

Antônio Azeredo Coutinho Neto

Efeitos de diferentes fontes de nitrogênio e do déficit hídrico
sobre o desenvolvimento e a modulação do metabolismo ácido
das crassuláceas (CAM) em plantas atmosféricas de

Guzmania monostachia

Effects of different sources of nitrogen and water deficiency
on development and modulation of crassulacean acid
metabolism (CAM) in atmospheric plants of

Guzmania monostachia.

São Paulo

2017

Antônio Azeredo Coutinho Neto

Efeitos de diferentes fontes de nitrogênio e do déficit hídrico sobre o desenvolvimento e a modulação do metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) em plantas atmosféricas de *Guzmania monostachia*

Effects of different sources of nitrogen and water deficiency on development and modulation of crassulacean acid metabolism (CAM) in atmospheric plants of *Guzmania monostachia*

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

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

Versão corrigida da dissertação de mestrado. A versão original encontra-se na biblioteca da USP.

São Paulo
2017

Ficha Catalográfica

Coutinho Neto, Antônio Azeredo.

Efeito de diferentes fontes de nitrogênio e do déficit hídrico sobre o desenvolvimento e a modulação do metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) em plantas atmosféricas de *Guzmania monostachia*./ Antônio Azeredo Coutinho Neto; orientadora Helenice Mercier. – São Paulo, 2017.

Número de páginas: 85f.

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

1. Nitrogênio 2. Metabolismo ácido das crassuláceas – CAM 3. Metabolismo antioxidante 4. Bromeliaceae 5. Bromélia epífita atmosférica. I. Título. II. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

LC:

Comissão Julgadora:

Prof (a). Dr (a).

Prof (a). Dr (a).

Orientadora Prof^a. Dr^a. Helenice Mercier

Dedicatória

À minha mãe que sempre me apoiou.

Epígrafe

Do mesmo modo que existem, como é costume dizer, muitos caminhos na floresta, encontrei, com muita vantagem, o caminho da metamorfose, a perspectiva é suficientemente espiritual, e, como a ideia se presta a ser preenchida pela experiência e se sujeita a verificação, devo reconhecer que se trata de um modo de representação que sempre me deu muito contentamento.

[Carta de Johann Wolfgang Von Goethe a J. G. Schlosser 30 de agosto de 1799. In: GOETHE, J. W. V. **A metamorfose das plantas**. Tradução de Friedhelm Zimpel. 4^o. ed. Antroposófica, 2005].

Agradecimentos

Agradeço sinceramente...

À minha mãe (Lucinéia Vicente) por apoiar e ajudar nas decisões que tomei e sempre me incentivar na busca da realização dos meus sonhos.

À Prof^ª. Dr^ª. Helenice Mercier pela orientação, ensinamentos, confiança, disponibilidade em me guiar durante esta jornada e pela amizade.

À Prof^ª. Dr^ª. Gladys Flávia de Albuquerque Melo de Pinna que me ensinou e apoiou em todas as análises anatômicas e por ser uma amiga querida.

À Dr^ª. Ana Zangirólame Gonçalves que me ensinou, acompanhou nas análises estatísticas, discussões ecofisiológicas, se tornando uma amiga querida.

À Dr^ª. Cassia Ayumi Takahashi que me ensinou as técnicas relacionadas com enzimologia prática no metabolismo do nitrogênio, além de outras técnicas laboratoriais, e que me apoiou e aconselhou nos momentos difíceis do meu trabalho e vida. Mais uma amiga que ganhei durante a pós-graduação.

À Dr^ª. Maria Elisabeth Abreu e MsC. Victória de Carvalho que me ensinaram e forneceram todo o suporte a respeito das técnicas de antioxidantes. São amigas que também ganhei nesse período.

Ao Prof. Dr. Paulo Tamaso Mito e à amiga Dr^ª. Paula Natália Pereira pelos ensinamentos laboratoriais e técnicas relacionadas ao CAM.

À Dr^ª. Sabrina Latansio Costa Ribeiro pelos conhecimentos teóricos e práticos sobre o metabolismo fotossintético e por sua amizade aconchegante.

Ao Prof. Dr. Gilberto Barbante Kerbauy, à Prof^ª. Dr^ª. Catarina Carvalho Nievola e à Prof^ª. Dr^ª. Fanly Fungyi Chow Ho pelas preciosas contribuições prestadas na banca de qualificação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sodek Ladslav por me permitir usar o laboratório de fisiologia molecular de plantas e pelos ensinamentos transmitidos em relação à dosagem de aminoácidos. À Dr^ª Sarah Caroline Ribeiro de Souza que também me auxiliou neste assunto.

Ao Prof. Dr. Rafael Silva Oliveira que disponibilizou o seu laboratório para que as análises isotópicas fossem iniciadas, fornecendo todo apoio possível nessas análises.

Ao Prof. Dr. Luís Eduardo Soares Netto pelo auxílio nos cálculos enzimáticos antioxidantes e discussão sobre protocolos.

Ao MsC Fábio Alves Ortiz, especialmente, durante boa parte do desenvolvimento desta dissertação por acompanhar, ajudar e escutar as minhas mazelas durante esta etapa.

Aos meus amigos e colegas, que mesmo de longe, acompanharam meu trabalho, sempre me incentivando e compreendendo as minhas recorrentes ausências.

Aos alunos do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal que contribuíram diretamente ou indiretamente: Dr^a. Alejandra Matiz Lopez, MsC. Bruno Nobuya Katayama Gobara, Dr^a. Carolina Krebs Kleingesinds, Dêvisson Luan Oliveira Dias, Dioceni Mancilha, MsC. Filipe Christian Pikart, MsC. Frederico Rocha Rodrigues Alves, Dr. Paulo Marcelo Rayner Oliveira, Priscila Pires Bittencourt, MsC. Priscila Primo Andrade Silva, MsC. Rafael Zuccarelli, Renata Callegari Ferrari e Dr. Ricardo Ernesto Bianchetti.

Aos amigos do Laboratório de Algas Marinhas, Camila Lopes Lira, Mariana Sousa de Melo, MsC. Sabrina Gonçalves Raimundo e a todos não citados nominalmente aqui.

