Leonardo Hamachi

Competência para a expressão da fotossíntese CAM
em plantas de *Guzmania monostachia*
(Bromeliaceae) em diferentes fases ontogenéticas.

São Paulo

2013

Leonardo Hamachi

Competência para a expressão da fotossíntese CAM
em plantas de *Guzmania monostachia*
(Bromeliaceae) em diferentes fases ontogenéticas.

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

Orientadora: Profa. Dra. Helenice Mercier

São Paulo

2013

Ficha Catalográfica

Hamachi, Leonardo

Competência para a expressão da fotossíntese CAM em plantas de *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae) em diferentes fases ontogenéticas. Número de páginas: 60

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

1. Bromélia epífita. 2. Fotossíntese CAM.
3. Ontogenia. 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

“Os impulsos criativos, diferente dos possessivos, são direcionados para fins nos quais o ganho de um homem não é a perda de outro. O homem que faz uma descoberta científica ou um poema está enriquecendo os outros e, ao mesmo tempo, a si mesmo.”

Bertrand Russell

Dedico este trabalho a todos os colegas que se empenham em desenvolver o
conhecimento.

Agradecimentos

À minha mãe, Helena Lopes Pinto, que sempre acreditou em mim e me apoiou independente das escolhas que fiz em minha vida e também pelo apoio moral e material.

Ao meu pai Valter Hamachi por entender que trabalhar com o conhecimento me torna uma pessoa realizada e pelo apoio material.

À Manu, que foi fundamental para que eu pudesse concluir a redação dessa dissertação.

À Profa. Dra. Helenice Mercier por ter me dado a oportunidade de desenvolver esse trabalho no laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal, pela inestimável orientação e por liderar um grupo de pesquisa tão especial.

Ao Prof. Dr. Luciano Freschi, que têm feito um trabalho admirável, não só como pesquisador, mas também como organizador do laboratório e pelas ideias perspicazes que iluminaram o meu trabalho em momentos nos quais os dados obtidos pareciam não fazer sentido.

Ao Prof. Dr. Gilberto Barbante Kerbauy por compartilhar sua vasta experiência e conhecimentos na área da Fisiologia Vegetal.

À Dra. Maria Aurineide Rodrigues pela colaboração.

Aos alunos de pós-graduação Paulo Mioto e Paula Natália Pereira pelos ensinamentos sobre como trabalhar com a Espécie *Guzmania monostachia* e com o metabolismo ácido das crassuláceas.

À Cassia Ayumi Takahashi pelas aulas de organização em laboratório e pelas conversas a respeito da fisiologia das bromélias.

À Aline Tiemi pelas inestimáveis ajudas no laboratório.

Ao Paulo Mioto e à Alejandra Matiz, que me ajudaram a revisar este texto.

Ao técnico Maxwell Andrade e ao Professor Doutor Eduardo Purgatto pela grande ajuda com as análises em cromatografia líquida de alta pressão.

Aos técnicos do laboratório, Ana Maria, Wiliam, André, Rita e Cíntia, pelo auxílio diário.

Aos Rafael, Paulo Marcelo Rainer, Bruno, Filipe, Lucas, Nielda, Aline Berdinatto, Michel, Bruna e todos os membros do grupo já mencionados pela ótima convivência, pelos momentos de confraternização e bom humor além das discussões científicas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida para que eu realizasse este projeto (processo 2011/04963-2).

Índice

I. Introdução	1
II. Objetivos	14
III. Material e Métodos	16
IV. Resultados.....	23
V. Discussão.....	34
VI. Conclusões	47
Referências Bibliográficas.....	53

I. Introdução

A família Bromeliaceae é nativa dos trópicos e subtropicais do Novo Mundo, constituindo um dos clados morfológicamente mais distintos e ecologicamente diversos de Angiospermae. Atualmente, acredita-se que as bromélias surgiram em ambientes extremamente úmidos, com luminosidade relativamente alta e solos inférteis, onde tricomas absorptivos nas epidermes dessas plantas representaram uma vantagem evolutiva (Pittendrigh, 1948; Crayn *et al.*, 2004; Givinish *et al.*, 2001). Esse evento deve ter ocorrido na região do Escudo das Guianas há aproximadamente 100 milhões de anos. Posteriormente a família se dispersou para outras regiões da América e para a África (Givinish *et al.*, 2011).

