enzima que fosforila a PEPC ativando-a, detectados em coletas noturnas aumentam com a idade da folha (NIMMO, 2000).

JONES (1975), estudando o efeito da idade na resistência foliar e trocas gasosas em *Bryophyuum fedtschenko*, uma planta CAM, observou que há uma plasticidade da expressão do CAM, em relação ao desenvolvimento foliar. Folhas jovens apresentaram fotossíntese C₃, com baixa resistência foliar, captando CO₂ durante o dia e eliminando o CO₂ durante a noite. Já as folhas maduras, apresentaram a fotossíntese CAM, com alta resistência foliar no período diurno e baixa no período noturno, invertendo o período de captação de CO₂. Trabalhos realizados por MARKOVSKA & DIMITROV (2001), sobre o efeito da idade foliar na trocas gasosas e acumulação de malato em *Marrubium frivaldskyanum* (Lamiaceae), planta C₃-CAM facultativa, mostraram a plasticidade da expressão do CAM em relação ao desenvolvimento foliar; onde folhas mais jovens apresentaram menor acúmulo de malato em relação às folhas mais velhas. Os resultados obtidos por JONES (1975) e MARKOVSKA & DIMITROV (2001), relativos às idades

foliares e grau de expressão do CAM, seriam fortes indícios de que este metabolismo pode estar associado com a ontogenia foliar ao longo da planta.

I.4. Justificativa

Uma das linhas de nosso Laboratório que vem sendo desenvolvida há mais de 10 anos trata da influência de fatores ambientais e endógenos sobre a expressão da fotossíntese CAM em bromélias. Tem-se mostrado que bromélias epífitas com tanque podem apresentar fotossíntese C₃-CAM facultativa, como é o caso da bromélia *Guzmania monostachia*. Essa bromélia é capaz de alternar entre esses dois tipos de fotossíntese de maneira bastante rápida e intensa. Essa mudança parece ocorrer em diferentes graus de intensidade ao longo do comprimento das folhas, sendo mais pronunciada na porção apical. Apesar de *V. gigantea* ter sido reportada na literatura como planta C₃, dados obtidos em nosso Laboratório com folhas destacadas sugeriram que essa espécie seria CAM-"cycling" quando bem hidratada e sob déficit hídrico passaria a expressar o CAM-"idling" na porção apical das folhas. Essa bromélia pareceu ter a capacidade de expressar o CAM em folhas destacadas quando submetidas ao PEG 6000 30% por 8 dias (resultados obtidos por outro aluno do Laboratório). O acúmulo de malato ocorreu em diferentes graus de intensidade ao longo do comprimento das folhas, sendo mais pronunciado no ápice foliar.

Assim sendo, diante dos estudos prévios realizados no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal, os quais geraram informações a respeito de *Vriesea gigantea* em relação à sua capacidade de alterar o tipo de fotossíntese de C₃ para CAM em folhas destacadas e sob deficiência hídrica, o presente trabalho visou aprofundar os conhecimentos sobre o metabolismo fotossintético dessa espécie, utilizando a planta inteira. Questionamos se as folhas de *V. gigantea*, quando ligadas à planta-mãe, teriam a capacidade de expressar a fotossíntese CAM sob déficit hídrico. Neste caso, será que poderiam ser realmente consideradas C₃-CAM facultativas? Portanto, pretendeu-se analisar os principais parâmetros bioquímicos envolvidos na expressão do CAM na planta inteira submetida à escassez d'água, como, por exemplo, as atividades das enzimas fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) e malato desidrogenase (MDH) foliares, além do acúmulo noturno de ácidos orgânicos (malato e citrato).

II. CONCLUSÕES

De acordos com os dados obtidos nesse trabalho, é possível indicar algumas conclusões sobre a caracterização do metabolismo fotossintético de *Vriesea gigantea* submetida à deficiência hídrica:

- O estresse hídrico foi detectado ao longo dos 21 dias, através da queda do potencial hídrico e da perda de água ao longo dos tecidos foliares. Houve uma clara tendência de remobilização hídrica entre os tecidos foliares dessa planta, principalmente de folhas maduras para as jovens.
- Ontogeneticamente, o estágio de desenvolvimento das folhas jovens expandidas (grupo G2) pôde ser considerado como um grupo que melhor apresentou respostas fisiológicas nesse estudo de deficiência hídrica.
- Durante o estresse hídrico, o acúmulo de carboidratos solúveis pareceu ter um papel de osmorregulação, para que houvesse um ajuste osmótico eficiente, bem como serviria como matéria-prima (esqueleto carbônico) para a formação de compostos orgânicos, como malato e citrato.
- Como resposta ao período de déficit hídrico de até 21 dias, pôde-se concluir que *Vriesea gigantea* não possui plasticidade para alterar seu metabolismo fotossintético de C₃ para CAM nas condições testadas neste trabalho.