Aos técnicos: Dr^a. Aline Bertinato Cruz, à minha amiga querida Ana Maria Rodrigues, à amiga Fernanda Oliveira Menezes, à amiga querida Mayara Cristina Folgati Silva e ao Willian da Silva Oliveira, agradeço.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Botânica: Carlos Alberto Ramos de Oliveira, Norberto Palacios, Danilo Bonamin e Kamila Nery Pecorari, agradeço.

Aos funcionários da seção de pós-graduação em especial: Érika Harumi Takamoto de Camargo e ao Gilmar Silva Neves, que sempre me ajudaram.

À bibliotecária Maria Inês Conte que esclareceu dúvidas e forneceu suporte quanto à formatação desta dissertação.

Aos alunos, funcionários e professores do Instituto de Biociências que tornaram de alguma forma este trabalho possível.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Projeto temático – Processo: 2011/50637-0) pelo apoio financeiro ao Laboratório.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Bolsa de mestrado proc. nº: 2015/134123-8) pela bolsa recebida.

Muito obrigado!

Índice

Introdução Geral	9
Hipóteses e objetivos dos capítulos	15
Referências bibliográficas	17
Capítulo 01 – Efeito de fontes de nitrogênio inorgânicas e orgânicas sobre a anatomia, o crescimento e desenvolvimento de plantas atmosféricas de <i>G. monostachia</i> cultivadas in vitro.	21
Resumo	21
Abstract	22
Introdução	23
Material e métodos	25
Obtenção do material vegetal e condições de cultivo in vitro	25
Medidas morfométricas	26
Análises anatômicas foliares	26
Análises fisiológicas	27
Resultados	29
Discussão	32
Referências bibliográficas	38
Figuras	44
Capítulo 02 – Efeito de diferentes fontes de nitrogênio e do déficit hídrico sobre o grau de expressão do CAM em plantas atmosféricas de <i>Guzmania monostachia</i> cultivadas in vitro.	55
Resumo	55
Abstract	56
Introdução	57
Material e métodos	61
Obtenção do material vegetal e cultivo em diferentes fontes de N	61
Tratamento com deficiência hídrica	61
Resultados	66
Discussão	68
Referências bibliográficas	72
Tabelas	77
Figuras	78
Resumo Geral	83
Abstract	84

Introdução Geral

A sobrevivência das plantas no ambiente terrícola encontrou diversos desafios, como a fusão de gametas, dispersão de propágulos, estabelecimento de plantas jovens, a absorção, o transporte e a assimilação de água e nutrientes. Os mesmos desafios encontrados na conquista do ambiente terrícola foram encontrados no ambiente atmosférico por plantas que são denominadas epífitas (LÜTTGE, 1989). As epífitas vasculares compreendem cerca de 24 mil espécies distribuídas em várias famílias (NADKARNI; MERWIN; NIEDER, 2001). De acordo com o Brazil Flora Group – BFG (2015), cerca de 3.425 espécies de epífitas foram registradas no Brasil em 2015, distribuídas na Floresta Atlântica, Floresta Amazônica, Cerrado, Caatinga, Pampa e Pantanal.

O ambiente epifítico é caracterizado por apresentar intermitência de água e nutrientes, e uma das famílias de plantas mais adaptadas a esse ambiente é a família Bromeliaceae (PADILHA, 1973; BENZING, 1987). Essa família tem cerca de 3.352 espécies distribuídas em 58 gêneros que ocorrem ao longo das zonas tropical e subtropical, desde o sul dos Estados Unidos até o Sul do Chile e Argentina, com uma única espécie na África Ocidental (JACQUES-FÉLIX, 2000; GIVINISH et al., 2011; LUTHER, 2010). No Brasil ocorrem cerca de 1.307 espécies de bromélias ao longo dos diferentes ambientes e habitats (BFG, 2015).

As bromélias apresentam suas folhas organizadas em roseta, podendo, em algumas plantas adultas, formar um reservatório (tanque) com capacidade de armazenar água e nutrientes. Na superfície foliar das bromélias existem estruturas epidérmicas especializadas (figura 1), conhecidas como tricomas (BENZING, 2000). Esses tricomas atuam na absorção de água e nutrientes, na função de reflexão da luz e diminuição da temperatura foliar, além de reduzir a transpiração (BENZING; SEEMANN; RENFROW, 1978). Por meio dos tricomas distribuídos desde o ápice até a base da folha, as bromélias, então, conseguem absorver água e nutrientes depositados no interior do tanque, sendo que principalmente as bases foliares teriam uma semelhança funcional com raízes de plantas terrícolas (BENZING, 2000; ZOTZ; HIETZ, 2001; TAKAHASHI; MERCIER, 2011). Por sua vez, as raízes reduzidas das bromélias epífitas já foram descritas como órgão principalmente relacionado à fixação da planta ao substrato (PITTENDRIGH, 1948; BENZING, 2000). As pesquisadoras Nievola e Mercier (1996)

obtiveram resultados de maior absorção de nitrato por meio das folhas em comparação com as raízes na espécie adulta *Vriesea fosteriana*, sugerindo que possivelmente as raízes seriam funcionalmente ativas, mas teriam pouca importância nesse processo. Entretanto, sabe-se, atualmente, que a funcionalidade das raízes de bromélias do gênero *Vriesea* pode variar entre as espécies ou ainda ao longo do estágio de desenvolvimento (fase jovem até a fase adulta) (VANHOUTTE et al., 2017).