Dentre as bromélias, são descritos 58 gêneros e 3140 espécies (Givinish *et al.*, 2011). Recentemente, Givinish *et al.* (2011) utilizaram múltiplos marcadores moleculares e construíram uma filogenia consistente, reestruturando a família, antes dividida em Pitcarnoideae, Bromelioideae e Tillandsioideae, nas subfamílias Pitcarnoideae, Brocchioideae, Lindmanioideae, Hechtioideae, Navioideae, Pitcarnoideae, Tillandsioideae, Bromelioideae e Puyoideae.

Os hábitos de vida das bromélias variam de plantas terrícolas até epífitas extremas, completamente independentes do solo como substrato (Pittendrigh, 1948; Crayn *et al.*, 2004). As epífitas destacam-se por serem capazes de viver em ambientes onde a luminosidade e as disponibilidades de nutrientes e água são altamente variáveis, sendo esses os principais fatores limitantes ao desenvolvimento dessas plantas (Zotz & Tomas, 1999).

O hábito epífito é característico, sobretudo, das subfamílias Tillandsioideae e Bromelioideae (Pittendrigh, 1948; Crayn *et al.*, 2004; Givinish *et al.*, 2011). Essas bromélias desenvolveram adaptações anatômicas, morfológicas e fisiológicas notáveis que as permitiram lidar com as condições intrínsecas do epifitismo. Supõe-se que os tricomas absortivos sejam de vital importância para a evolução do hábito epifítico (Crayn *et al.*, 2004). Estas estruturas funcionam como uma via de único sentido para a entrada de água e nutrientes nela dissolvidos, conferindo às folhas uma propriedade de permeabilidade (Benzing & Renfrow, 1974; Benzing *et al.*, 1978). Já nas raízes das bromélias epífitas são reduzidas, ou quase inexistentes, com a função majoritária de fixação ao hospedeiro (Pittendrigh, 1948).

Pittendrigh (1948) propôs uma divisão das bromélias epífitas em duas categorias: uma delas é a que possui tanque e a outra, sem tanque, que foi denominada atmosférica. No primeiro caso as bases expandidas das folhas são imbricadas, ricas em tricomas epidérmicos bem desenvolvidos, formando o tanque, isto é, uma estrutura que acumula e absorve a água proveniente da chuva, excretas de animais e detritos, prolongando, a disponibilidade de água e nutrientes em períodos secos (Pittendrigh, 1948; Zotz & Tomas, 1999; Takahashi *et al.*, 2007). No segundo caso, as plantas são geralmente suculentas, de tamanho reduzido, não há formação de tanque e os tricomas cobrem densamente toda a planta. Esses pelos absorventes são responsáveis pela absorção de água e nutrientes (Pittendrigh, 1948, Benzing *et al.*, 1978), além de dificultarem a transpiração e, quando secos, refletem o excesso de luminosidade, auxiliando no combate ao estresse hídrico e luminoso, típicos de ambientes expostos ao sol (Benzing *et al.*, 1978).

As plantas vasculares podem ser classificadas de acordo com suas respostas ao déficit hídrico como “evitadoras de seca” ou tolerantes a ela. As que evitam a seca dirigem seu metabolismo no sentido de manter o potencial hídrico (Ψ_w) elevado, diminuindo a percepção do déficit hídrico pelas células. Já as que toleram a seca resistem a uma grande perda d’água, acompanhada pela queda do Ψ_w e do conteúdo relativo d’água (Wood, 2005).

Em bromélias uma estratégia de evitar a seca é fechar rapidamente os estômatos quando o suprimento de água do tanque se esgota, ou quando a desidratação dos tecidos atinge um nível crítico (Zotz & Andrade, 1997; Zotz & Hietz, 2001). Enquanto a tolerância à seca envolve a capacidade de resistir a altos déficits hídricos (Zotz & Hietz, 2001), mantendo, ainda assim, o metabolismo ativo (Zotz & Andrade, 1997; Graham & Andrade, 2004; Reyes-García *et al.*, 2008a; Reyes-García *et al.*, 2008b).