III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKINCI, S.; LOSEL, D. M. The soluble sugars determination in *Cucurbitaceae* species under water stress and recovery periods. **Advances in Environmental Biology**, 3(2):175-183, 2009.
- AKINCI, S.; LOSEL, D. M. The effects of water stress and recovery periods on soluble sugars and starch content in cucumber cultivars. **Fresenius Environmental Bulletin**, 19(2):164-171, 2010.
- AKINCI, S.; LOSEL, D. M. Plant water-stress response mechanisms. In: RAHMAN, I. M. D. M. Water stress. **InTech**, 16-42, 2012.
- AMARAL, L. I. V.; GASPAR, M.; COSTA, P. M. F.; AIDAR, M. P. M.; BUCKERIDGE, M. S. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoehnea**, 34:425-431, 2007.
- AMIARD, V.; MORVAN-BERTRAND, A.; BILLARD, J. P.; HUAULT, C.; KELLER, F.; HOMME, M. P. P. Fructans, but not the sucrosyl-galactosides, raffinose and loliose, are affected by drought stress in Perennial Ryegrass. **Plant Physiology**, 132:2218-2229, 2003.
- 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.
- BENZING, D. H. Mineral nutrition and related phenomena in Bromeliaceae and Orchidaceae. **The Quarterly Review of Biology**, 48(2):277-290, 1973.
- BENZING, D. H.; HENDERSON, K.; KESSEL, B.; SULAK, J. The absorptive capacities of bromeliad trichomes. **American Journal of Botany**, 63(7):1009-1014, 1976.
- BENZING, D. H.; SEEMANN, J.; RENFROW, A. The foliar epidermis in Tillandsioideae (Bromeliaceae) and its role in habitat selection. **American Journal of Botany**, 65 (3): 359-365, 1978.
- BENZING, D. H. **Biology of the Bromeliads**. Mad River Press, Eureka, CA, 1980.
- BENZING, D. H. Vascular epiphytism: taxonomic participation and adaptive diversity. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 74 (2): 183-204, 1987.
- 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.

- BLACKMAN, S. A.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. **Plant Physiology**, 100:225-230, 1992.
- BORLAND, A. M.; GRIFFITHS, H.; MAXWELL, C.; BROADMEADOW, M. S. J.; GRIFFITHS, N.; BARNES, J. D. On the ecophysiology of the Clusiaceae in Trinidad: expression of CAM in *Clusia minor* L. during the transition from wet to dry season and characterization of three endemic species. **New Phytologist**, 122: 349-357, 1992.
- BORLAND, A.M.; TECSI, L. I.; LEEGOOD, R. C.; WALKER, R. P. Inducibility of crassulacean acid metabolism (CAM) in *Clusia* species; physiological/biochemical characterisation and intercellular localization of carboxylation and decarboxylation processes in three species which exhibit different degrees of CAM. **Planta**, 205:342-351, 1998.
- BOHNERT, H. J.; NELSON, D. E.; JENSEN, R. G. Adaptations to environmental stresses. **Plant Cell**, 7:1099-1111, 1995.
- BRENAC, P.; HORBOWICZ, M.; DOWNER, S. M.; DICKERMN, A. M.; SMITH, M. E. OBENDORF, R. L. Raffinose accumulation related to desiccation tolerance during maize (*Zea mays* L.) seed development and maturation. **Journal Plant Physiology**, 150:481-488, 1997.
- CAMBUÍ, C. A.; GASPAR, M.; MERCIER, H. Detection of urease in the cell wall and membranes from leaf tissues of bromeliad species. **Physiology Plantarum**, 136 (1): 86-93, 2009.
- CANO, F. J.; LÓPEZ, R.; WARREN, C. R. Implications of the mesophyll conductance to CO₂ for photosynthesis and water-use efficiency during long-term water stress and recovery in two contrasting *Eucalyptus* species. **Plant, Cell and Environment**, 37(11): 2470-2490, 2014.
- CHAUMONT, F.; TYEMAN, S. D. Aquaporins: Highly Regulated Channels Controlling Plant Water Relations. **Plant Physiology**, 164:1600-1618, 2014.
- CHAVES, M. M.; MAROCO, J. P.; PEREIRA, J. S. Understanding plant response to drought: from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, 30:239-264, 2003.
- CHEN, L. S.; LIN, Q.; NOSE, A. A comparative study on diurnal changes in metabolite levels in the leaves of three crassulacean acid metabolism(CAM) species, *Ananas comosus*, *Kalanchoe daigremontiana* and *K. pinnata*. **Journal of Experimental Botany**, 53(367):341-350, 2002.