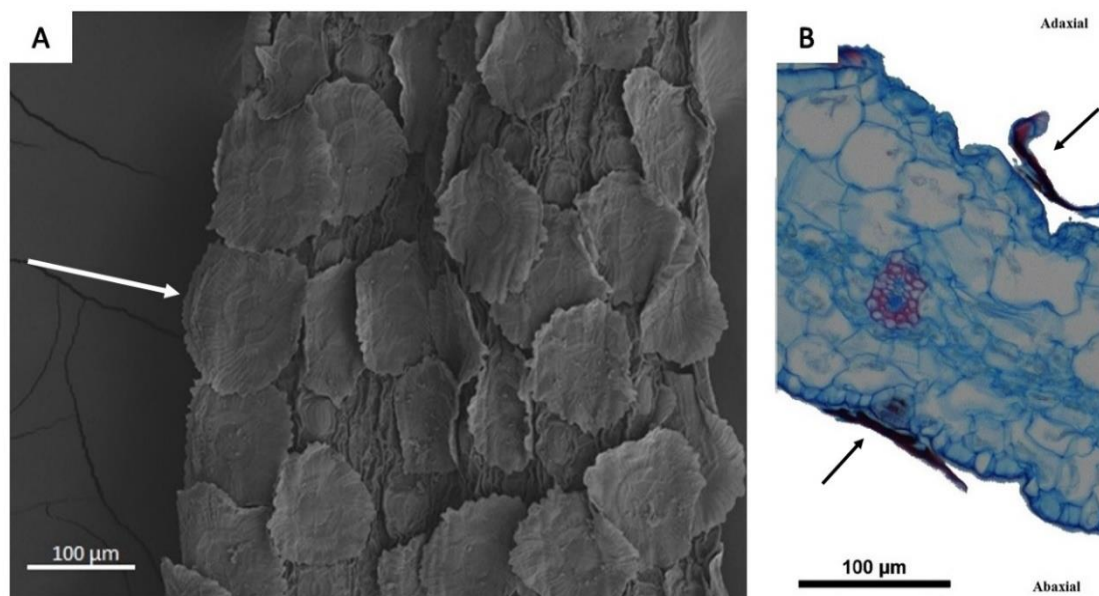


Figura 1: Aspecto geral da face abaxial da epiderme em MEV mostrando a distribuição dos tricomas. **B** – Secção transversal da folha atmosférica na região mediana mostrando tricomas em ambas as faces.

De acordo com Pittendrigh (1948), as bromélias podem ser subdividas em quatro grandes tipos ecológicos, no qual o tipo I é caracterizado por plantas com o sistema radicular altamente desenvolvido e geralmente com função na absorção d'água e nutrientes do solo (terrícolas); no Tipo II a absorção ocorre tanto por meio das raízes quanto pelas folhas (tanque); no Tipo III observa-se a presença do tanque e absorção de nutrientes e água, que ocorrem basicamente pelos tricomas nas folhas que formam esse tanque, e o tipo IV em que as plantas não apresentam tanque e presume-se que absorvam toda a água e nutrientes necessários pelos tricomas foliares (bromélias conhecidas como atmosféricas). Devido estas diferentes características ecofisiológicas das bromélias, existem espécies habitando os mais variados ambientes, inclusive as plantas totalmente independentes de um substrato (solo) para obter nutrientes e água, essas são ditas como totalmente atmosféricas (CRAYN; WINTER; SMITH, 2004).

Algumas espécies de bromélias apresentam mudanças morfológicas e ecofisiológicas ao longo de sua ontogenia, conhecida como heteroblastia, na qual a

bromélia juvenil possui um estágio atmosférico (tipo ecofisiológico IV) em sua fase inicial e, ao longo do seu crescimento e desenvolvimento, apresenta tanque (tipo III) ao chegar na fase adulta (ZOTZ; WILHELM; BECKER, 2011). Outras modificações também ocorrem da fase atmosférica para a fase com tanque, como: as bromélias atmosféricas apresentam quantidade uniforme de tricomas ao longo das folhas, enquanto na fase tanque existe um gradiente crescente do ápice para as bases; a existência de um acúmulo de água e nutrientes num reservatório externo na fase de tanque, enquanto não há esse acúmulo na fase atmosférica (SAKAI; SANFORD, 1980; ADAMS III; MARTIN, 1986).

A família Bromeliaceae atualmente apresenta oito subfamílias (Brocchinioideae, Lindmanioideae, Hechtioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae, Bromelioideae e Tillandsioideae), dentro dessas subfamílias estão distribuídos distintos gêneros e espécies com características morfológicas, de crescimento e de desenvolvimento em diferentes habitats (BENZING; BURT, 1970; GIVINISH et al., 2011). Dentro da subfamília Tillandsioideae, o gênero *Guzmania* possui 200 espécies e a espécie *Guzmania monostachia* (L.) Rusby ex. Mez. (figura 2), por exemplo, apresenta desenvolvimento heteroblástico (MARTINELLI et al., 2008). Essa espécie ocupa florestas tropicais em partes da Flórida, oeste da América do Sul e em subpopulações vulneráveis no nordeste do Brasil, nos estados do Ceará e Pernambuco (MARTINELLI; MORAES, 2013; GOVAERTS; LUTHER; GRANT, 2016).

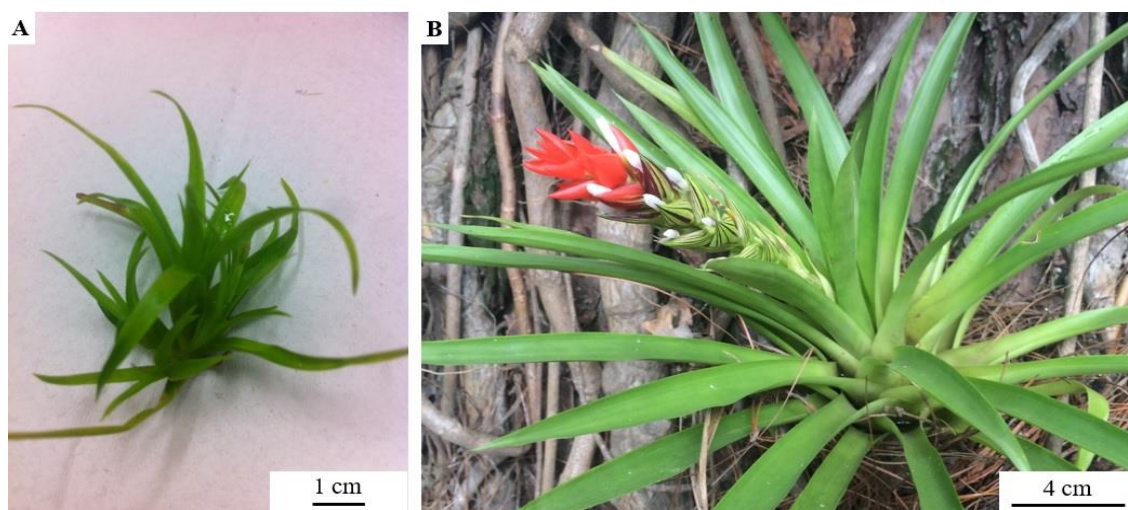


Figura 2: Características gerais da espécie *Guzmania monostachia* (L.) Rusby ex. Mez.. **A** – Planta no estágio atmosférico após nove meses de cultivo in vitro. **B** – Planta adulta com tanque em floração após, aproximadamente, três anos de cultivo em casa de vegetação.