Dados da literatura apontam para a possibilidade de que as formas com tanque utilizem preferencialmente a estratégia de evitar a seca, enquanto as atmosféricas sejam tolerantes a ela (Reyes-García *et al.*, 2008a; Reyes-García *et al.*, 2008b; Reyes-García *et al.*, 2011). Reyes-García *et al.* (2011) realizaram um experimento, quantificando a presença do isótopo ^{18}O na água de folhas de bromélias, concluindo que as formas com tanque possuíam uma menor proporção entre O^{18} e O^{16} , o que segundo os autores indicaria menor taxa de transpiração e maior controle estomático da transpiração do que formas atmosféricas, que, por não serem dotadas de tal mecanismo, necessitam tolerar as flutuações no teor relativo de água (Martin, 1994).

Outra adaptação presente na família Bromeliaceae é o metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) (Crayn *et al.*, 2004). O CAM é uma adaptação fotossintética que surgiu, independentemente, várias vezes na evolução das plantas vasculares, possivelmente por meio da reorganização de vias metabólicas já existentes em plantas C_3 (West-Eberhard *et al.*, 2011). Assim como a fotossíntese C_4 , o CAM é considerado um mecanismo de concentração de gás carbônico (CO_2) em torno do sítio ativo da enzima ribulose bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) presente nas plantas vasculares (Keeley & Rundel, 2003). Devido ao comportamento estomático, que será descrito adiante, as plantas CAM são dotadas de uma melhor eficiência no uso da água em comparação com as plantas de fotossínteses C_3 e C_4 , permitindo-as colonizar com sucesso ambientes xeromórficos e epífitos, onde há a maior riqueza de espécies CAM (Lüttge, 2004; Lüttge, 2011).

Osmond (1978) realizou um importante trabalho ao descrever o ciclo diário do CAM, dividindo-o em 4 fases. A fase I é caracterizada pela abertura noturna dos estômatos, quando a umidade relativa do ar é alta, a evapotranspiração é baixa e o CO_2 atmosférico e respiratório é convertido a HCO_3^- pela enzima anidrase carbônica. O bicarbonato é fixado pela enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) em oxaloacetato e o substrato de 3 carbonos, fosfoenolpiruvato (PEP), é formado pela quebra glicolítica do amido ou de açúcares solúveis. A enzima malato desidrogenase (MDH) converte oxaloacetato no produto final da carboxilação, o malato, que é armazenado nos vacúolos.

A mudança para a fase II ocorre durante a transição noite/dia, quando há simultaneamente a assimilação de CO_2 mediada pela Rubisco e pela PEPC, que devido

a sua desfosforilação e ao aumento da concentração citosólica de malato, sofre um decréscimo progressivo de sua atividade. Posteriormente, na fase III, os estômatos se fecham e o malato é descarboxilado no citosol fornecendo CO₂ em altas concentrações para a Rubisco. A perda d'água é reduzida devido ao fechamento estomático. Por fim, a fase IV é marcada pela exaustão das reservas de malato e reabertura dos estômatos que proporciona a entrada de CO₂ e sua assimilação pela Rubisco (Osmond, 1978; Borland *et al.*, 2011).

Embora o trabalho de Osmond (1978) tenha sido fundamental para a compreensão do CAM, o padrão de trocas gasosas em cada fase descrito por ele é uma classificação artificial que apresenta ampla margem de variação, a qual pode ser alterada dependendo do estímulo ambiental a que a planta for submetida, alternando de um ganho de carbono nulo ao longo do ciclo diário, até 24 horas contínuas de assimilação de CO₂ (Dodd *et al.*, 2002; Cushman & Borland, 2002; Borland *et al.*, 2011). Por esse motivo, diferentes padrões de comportamento estomático e trocas gasosas associados ao acúmulo noturno de ácidos orgânicos foram descritos como explicado a seguir.

O **CAM constitutivo** ou obrigatório é expresso nos tecidos fotossintéticos dependendo única e exclusivamente da maturidade, enquanto o **C₃-CAM facultativo**, também conhecido como CAM induzível ou opcional, ocorre em plantas que manifestam o CAM em respostas a estímulos ambientais (Silvera *et al.*, 2010). Essa capacidade de indução 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 apresentou, em média, uma assimilação

noturna menor do que 30% da aquisição de carbono total da planta (Herrera *et al.*, 2009).