- COSTA, A. F. **Revisão taxonômica do complexo *Vriesea paraibica* Wawra (Bromeliaceae)**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2002.
- CRAYN, D. M.; WINTER, K.; SMITH, A. C. Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the neotropical family Bromeliaceae. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 101:3703-3708, 2004.
- CUEVAS, I. C.; PODESTA, F. E. Purification and physical and kinetic characterization of an NAD dependent malate dehydrogenase from leaves of pineapple (*Ananas comosus*). **Physiologia Plantarum**, 108:240-248, 2000.
- 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 and Environment**, 25:295–310, 2002.
- CUSHMAN, J. C.; TILLET, R. L.; WOOD, J. A.; BRANCO, J. M.; SCHLAUCH, K. A. Large-scale mRNA expression profiling in the common ice plant, *Mesembryanthemum crystallinum*, performing C-3 photosynthesis and crassulacean acid metabolism (CAM). **Journal of Experimental Botany**, 59:1875-1894, 2008.
- DONADIO, S.; POZNER, R.; GIUSSANI, L. M. Phylogenetic relationships within *Tillandsia* subgenus *Diaphoranthema* (Bromeliaceae, Tillandsioideae) based on a comprehensive morphological dataset. **Plant Systematics and Evolution**, 301:387-410, 2014.
- ECHEVARRIA, C.; GARCIA-MAURINO, S.; ALVAREZ, R.; SOLER, A.; VIDAL, J. Salt stress increases the Ca^{2+} -independent phosphoenolpyruvate carboxylase kinase activity in Sorghum leaves. **Planta**, 214:283-287, 2001.
- ELSAYED, A. I.; RAFUDEEN, M. S.; GOLLDACK, D. Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: protection against abiotic stress. **Plant Biology**, 16:1-8, 2014.
- EVANS, H. The physiology of succulent plants. **Biological Reviews**, 7:181-211, 1932.
- FAROOQ, M.; WAHID, A.; KOBAYASHI, N.; FUJITA, D.; BASRA, S. M. A. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. **Agronomy for Sustainable Development**, 29:185-212, 2009.
- FERNIE, A. S.; MARTINOIA, E. Malate: Jack of all trades or master of a few?. **Phytochemistry**, 70(7): 828-832, 2009.

- FOYER, C. H.; FLETCHER, J. M. Plant antioxidants: color me healthy. **Biologist**, 48:115-120, 2001.
- 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, 2010a.
- 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, 2010b.
- GARAY-ARROYO, A.; COLMENERO-ARROYO, A.; COLMENERO-FLORES, J. M. GARCIARRUBIO, A.; COVARRUBIAS, A. A. Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. **Journal of Biological Chemistry**, 275:5668-5674, 2000.
- GEHRIG, H.; TAYBI, T.; KLUGE, M.; BRULFERT, J. Identification of multiple PEPC isogenes in leaves of the facultative Crassulacean acid metabolism (CAM) plant *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. cv. Tom Thumb. **FEBS Lett**, 377:399-402, 1995.
- GENRY, A.H.; DODSON, C. H. Diversity and biogeography of neotropical vascular epiphytes. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 74(2):205-233, 1987.
- GIVNISH, T. J.; MILLAM, K. C.; BERRY, E.; SYTSMA, K. J. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from ndhF sequence data. In: Columbus, J.T., Friar, E.A., Porter, J.M., Prince, L.M., Simpson, M.G. (Eds.), *Monocots: Comparative Biology and Evolution – Poales. Rancho Santa Ana Botanic Garden*, 23:3-26, 2007.
- GIVNISH, T. J.; BARFUSS, M. H. J.; EE, B.V.; RIINA, R.; SHULTE, K.; HORRES, R.; GONSISKA, P. A.; JABAILY, R. S.; CRAYN, D. M.; SMITH, A. C.; WINTER, K.; BROWN, G. K.; EVANS, T. M.; HOLST, B. K.; LUTHER, H.; TILL, W.; ZIZKA, G.; BERRY, P. E.; SYTSMA, K. J. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae: Insights from an eight-locus plastid phylogeny. **American Journal of Botany**, 98:872-895, 2011.
- GIVNISH, T.J.; BARFUSS, M. H. J.; EE, B.V.; RIINA, R.; SHULTE, K.; HORRES, R.; GONSISKA, P. A.; JABAILY, R. S.; CRAYN, D. M.; SMITH, A. C.; WINTER, K.; BROWN, G. K.; EVANS, T. M.; HOLST, B. K.; LUTHER, H.; TILL, W.; ZIZKA, G.; BERRY, P. E.; SYTSMA, K. J. Adaptive radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 71:55-78, 2014.