Assim como outras bromélias do gênero, *G. monostachia* possui tanque em sua fase adulta a partir da sobreposição e expansão das bainhas foliares, acumulando água e podendo abrigar microorganismos (*Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Paenibacillus*, *Burkholderia* e outros gêneros bacterianos) que podem contribuir para a nutrição nitrogenada das plantas (KLEINGESINDS, 2016). No tanque, pode-se acumular ainda matéria orgânica e inorgânica provenientes de restos de organismos mortos e excretas de animais, constituindo-se fontes potenciais de nutrientes para as bromélias (RICHARDSON, 1999; LEROY et al., 2009). Estudos conduzidos por Takahashi e Mercier (2011) demonstraram que a bromélia epífita *Vriesea gigantea* pode assimilar ureia do tanque, sendo essa absorvida com mais rapidez em relação às fontes nitrogenadas inorgânicas (nitrato e amônio), possivelmente devido a adaptações dessa espécie de bromélia em obter nutrientes provenientes de anuros que visitam os seus tanques quando adultas (ROMERO et al., 2010; GONÇALVES et al., 2016).

Para plantas terrícolas, como a bromélia *Ananas comosus*, quando cultivadas em diferentes fontes nitrogenadas, o nitrato (NO_3^-) favoreceu maiores ganhos de massa seca, conteúdo de clorofilas e carotenoides, quando comparado ao amônio (NH_4^+), que pode ter causado algum nível de toxicidade as plantas (SIDERIS; YOUNG, 1947). Ainda, as bromélias epífitas atmosféricas *Vriesea philippocoburgii* e a *Tillandsia pohliana*, quando cultivadas in vitro com amônio, apresentaram inibição da formação radicular e menores quantidades de brotos em relação às plantas crescidas em nitrato ou glutamina (MERCIER et al., 1997). A espécie epífita *Vriesea gigantea* e a terrícola *Ananas comosus* foram cultivadas in vitro com amônio ou ureia, resultando numa maior assimilação do nitrogênio na forma de aminoácidos livres, como a asparagina, glutamina e maior conteúdo de clorofilas na presença do amônio (ENDRES; MERCIER, 2001). Também foi observado uma maior taxa de captação de amônio marcado isotopicamente com relação a outras fontes nitrogenadas (nitrato, glicina, glutamina e ureia) para a espécie *Vriesea gigantea* (INSELBACHER et al., 2007). Em algumas regiões geográficas do mundo, no dossel das árvores que não possuem epífitas, e assim não possuem retenção de substrato nos galhos das árvores, a quantidade de amônio supera a quantidade de nitrato (GARTEN, 1991; BENZING, 2000).

Além das condições intermitentes de nutrientes no ambiente epifítico, também existe maior presença de determinados tipos de nutrientes em maior quantidade do que de outro nutriente, por exemplo, no caso da fonte nitrogenada amônio e nitrato. Como já

mencionado anteriormente, as bromélias epífitas ficam expostas a intermitência de água (PADILHA, 1973; BENZING, 1987). Essa intermitência pode ser fator desencadeador de alteração do tipo de fotossíntese realizada, como, por exemplo, de C_3 para CAM (BENZING, 2000). A *Guzmania monostachia* por apresentar o metabolismo C_3 -CAM facultativo, se mantém C_3 na condição bem hidratada e, em condições de deficiência hídrica altera para um metabolismo mais intenso, conhecido como CAM *idling*, quando, então, ocorre o fechamento total dos estômatos durante o dia e também durante a noite, reciclando o dióxido de carbono já existente no interior dos tecidos (FRESCHI et al., 2010a; MATIZ et al., 2013).

Estudos com folhas isoladas de *G. monostachia* adultas submetidas ao déficit hídrico na presença de diferentes fontes de nitrogênio mostraram maior atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC), enzima associada à obtenção de dióxido de carbono (CO_2), quando as plantas estavam na presença de amônio. Ao contrário, a menor atividade foi encontrada quando as folhas receberam ureia e a segunda menor atividade quando receberam nitrato (RODRIGUES et al., 2014). A PEPC absorve o CO_2 , e após a descarboxilação concentra-o no sítio ativo da enzima ribulose bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), otimizando assim a função carboxilase da Rubisco (KELEY; RUNDEL, 2003). O processo ocorre da seguinte maneira, as moléculas de CO_2 da atmosfera ou advindos da respiração são fixados em moléculas de bicarbonato (HCO_3^-) através da atividade da enzima anidrase carbônica. O bicarbonato, então, é fixado em oxaloacetato (OAA) e fosfoenolpiruvato (PEP) através da enzima PEPC. Em seguida, a enzima malato desidrogenase converte o OAA em ácido málico o qual é armazenado no vacúolo das células. O malato, ao ser descarboxilado no citosol, fornece o CO_2 para a enzima Rubisco em maiores concentrações, o que otimiza a função carboxilase desta enzima (OSMOND, 1978). Atividade conjunta dessas duas enzimas na obtenção e fixação de CO_2 , assim como a abertura estomática no período noturno e o acúmulo de ácidos orgânicos no vacúolo, são características do metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) (WINTER; SMITH, 1996; LÜTTGE, 2004).

As deficiências hídrica e nutricional podem também gerar estresse oxidativo por meio da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (GILL; TUTEJA, 2010). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), por exemplo, é uma espécie reativa de oxigênio mais estável quando comparada ao óxido nítrico (NO) ou superóxido ($O_2^{\bullet-}$), devido a sua característica de não ser um radical livre. Sugere-se que o H_2O_2 está presente na transição

do metabolismo fotossintético C_3 para o metabolismo CAM em *Mesembryanthemum crystallinum* (Aizoaceae), já que ocorre um aumento da concentração de H_2O_2 em massas celulares indiferenciadas com capacidade autotrófica sob condição luminosa, e aumento também em condição salina (SLESÁK; MISZALSKI, 2003; SLESÁK et al., 2007). Uma hipótese levantada com relação ao aumento na quantidade de H_2O_2 em determinadas plantas sob determinadas condições ambientais, é que essa ROS sirva como doadora precoce de elétrons para o funcionamento do fotossistema II (PS II) em plantas superiores (OLSON; BLANKENSHIP, 2004). Entretanto são necessários mais estudos relacionando os teores de H_2O_2 na condição do CAM (SLESÁK et al., 2007).