O **CAM cycling**, apresenta um padrão de trocas gasosas semelhante ao da fotossíntese C₃, assimilando carbono durante o dia pela Rubisco. Entretanto, durante a noite o CO₂ proveniente da respiração é refixado através da PEPC, resultando em flutuações na acidez nos tecidos fotossintéticos no ciclo dia/noite. Este padrão é considerado uma forma basal do CAM. Já o **CAM idling** é característico de condições de estresse hídrico severo, quando ocorrem pequenas flutuações na acidez dos tecidos fotossintéticos no ciclo dia/noite e todo o malato produzido é proveniente da reciclagem do CO₂ respiratório. Por fim, o **CAM latente** se caracteriza pela manutenção de altos níveis de acidez durante todo o ciclo. Tanto o CAM *cycling*, quanto o CAM latente podem ser considerados passos evolutivos intermediários entre a fotossíntese C₃ e o CAM (Silvera *et al.*, 2010).

Além da plasticidade fisiológica, diversos trabalhos têm indicado que a ontogenia possui papel importante no controle da expressão do CAM. Plantas em fase juvenil realizam a fotossíntese majoritariamente via Rubisco e, à medida que essas plantas se tornam maduras, a contribuição da PEPC para a fixação de carbono aumenta. Winter *et al.* (2008) demonstraram que plantas jovens de *Clusia* (Clusiaceae) assimilam CO₂ durante o dia e, no decorrer do desenvolvimento, a fixação noturna do carbono adquire maior importância, podendo ainda ser estimulada por déficits hídricos. Eles também verificaram que plantas derivadas de propagação vegetativa de espécies de *Kalanchoe* (Crassulaceae) e de *Opuntia* (Cactaceae) apresentavam comportamento semelhante. Em um trabalho mais recente, sementes de *Opuntia*

elatior foram germinadas e o fenômeno foi observado novamente, desta vez nas plântulas da espécie (Winter *et al.*, 2011). Em contrapartida, mesmo que a fotossíntese C_3 seja predominante em plantas jovens, flutuações noturnas de acidez típicas do CAM já foram observadas em cladódios imaturos de outras espécies de cactos (Hernández-Gonzales & Villarreal, 2007).

Alguns trabalhos, também investigaram a influência do desenvolvimento das folhas na aquisição de competência para a expressão do CAM. Jones (1975) observou que folhas maduras da espécie CAM-constitutiva *Kalanchöe fedtschenkoi* (Crassulaceae) demonstravam grandes aumentos noturnos na acidez titulável, consequência do acúmulo noturno do ácido málico, concomitante ao ganho de carbono, enquanto folhas jovens apresentavam aumentos noturnos de acidez mais discretos sem ganho de carbono. Holthe *et al.* (1983) verificaram que folhas da epífita *Peperomia scandens* (Piperaceae) expressam o CAM *cycling* quando ainda estão em fase de expansão e, posteriormente, adquirem a capacidade de abrir os estômatos à noite para assimilar o CO_2 atmosférico, indicando a expressão de um CAM constitutivo, de maior intensidade. Outros pesquisadores ainda observaram para outras espécies que, além da dependência do estágio de desenvolvimento dos órgãos fotossintetizantes, o CAM diminui sua intensidade em folhas prestes a iniciar o processo da senescência (Guralnick *et al.*, 1984; Guo & Lee, 2006; Klavsen & Madsen, 2008). Todavia, nenhum desses autores submeteu as plantas a uma restrição hídrica.

Jones (1975) sugeriu que tecidos maduros teriam vacúolos maiores que possibilitariam armazenar uma maior quantidade do ácido málico produzido durante a noite. De fato, células do parênquima clorofiliano de plantas CAM costumam ser

volumosas e ter grandes vacúolos (Sage & Nelson 2008; Borland *et al.*, 2011). Dados bioquímicos também evidenciam a mudança ontogenética da fotossíntese C₃ para o CAM. Em *Mesembryanthemum crystallinum* (Aizoaceae), por exemplo, Fißthaler *et al.* (1994) observaram que a enzima piruvato ortofofato dicinase (PPDK), responsável pela fosforilação do piruvato resultante da descarboxilação do malato, tem sua quantidade de transcritos e atividade aumentadas durante a transição ontogenética de C₃ para CAM. Outra enzima que parece ter um papel chave na regulação idade-dependente do CAM seria a fosfoenolpiruvato carboxilase cinase (PEPC cinase), a enzima que fosforila a PEPC ativando-a. Hartwell (1999) quantificou os transcritos dessa enzima em *Kalanchoe fedtschenkoi* e constatou que durante a noite os níveis de RNAm da proteína aumentavam à medida que a folha se tornava mais desenvolvida, acompanhando um incremento do acúmulo de ácido málico nos tecidos.