- GOMES, F. P. **A estatística moderna na pesquisa agropecuária**. Ed. POTAFOS, 1984.
- HARE, P. D.; CRESS, W. A.; VAN STADEN, J. Dissecting the roles of osmolytes accumulation during stress. **Plant Cell Environment**, 21:535-553, 1998.
- HERPPICH, W.; HERPPICH, M.; VONWILLERT, D. J. 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.
- HERRERA, A. 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, 2009.
- HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends Plant Science**, 6:431-438, 2001.
- HONGO-BO, S.; ZONG-SUO, L.; MING-AN, S. LEA proteins in higher plants: Structure, function, gene expression and regulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 45:131-135, 2005.
- JALEEL, C. A.; RIADH, K.; GOPI, R. MANIVANNAN, P.; INES, J.; AL-JUBURI, H.; CHANG-XING, Z.; HONG-BO, S.; PANNEERSELVAM, R. Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. **Acta Physiologiae Plantarum**, 31:427-436, 2009.
- JANG, J. C., SHEEN, J. Sugar sensing in plants. **Trends Plant Science**, 2:208-214, 1997.
- 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.
- KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Guanabara Koogan, 472p, 2008.
- KERBAUY, G. B. ; TAKAHASHI, C. ; MATIZ, A. L. ; TIEMI, A. ; HAMACHI, L. ; FELIX, L. M. ; PEREIRA, P. N. ; FRESCHI, L. ; MERCIER, H. Crassulacean Acid Metabolism in Epiphytic Orchids: Current Knowledge, Future Perspectives. In: **Mohammad Najafpour. (Org.). Photosynthesis**. Rijeka: Rijeka: InTech, 2012.
- KJLELLBOM, P.; LARSSON, C.; JOHANSSON, I.; KARLSONN, M.; JOHANSON, U. Aquaporins and water homeostasis in plants. **Trends in Plant Science**, 4(8):308-314, 1999.
- KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination for orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, 15:214-217, 1946.
- KRAMER, P. J. **Plant and Soil Water Relationship: Modern Synthesis**, New York, McGraw Hill, 538, 1969.

- KRAMER, O. J. **Water Relations of Plants**. New York, Academic Press, 489p, 1983.
- KUMMEROW, J. Adaptation of roots in water-stressed native vegetation. **Adaptations of plants to water and high temperature stress**. (ed. by Neil C. Turner, Paul J. Kramer) pp. 57-73, 1980.
- 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. **Biochemical Journal**, 436:15-34, 2011.
- LEBOUTEILLER, B.; GOUSSET-DUPONT, A.; PIERRE, J.; BLETON, J.; TCHAPLA, A.; MAUCOURT, M.; MOING, A.; ROLIN, D.; VIDAL, J. Physiological impacts of modulating phosphoenolpyruvate carboxylase levels in leaves and seeds of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Science**, 172:265-272, 2007.
- LEME, E. M. C.; MARIGO, L. C. **Bromeliads in Brazilian Wilderness**, Rio de Janeiro, 183p., 1993.
- LONIEN, J.; SCHWENDER, J. Analysis of metabolic flux phenotypes for two *Arabidopsis* mutants with severe impairment in seed storage lipid synthesis. **Plant Physiology**, 151:1617-1634, 2009.
- LÓPEZ-BUCIO, J.; NIETO-JACOBO, M. F.; RAMÍREZ-RODRÍGUEZ, V.; HERRERA-ESTRELLA, L. Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. **Plant Science**, 160:1-13, 2000.
- LUTTGE, 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.
- LUTTGE, U. Ecophysiology of Crassulacean Acid Metabolism (CAM). **Annals of Botany**, 93:629-652, 2004.
- LUTTGE, U. Photosynthetic flexibility and ecophysiological plasticity: question and lessons from *Clusia*, the only CAM tree, in the neotropics. **New phytologist**, 171:7-25, 2006.
- MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: an overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 444:139-158, 2005.
- MARTIN, C. E. Physiological Ecology of the Bromeliaceae. **Botanical Review**, 60:1-82, 1994.