Na espécie suculenta *Rosularia elymaitica* (Crassulaceae), outra espécie C_3 -CAM facultativa, observou-se um aumento na atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e ascorbato peroxidase (APX) quando submetidas ao déficit hídrico (HABIBI; HAJIBOLAND, 2011). Alguns estudos sugerem que as espécies reativas de oxigênio podem participar da sinalização durante a transição do metabolismo C_3 para o CAM. Presume-se que o CAM produziria o malato, o qual ao ser descarboxilado propiciaria um aumento de CO_2 que poderiam funcionar como moléculas receptoras de elétrons, reduzindo assim os níveis de ROS e as atividades das enzimas antioxidantes.

De acordo com Hessini et al. (2013), a planta halófila *Spartina alterniflora* (Poaceae) cresceu melhor na presença de amônio quando submetidas ao estresse salino e apresentaram maior atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT) e menores teores de peróxido de hidrogênio e um metabólito resultante da peroxidação de membranas lipídicas, o malondialdeído (MDA). A redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio, por meio do aumento das atividades enzimáticas antioxidantes, possibilita a planta lidar melhor com a condição adversa e investir em crescimento. Entretanto, ainda são necessários estudos que correlacionem o déficit hídrico e a exposição das plantas a distintas fontes nutricionais na indução de um maior ou menor grau de CAM, assim como o envolvimento das ROS e das enzimas antioxidantes na sinalização (BORLAND; MAXWELL; GRIFFITHS, 2006).

Nesta dissertação apresenta-se os efeitos de distintas fontes de nitrogênio inorgânicas (nitrato e amônio) e orgânicas (glutamina e ureia) sobre a anatomia, o crescimento e desenvolvimento de bromélias atmosféricas de *G. monostachia* cultivadas in vitro em condição hídrica favorável, além da temperatura, intensidade luminosa e

fotoperíodo adequados. Também se analisou o efeito do cultivo prévio das plantas atmosféricas em distintas fontes nitrogenadas, e com posterior imposição da deficiência hídrica, sobre a intensidade do CAM, produção de ROS (H_2O_2) e metabolismo enzimático antioxidante.

Hipóteses e objetivos dos capítulos

Capítulo 01: Sabe-se que as bromélias podem apresentar diferentes respostas fisiológicas nas diferentes condições nitrogenadas. Sabendo disso, o objetivo deste capítulo foi analisar o efeito das fontes inorgânicas (nitrato e amônio) e orgânicas (glutamina e ureia) sobre a anatomia, o crescimento e sobre o desenvolvimento das plantas atmosféricas de *G. monostachia* cultivadas in vitro. Presume-se que o nitrato e a glutamina sejam as fontes que mais contribuem para o crescimento dessa bromélia na fase atmosférica, já que essas fontes são menos tóxicas quando comparadas com o amônio, por exemplo. Entretanto, o nitrato e o amônio provavelmente são as fontes de nitrogênio mais disponíveis para essas plantas em ambientes naturais, visto que essas plantas em estágios iniciais de desenvolvimento não apresentam tanque e, portanto, pouco interagem com outros organismos e pouco acessam o nitrogênio orgânico. Ainda, a glutamina pode ser prontamente utilizada, visto que não é necessário passar por vias iniciais de transformação para ser assimilada.

Capítulo 02: Quando folhas adultas isoladas e plantas inteiras na fase atmosférica de *G. monostachia* são submetidas a sete dias de déficit hídrico, o metabolismo dos tecidos passam da fotossíntese C_3 para a expressão do metabolismo ácido das crassuláceas (CAM). Sabe-se ainda que plantas previamente fertilizadas quando passam por uma situação de falta de água apresentam um menor CAM comparado aquelas que não foram previamente fertilizadas. Plantas nutridas com ureia apresentam uma menor expressão do CAM, enquanto que aquelas que são nutridas com amônio e nitrato. Com o objetivo de compreender a ligação entre a nutrição e o metabolismo CAM avaliamos se houve produção ou redução de espécies reativas de oxigênio (ROS) em condição de déficit hídrico quando *G. monostachia* atmosféricas receberam previamente fontes nitrogenadas (nitrato, amônio, glutamina ou ureia). Pressupõe-se com base na literatura para folhas destacadas de plantas adultas dessa espécie (*G. monostachia*), que em uma situação de déficit hídrico as plantas atmosféricas também expressem maior intensidade do CAM na fonte de nitrato e menor nos tratamentos de amônio e ureia. Uma vez que o amônio e a ureia aparentemente contribuem para a manifestação do CAM, esperamos encontrar uma

maior produção de ROS em plantas que receberam estes compostos nitrogenadas quando comparado com nitrato e glutamina.

Conclusões gerais

As diferentes fontes nitrogenadas modificam metabolicamente e estruturalmente a bromélia *Guzmania monostachia*, sendo a fonte nítrica a mais apropriada para uma adequada estocagem de água nos parênquimas aquíferos e produção do parênquima clorofiliano, promovendo um melhor crescimento e desenvolvimento das plantas no estágio atmosférico.

O aminoácido glutamina, aparentemente, também mostrou-se ter um efeito ligeiramente positivo sobre o crescimento da bromélia *G. monostachia* atmosférica, apesar de não termos encontrado diferenças estatísticas significativas em relação às demais fontes empregadas.

Já a fonte amoniacal e ureídica não estimularam o crescimento e desenvolvimento das plantas nesse estágio ontogenético, ao contrário do encontrado para a fase adulta com tanque de outras bromélias epífitas.