A subfamília Tillandsioideae, assim como a família Bromeliaceae, provavelmente teve origem a partir de espécies ancestrais que realizavam a fotossíntese C₃. O CAM surgiu posteriormente e é possível que esteja relacionado à evolução de espécies mais xéricas, como, por exemplo, as que apresentam a forma atmosférica (Crayn *et al.*, 2004, Givinish *et al.*, 2011). Neste clado, a espécie *Guzmania monostachia* (L.) Rusby ex Mez var *monostachia* é uma bromélia epífita com tanque e depende de seus tricomas para absorver água e nutrientes (Pittendrigh, 1948; Benzing & Renfrow, 1974; Zotz & Hietz, 2001; Freschi *et al.*, 2010). Encontrada desde a América Central até o nordeste do Brasil (Pittendrigh, 1948; Martinelli *et al.*, 2008), essa espécie é considerada uma bromélia C₃-CAM facultativa (Martin, 1994; Maxwell, 2002).

A bromélia *Guzmania monostachia* geralmente encontra-se em copas de árvores bem iluminadas ocupando ambientes úmidos. Porém, ela pode ocorrer tanto em ambientes sombreados quanto totalmente expostos à luz, o que reflete sua alta adaptabilidade ao ambiente epífita (Pittendrigh, 1948; Maxwell *et al.*, 1992; 1994; 1995; 1999; Maxwell, 2002). Maxwell *et al.* (1992; 1994; 1995; 1999) realizaram uma série de trabalhos nos quais verificaram que a *G. monostachia* apresentava respostas fisiológicas de fotoproteção quando expostas a altas luminosidades, como a 1) fotoinibição, inferida através de parâmetros de fluorescência de clorofila, 2) o aumento da quantidade total de xantofilas e da produção de zeaxantina, pigmentos importantes para a dissipação do excesso de energia luminosa através do calor e 3) a indução ao CAM. Maxwell (2002) ainda observou que o CAM em *G. monostachia* mantinha uma alta taxa de transporte de elétrons através da descarboxilação do malato durante o período do meio-dia o que poderia ser importante como uma adaptação à exposição à luz no nicho epífita, representando uma vantagem seletiva.

No Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal do IB-USP tem sido observado que plantas adultas em fase vegetativa de *G. monostachia* podem apresentar um aumento no CAM sob déficit hídrico (Freschi *et al.*, 2010; Miotto, 2012 e Pereira, 2012). Freschi *et al.* (2010) suspenderam a rega de um grupo de plantas da espécie e analisaram 3 porções das folhas da bromélia: a apical, a mediana e a basal. Esta última possuía as maiores densidades de tricomas e espessura do hidrênquima, baixas densidades estomáticas, sofria maior perda d'água, apresentava menor teor de clorofila e incapacidade de indução ao CAM, indicando, talvez, a função absorviva de água e nutrientes por essa região. Já a porção apical, apresentava menores densidades de tricomas, maiores densidades estomáticas e de teores de clorofila, maiores

atividades das enzimas PEPC e MDH, bem como maior acúmulo noturno de acidez, sugerindo que o ápice estava funcionalmente mais voltado a realizar a fotossíntese e teria maior competência para a expressão do CAM (Freschi *et al.*, 2010).

Os pesquisadores ainda observaram que durante o aumento da expressão do CAM ocorreu a redução do teor de água na região basal da folha, acompanhada pela manutenção do mesmo parâmetro na região apical, resultado que sugeriu que, durante o déficit hídrico, houve transporte de água da porção basal para a apical da lâmina foliar (Freschi *et al.*, 2010), observações semelhantes foram feitas em trabalhos posteriores por Mioto & Mercier (2013) e Pereira *et al.* (2013).