- 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.
- MATIZ, A. L. **Utilização da uréia por folhas de Vriesea gigantea (Bromeliaceae) submetidas ao déficit hídrico, muito mais do que uma fonte de nitrogênio.** Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2012.
- MAXWELL, K.; 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, K.; BADGER R. M.; OSMOND, B. A comparison of CO₂ and O₂ exchange patterns and the relationship with chlorophyll fluorescence during photosynthesis in C₃ and CAM plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, 25:45-52, 1998.
- McWILLIAMS, E. L. Evolutionary ecology. In: Smith, L.B., Downs, R.J. (Eds.), **Pitcairnioideae (Bromeliaceae). Flora Neotropica Monograph**. New York Botanical Garden Press, Bronx, New York, 14: 40-55, 1974.
- MEDINA, E.; DELGADO, M.; TROUGHTTON, J. H.; MEDINA, J. D. Physiological ecology of CO₂ fixation in Bromeliaceae. **Flora**, 166:137–52, 1977.
- MEDINA, E. Eco-fisiologia y evolución de las Bromeliaceae. **Boletín de la Academia Nacional de Ciencias**, 59:71-100, 1990.
- MIOTO, P. T. **Sinalização da indução do metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) por ácido abscísico e óxido nítrico em *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae).** Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2011.
- 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**, 170(11):996-1002, 2013.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Plant Physiology**, 15: 473-479, 1962.
- NIEVOLA C. C.; KRAUS, J. E.; FRESCHI, L.; SOUZA, B. M.; MERCIER, H. Temperature determines the occurrence of CAM or C₃ photosynthesis in pineapple plantlets grown *in vitro*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 41: 832-387, 2005.

- NIMMO, H. G. The regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in CAM plants. **Trends in Plant Science**, 5 (2):75-80, 2000.
- NORTH, G. B.; LYNCH, F. H.; MAHARAJ, F. D. R.; PHILLIPS, C. A.; WOODSIDE, W. T. Leaf hydraulic conductance for a tank bromeliad: axial and radial pathways for moving and conserving water. **Frontiers in Plant Science**, 4:78, 2013.
- NYMAN, L. P.; DAVIS, J. P.; O'DELL, S. J.; ARDITTI, J.; STEPHENS, G. C.; BENZING, D.H. Active uptake of amino acids by leaves of an epiphytic vascular plant, *Tillandsia paucifolia* (Bromeliaceae). **Plant Physiology**, 83:681-684, 1987.
- PAGGI, C. A. **Aspectos genéticos e ecológicos da biologia reprodutiva de *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae)**. Tese (Doutorado em Genética e Biomolecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.
- 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.
- PIKART, F. C. **Caracterização do metabolismo fotossintético da bromélia epífita tanque *Guzmania monostachia* submetida ao déficit hídrico**. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) Universidade Estadual de Campinas, 2014.
- PITTENDRIGH, C. S. The bromeliad-Anopheles-malaria complex in Trinidad. I. The bromeliad flora. **Evolution**, 2:58-89, 1948.
- PLAXTON, W. C.; PODESTA, F. E. The functional organization and control of plant respiration. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 25:159-198, 2006.
- POPP, M. JANNET, H., LÜTTGE, U., MEDINA, E. Metabolite gradient and carbohydrate translocation in rosette leaves of CAM and C₃ bromeliads. **New Phytologist**, 157:649-656, 2003.
- PROCHAZKOVA, D.; SAIRAM, R. K.; SRIVASTAVA, G. C.; SINGH, D. V. Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. **Plant Science**, 161:765-771, 2001.
- RANKER, T. A.; SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; GILMARTIN, A. J. Subfamilial relationships of the Bromeliaceae: evidence from chloroplast DNA restriction site variation. **Systematic Botany**, 15:425-434, 1990.
- REYES, J. L.; RODRIGO, M. J.; COLMENERO-FLORES, J. M.; GIL, J. V.; GARAY-ARROYO, A.; CAMPOS, F.; SALAMINI, F.; BARTELS, D.; COUVARRUBIAS, A. A. Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro. **Plant Cell and Environment**, 28: 709-718, 2005.