As plantas atmosféricas de *Guzmania monostachia* as quais cresceram e se desenvolveram na presença de nitrato e que posteriormente foram submetidas ao déficit hídrico apresentam maior suculência e intensidade do CAM, sugerindo que possam tolerar melhor o estresse hídrico do que as plantas cultivadas em outras formas de N. A quantidade de ácidos orgânicos estocada foi maior em nitrato e em particular o ácido cítrico foi aumentada significativamente nesse tratamento.

Quanto à produção de ROS, possivelmente o peróxido de hidrogênio, encontrado em maior concentração nas plantas cultivadas em nitrato, comparativamente ao controle, esteja atuando como um sinalizador para a expressão do CAM, ao invés de ser considerada uma espécie reativa de oxigênio danosa aos tecidos, já que as atividades das enzimas antioxidantes foram menores que no controle (SOD e GR) ou iguais estatisticamente (CAT, APX, GPOX).

Referências bibliográficas

ADAMS III, W. W.; MARTIN, C. E. Physiological consequences of changes in life form of the Mexican epiphyte *Tillandsia deppeana* (Bromeliaceae). **Oecologia**, v. 70, n. 2, p. 298-304, 1986.

BENZING, D. H. Basic structure, function, ecology and evolution. In: BENZING, D. H. (Org.) **Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation**. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.

BENZING, D. H. Vascular epiphytism: taxonomy participation and adaptive diversity. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 74, n. 2, p. 183-204, 1987.

BENZING, D. H.; SEEMANN, J.; RENFROW, A. The foliar epidermis in Tillandsioideae (Bromeliaceae) and its role in habitat selection. **American Journal of Botany**, v. 65, n. 3, p. 359-365, 1978.

BENZING D. H.; BURT K. M. Foliar permeability among twenty species of the Bromeliaceae. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 97, n. 5, p. 269-279, 1970.

BFG. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015.

BORLAND, A. M.; MAXWELL, K.; GRIFFITHS, H. Ecophysiology of plants with crassulacean acid metabolism. In: LEEGOOD, R. C.; SHARKEY, T. D.; VON CAEMMERER, S. (Eds.). **Photosynthesis: physiology and metabolism**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2006.

CRAYN, D. M.; WINTER, K.; SMITH, J. A. C. 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**, v. 110, n. 10, p. 3703-3708, 2004.

ENDRES, L.; MERCIER, H. Ammonium and urea as nitrogen sources for bromeliads. **Journal Plant Physiology**, v. 158, n. 2, p. 205-212, 2001.

FRESCHI, L. et al. Specific leaf areas of the tank bromeliad *Guzmania monostachia* perform distinct functions in response to water shortage. **Journal Plant Physiology**, v. 167, n. 7, p. 526-533, 2010.

GARTEN, C.T. JR. Nitrogen isotope composition of ammonium and nitrate and bulk precipitation and forest throughfall. **International Journal Environmental Analytical Chemistry**, v. 87, n. 1, p. 33-45, 1991.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

GIVINISH, T. J. et al. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 5, p. 01-24, 2011.

GONÇALVES, A. Z. et al. Trade-off between soluble protein production and nutritional storage in Bromeliaceae. **Annals of Botany**, v. 118, n. 6, p.1199-1208, 2016.

GOVAERTS, R.; LUTHER, H. E.; GRANT, J. World checklist of Bromeliaceae. Facilitated by the Royal Botanic Gardens. <http://apps.kew.org/wcsp/>, 2016.

HABIBI, G.; HAJIBOLAND, R. Comparison of water stress and UV radiation effects on induction of CAM and antioxidative defense in the succulent *Rosularia elymaitica* (Crassulaceae). **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, v. 53, n. 2, p. 15-24, 2011.

HESSINI, K. et al. Ammonium nutrition in the halophyte *Spartina alterniflora* under salt stress: evidence for a priming effect of ammonium?. **Plant and soil**, v. 370, n. 1-2, p. 163-173, 2013.

INSELSBACHER, E. et al. Microbial activities and foliar uptake of nitrogen in epiphytic tank bromeliad *Vriesea gigantea*. **New Phytologist**, v. 175, n. 2, p. 311-320, 2007.

JACQUES-FÉLIX, H. The discovery of a bromeliad in Africa: *Pitcairnia feliciana*. **Selbyana**, v. 21, n. 1-2, p. 118-124, 2000.

KELEY, J. E.; RUNDEL, F. W. Evolution of CAM and C4 carbon concentrating mechanisms. **International Journal of Plant Science**, v. 164, n. 3, 55-77, 2003.

KLEINGESINDS, C. K. **Bactérias diazotróficas em *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae): identificação, sinalização e colonização dos tecidos foliares**. 2016. 93 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

LEROY, C. et al. Potential sources of nitrogen in an ant-garden tank-bromeliad. **Plant Signaling & Behavior**, v. 4, n. 9, p. 868-870, 2009.

LUTHER, H. E. **An alphabetical list of bromeliad binomials**. 12 ed. Sarasota: Sarasota Bromeliad Society and Marie Salby Botanical Gardens, 2010.

- LÜTTGE, U. Vascular epiphytes: setting the scene. In: LÜTTGE, U. (ed.). **Vascular Plants as Epiphytes**. Ecological Studies (Analysis and Synthesis), v. 76. Heidelberg: Springer, 1989.
- LÜTTGE, U. Ecophysiology of crassulacean acid metabolism (CAM). **Annals of botany**, v. 93, n. 6, p. 629-652, 2004.
- MARTINELLI, G. et al. Bromeliaceae da Mata Atlântica Brasileira Lista de Espécies, Distribuição e Conservação. **Rodriguesia**, v. 59, n. 1, p. 209-258, 2008.
- MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. **Bromeliaceae**. Livro vermelho da flora do Brasil. Rio de Janeiro: Centro nacional de conservação da flora, 2013.
- MATIZ, A. et al. CAM photosynthesis in bromeliads and agaves: what can we learn from these plants?. In: DUBINSKY, Z. (Ed.). **Photosynthesis**. In:Tech. 2013. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/photosynthesis/cam-photosynthesis-in-bromeliads-and-agaves-what-can-we-learn-from-these-plants->> Acesso em: 12 de agosto de 2017.
- MERCIER, H. et al. Growth and GDH and AAT isoenzyme patterns in terrestrial and epiphytic bromeliads as influenced by nitrogen source. **Selbyana**, v. 18, n. 1, p. 89-94, 1997.
- NADKARNI, N. M.; MERWIN, M. C.; NIEDER, J. Forest Canopies: Plant diversity. In: LEVIN, S. (Ed.). **Encyclopedia of biodiversity**. San Diego: Academic Press, p. 27-40, 2001.
- NIEVOLA, C. C.; MERCIER, H. A importância dos sistemas foliar e radicular na assimilação do nitrato em *Vriesea fosteriana*. **Revista Bromélia**, v. 3, n. 3, p. 14-18, 1996.
- OLSON, J. M.; BLANKENSHIP, R. E. Thinking about the evolution of photosynthesis. **Photosynth Res.**, v. 80, p. 373-396, 2004.
- OSMOND, C. B. Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 29, p. 379-414, 1978.
- PADILHA, V. **Bromeliads**. New York: Crow Publishers Inc., 1973.
- PITTENDRIGH, C. S. The Bromeliad-Anopheles-Complex in Trinidad, the Bromeliad Flora. **Society for the Study of Evolution**, v. 2, n. 1, p. 58-89, 1948.
- RODRIGUES, M. A. et al. Implications of leaf ontogeny on drought-induced gradients of CAM expression and ABA levels in rosettes of the epiphytic tank bromeliad *Guzmania monostachia*. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 108, p. 400-411, 2016.

RODRIGUES, M. A. et al. Interactions between nutrients and crassulacean acid metabolism. In: LÜTTGE, U; BEYSCHLAG, W.; CUSHMAN, J. (Eds.). **Progress in Botany (Genetics – Physiology – Systematics – Ecology)**, v. 75. Heidelberg: Springer, 2014.

RICHARDSON, B. A. The bromeliad microcosm and the assessment of faunal diversity in a neotropical forest. **Biotropica**, v. 31, n. 2, p. 321-336, 1999.

ROMERO, G. Q. et al. Nitrogen fluxes from treefrogs to tank epiphytic bromeliads: an isotopic and physiological approach. **Oecologia**, v. 162, n. 4, p. 941-949, 2010.

SAKAI, W. S.; SANFORD, W. G. Ultrastructure of the water-absorbing trichomes of pineapple (*Ananas comosus*, Bromeliaceae). **Annals of Botany**, v. 46, n. 1, p. 7-11, 1980.

SIDERIS, C. P.; YOUNG, H. Y. Effects of nitrogen on chlorophyll, acidity, ascorbic acid, and carbohydrate fractions of *Ananas comosus* (L.) Merr. **Plant Physiology**, v. 22, n. 2, p. 97-116, 1947.

SLESIAK, I.; MISZALSKI, Z. Superoxide dismutase-like protein from roots of the intermediate C₃-CAM plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. in in vitro culture. **Plant Science**, v. 164, n. 4, p. 497-505, 2003.

SLESIAK, I. et al. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. **Acta Biochemistry Polonica**, v. 54, n. 1, p. 39-50, 2007.

TAKAHASHI, C. A.; MERCIER, H. Nitrogen metabolism in leaves of a tank epiphytic bromeliad: Characterization of a spatial and functional division. **Journal Plant Physiology**, v. 168, n. 11, p. 1208-1216, 2011.

VANHOUTTE, B. et al. Water and nutrient uptake in *Vriesea* cultivars: Trichomes vs. Roots. **Environmental and Experimental Botany**, v. 136, p. 21-30, 2017.

WINTER, K.; SMITH, J. A. C. An introduction to crassulacean acid metabolism. Biochemical principles and ecological diversity. In: WINTER K.; SMITH, J. A. C. (Eds.). **Crassulacean acid metabolism**. Ecological Studies (Analysis and Synthesis), Berlin: Springer-Verlag, v. 114, p. 1-13, 1996.

ZOTZ, G.; WILHELM, K.; BECKER, A. Heteroblasty - a review. **The Botanical Review**, v. 77, n. 2, p. 109-151, 2011.

ZOTZ, G.; HIETZ, P. The physiological ecology of vascular epiphytes: current knowledge, open questions. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 364, p. 2067-2078, 2001.

Resumo Geral

Resumo

As bromélias são plantas que podem utilizar o nitrogênio em suas formas inorgânica e orgânica. Algumas delas apresentam comportamento heteroblástico, isto é, na fase adulta apresentam a sobreposição das folhas, formando um tanque, o qual pode armazenar água e nutrientes. Já na fase juvenil, também chamada de atmosférica, ou seja, com tanque inexistente. Plantas adultas da espécie heteroblástica *Guzmania monostachia* quando cultivadas na natureza parece preferir o nitrogênio na forma amoniacal ou ureídica; no entanto, para as atmosféricas não existem estudos a respeito. Quanto à fotossíntese, plantas adultas com tanque de *G. monostachia* apresentam um sistema facultativo, isto é, numa condição hídrica favorável realizam a fotossíntese C₃, já sob seca, podem alterar para o metabolismo ácido das crassuláceas (CAM). Por outro lado, as plantas atmosféricas dessa espécie expressam o CAM constitutivamente. Em resposta às adversidades ambientais, como a seca temporária ou a indisponibilidade de nutrientes, um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pode ocorrer e, dependendo da concentração alcançada nos tecidos, pode causar injúrias. Entretanto, as ROS também podem estar envolvidas com processos de sinalização celular, desde que em baixas concentrações. Folhas destacadas de plantas adultas de *Guzmania monostachia*, submetidas a um déficit hídrico e cultivadas na presença de diferentes fontes nitrogenadas, mostraram diferentes intensidades de CAM e teores consideráveis de ROS no ápice foliar. Entretanto, pouco se conhece, até o momento, sobre a modulação do CAM e a produção de ROS em plantas da fase juvenil. Os principais objetivos desta pesquisa foram 1) investigar quais seriam as fontes nitrogenadas mais propícias ao crescimento, desenvolvimento e sobre a anatomia de plantas atmosféricas de *Guzmania monostachia* cultivadas in vitro na presença isolada de nitrato, amônio, glutamina ou ureia, na concentração total de N de 5mM. 2) analisar os efeitos do cultivo prévio de plantas atmosféricas em diferentes fontes de nitrogênio (mesmas condições acima) submetidas, em seguida, a um período de 7 dias de déficit hídrico provocado por PEG adicionado ao meio de cultura, sobre a modulação da intensidade do CAM, produção de ROS e atividades das enzimas antioxidantes. Foram realizadas análises morfológicas, anatômicas, além das fisiológicas, como conteúdo de pigmentos fotossintéticos, proteínas solúveis totais e aminoácidos totais (capítulo 1). Além disso, analisaram-se a suculência foliar, o acúmulo noturno de ácidos orgânicos, conteúdo de H₂O₂, atividade das enzimas PEPC e das relacionadas ao sistema antioxidante (capítulo 2). Os resultados de cultivo in vitro apontam que diferentes fontes nitrogenadas modificam metabolicamente e estruturalmente a bromélia *Guzmania monostachia* na fase atmosférica, sendo a fonte nítrica a que propiciou o surgimento de maiores proporções dos parênquimas aquífero e clorofiliano, aumentando a possibilidade de estocagem de água e de produção de clorofilas e carotenoides. Diferentemente das outras fontes de N, o nitrato foi a que propiciou o maior acúmulo noturno de ácidos orgânicos nas plantas submetidas à deficiência hídrica. Houve também uma maior suculência dos tecidos no tratamento com nitrato, mesmo após a imposição dos 7 dias de deficiência hídrica, indicando que um aumento na capacidade de armazenar água possa ser uma condição estrutural importante para se incrementar a expressão do CAM. O conteúdo de peróxido de hidrogênio aumentou quando as plantas previamente cultivadas em nitrato foram submetidas ao déficit hídrico, sugerindo que essa ROS poderia atuar como um sinalizador na modulação positiva do CAM; já que as atividades das enzimas antioxidantes diminuíram em relação