- ROCHA, A. M. S.; MORAES, J. A. P. V. Influência do estresse hídrico sobre as trocas gasosas em plantas jovens envasadas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 9(1):41-46, 1997.
- RODRIGUES, M. A.; FRESCHI, L.; PEREIRA, P. N.; MERCIER, H. Interactions between nutrients and Crassulacean acid metabolism. **Progress in Botany**, 75: 167-186, 2014.
- 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.
- SANCHEZ, R.; FLORES, A.; CEJUDO, F. J. Arabidopsis phosphoenolpyruvate carboxylase genes encode immunologically unrelated polypeptides and are differentially expressed in response to drought and salt stress. **Planta**, 223:901-909, 2006.
- SCHIMIDT, J. E.; KAISER, W. M. Response of succulent leaves of *Peperomia magnoliaefolia* to dehydration. **Plant Physiology**, 83:190-194, 1987.
- SILVA, C. P. da. **Genética, filogenia e fertilidade de populações de *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae)**. Tese (Doutorado em Genética e Biomolecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.
- SILVERA, K., NEUBIG, K. M., WHITTHEN W. M., WILLIAMS, N. H., WINTER, K., CUSHMAN, J. C. Evolution along the crassulacean acid metabolism continuum. **Functional Plant Biology**, 37: 995-1010. 2010.
- 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.
- SCHULTE, K.; BARFUSS M. H. J.; ZIZKA, G. Phylogeny of Bromelioideae (Bromeliaceae) inferred from nuclear and plastid DNA loci reveals the evolution of the tank habit within the subfamily. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 51: 327-339, 2009.
- SMITH, J. A. C.; GRIFFITHS, H.; LUTTGE, U.; CROOK, C. E.; GRIFFITHS, N. M.; STIMMEL, K.H. Comparative Ecophysiology of CAM and C3 Bromeliads. 4. Plant Water Relations. **Plant Cell and Environment**, 9:395-410, 1986.
- STEVENS, P. F., 2013. Angiosperm Phylogeny. <<http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/>>
- STILES, K. C.; MARTIN C. E. Effects of Drought Stress on CO₂ Exchange and Water Relations in the CAM Epiphyte *Tillandsia utriculata* (Bromeliaceae). **Journal Plant Physiology**, 149: 721-728. 1996.

- SWEETLOVE, L. J.; BEARD, K. F. M.; NUNES-NESI, A.; FERNIE, A. R.; RATCLIFFE, R. G. Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle. **Trends Plant Science**, 15:462-470, 2010.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4 ed, Artmed, Brasil, 2009.
- TAKAHASHI, C. A.; CECCANTINNI, G. C. T.; MERCIER, H. Differential capacity of nitrogen assimilation between apical and basal leaf portions of a tank epiphytic bromeliad. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 19(2):119-126, 2007.
- 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.
- 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.
- 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.
- TUFFERS, A. V.; MARTIN, C. E.; VON WILLERT, D. J. Possible water movement from older to younger leaves and photosynthesis during drought stress in two succulent species from South Africa, *Delosperma tradescantioides* Bgr. and *Prenia sladeniana* Bol. (Mesembryanthemaceae). **Journal of Plant Physiology**, 146:177-182, 1995.
- WINTER, K.; ARANDA, J.; HILTUM, J. A. M. Carbon isotope composition and water-use efficiency in plants with crassulacean acid metabolism. **Functional Plant Biology**, 32:381-388, 2005.
- XIONG, L.; ZHU, J. K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. **Plant Cell and Environment**, 25:131-139, 2002.
- ZOTZ, G.; WINTER, K. Short-term regulation of Crassulacean acid metabolism activity in a tropical hemiepiphyte, *Clusia uvitana*. **Plant Physiology**, 102:835-841, 1993.
- ZOTZ, G.; ANDRADE, J. L. Water Relations of Two co-Occurring Epiphytic Bromeliads. **Journal Plant Physiology**, 152: 545-554, 1997.

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.