ao controle (SOD e GR) ou permaneceram iguais estatisticamente (CAT, APX, GPOX). Em conclusão, as plantas atmosféricas de *Guzmania monostachia*, cresceram e se desenvolveram mais adequadamente na presença de nitrato e esta forma de N propiciou um aumento da suculência e da intensidade do CAM, quando houve a posterior imposição de um período de deficiência hídrica, sugerindo um aumento da tolerância à falta de água. Ao contrário, trabalhos anteriores do grupo mostraram que as plantas adultas com tanque de *G. monostachia* intensificaram o CAM na presença de amônio, indicando, portanto, que plantas de diferentes fases de desenvolvimento possuem, além de diferenças morfológicas, comportamentos fisiológicos diferentes.

Palavras-chave: Bromeliaceae, fontes nitrogenadas, cultivo in vitro, fotossíntese CAM, enzimas antioxidantes.

Abstract

Bromeliads are plants that can use inorganic and organic nitrogen forms. Some of them feature the heteroblastic behavior which in adulthood have an overlapping of leaves forming a tank that can store water and nutrients. On the other hand, the juvenile phase, also called atmospheric, that is, with no tank. Adult plants of the bromeliad species *Guzmania monostachia* are heteroblastic when growing in the wild and seem to prefer ammonium and urea. However, to the best of our knowledge, there are no studies with the atmospheric plants. Considering the photosynthetic metabolism, *G. monostachia* adult plants have a facultative system where the plant performs the C₃ metabolism in good water conditions and change to the Crassulacean acid metabolism (CAM) under drought. Furthermore, plants of this species can express CAM constitutively. In response to environmental adversities, such as drought or variation in nutrient availability, an increase in the production of reactive oxygen species (ROS) can occur and, depending on the concentration achieved in their tissues, can cause injury. However, the ROS can also be involved in the processes of signaling of the cells when at low concentrations. Leaves that were withdrawn from adult plants of *G. monostachia* and were subjected to treatments of water deficit and different nitrogen sources showed different intensities of CAM and considerable levels of ROS in the foliar apex. However, little is known about the modulation of the CAM metabolism and the production of ROS in the juvenile *G. monostachia* bromeliads. The aims of this research were to 1) investigate which nitrogen source contribute more to the growth, development and on the anatomy of atmospheric plants cultivated in vitro with isolated nitrate, ammonium, glutamine or urea, in a total N concentration of 5 mM; 2) examine the effects of the previous cultivation of atmospheric plants in different nitrogen sources on the modulation of the intensity of the CAM, ROS production and activities of antioxidant enzymes when the plants were submitted to in a period of seven days of water deficit caused by PEG added to the culture medium. Morphometric, physiological, anatomical and the photosynthetic pigments, total soluble proteins and amino acids were analyzed (Chapter 1). In addition, foliar succulence the accumulation of nocturnal organic acids, H₂O₂ content, the activity of PEPC enzymes and the antioxidant system related were analyzed, (Chapter 2). The results of in vitro cultivation indicated that different nitrogen sources modified the metabolism and the tissue structure of the atmospheric *Guzmania monostachia*, as the nitrate provided the emergence of the larger proportions of the aquifer and chlorophyll parenchyma, increasing the possibility of water storage and production of chlorophylls and carotenoids. Unlike other sources of N, nitrate was the only that provided the greatest accumulation of nocturnal organic acids in plants submitted to water deficiency. There was also a greater succulence in the tissues submitted to the nitrate treatment, even after the exposition of

seven days of water deficit, indicating an increase in the capacity of storing water that can be an important structural condition to increase the expression of CAM. The H_2O_2 content increased when the plants previously cultivated in nitrate were submitted to water deficit, suggesting that ROS could act as a signaling in the modulation of the CAM metabolism as the activities of antioxidant enzymes decreased compared to the control treatments (SOD and GR) or remained the statistically same (CAT, APX, GPOX). In conclusion, the atmospheric plants grew and developed more in the presence of nitrate and this form of N provided an increment in leaf succulence and intensification of CAM when there was the subsequent imposition of a period of water deficit, suggesting an increment of the tolerance for water deficit conditions. In contrast, previous researches showed that the adult plants of *G. monostachia* with tank intensified the CAM in the presence of ammonium, indicating that plants of different stages of development have, in addition to morphological differences, differences in their physiological behaviors.

Keywords: Bromeliaceae, nitrogenous sources, in vitro cultivation, CAM photosynthesis, antioxidant enzymes.