Mioto & Mercier (2013) utilizaram folhas destacadas de *G. monostachia* para investigar o papel do fitormônio ácido abscísico (ABA) e do óxido nítrico (NO) nos aumentos na expressão da fotossíntese CAM nas mesmas porções das folhas estudadas por Freschi *et al.* (2010). Para isso, foram selecionados dois grupos de folhas: um bem suprido por água, cujas bases foliares foram imersas em água e outro em déficit hídrico, cujas bases foliares foram imersas em uma solução aquosa 30% de polietilenoglicol (PEG) durante 7 dias e quantificaram-se as atividades de enzimas chave do CAM e do ABA e NO. Nas regiões apicais das folhas em PEG houve acréscimos na atividade da PEPC e no acúmulo noturno de acidez acompanhados pela produção de NO. As porções medianas e basais das folhas não apresentaram indução significativa do CAM, ao passo que, ao longo de toda a lâmina foliar, houve um aumento nos teores de ABA. Esses resultados sugeriram que o ABA estava mais intimamente relacionado à sinalização da perda d'água na folha inteira, enquanto o

NO estaria participando da sinalização do CAM nas regiões apicais foliares do órgão (Mioto & Mercier, 2013).

Pereira *et al.* (2013) basearam-se no experimento com folhas destacadas de *G. monostachia* realizado por Mioto & Mercier (2013) e acompanharam a indução ao CAM e a atividade da redutase do nitrato (NR) em diferentes porções da lâmina foliar em ciclos diários. Com essa pesquisa pôde-se confirmar que a atividade da PEPC, bem como os aumentos noturnos de íons H^+ e malato foram maiores na porção apical das folhas, como relatado por Freschi *et al.* (2010) e Mioto & Mercier (2013), enquanto que a atividade da NR era maior na porção basal. Tanto a NR quanto a PEPC exibiram picos de atividade durante a noite. Ainda, os autores ressaltaram que não houve uma relação clara entre o ponto máximo de atividade da NR e a disponibilidade de esqueleto de carbono gerados pelo CAM, pois uma alta noturna da atividade da enzima também ocorreu em folhas controle, que estavam expressando a fotossíntese C_3 .

Esses experimentos realizados no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal nos deram uma boa base para a compreensão do aumento da expressão do CAM por déficit hídrico na da espécie *G. monostachia*. Porém, ainda não possuímos conhecimento sobre o papel da ontogenia na expressão e modulação do CAM nesta espécie C_3 -CAM facultativa.

A *G. monostachia*, assim como outras espécies da subfamília Tillandsioideae, demonstra o fenômeno da heteroblastia durante o desenvolvimento, o qual consiste em uma mudança brusca na morfologia da planta durante a ontogenia, nesse caso, exibindo a forma atmosférica no início da vida e posteriormente desenvolvendo a

forma com tanque (Zotz, 2011). Acredita-se que concomitantemente às alterações na forma, a estratégia fisiológica dessas bromélias passe de uma estratégia de tolerante à seca, na fase juvenil, à de “evitadora” dessa condição na fase adulta (Zotz & Thomas, 1999).

Poucos trabalhos foram realizados até o momento visando investigar a influência da ontogenia no CAM em espécies de bromélias heteroblásticas. Adams III & Martin (1986) suspenderam a rega de formas atmosféricas ou com tanque da espécie *Tillandsia deppeana* e não encontraram evidências de que ambas apresentassem competência de expressar o CAM. Ainda, esses autores constataram que as formas atmosféricas eram mais tolerantes à seca, exibindo reduzidas taxas de condutância foliar e transpiração, mantendo os estômatos abertos e a assimilação de CO₂ por um tempo prolongado de déficit hídrico. Já as plantas com tanque, possuíam maiores taxas de condutância foliar, transpiração e a assimilação de CO₂ decresciam de maneira acentuada quando seus reservatórios de água eram exauridos. Reinert & Meireles (1993) investigaram as estratégias de aquisição de água nas formas atmosféricas e com tanque da bromélia *Vriesea geniculata*. Seus resultados de trocas gasosas e flutuação noturna de acidez indicaram que a espécie realiza a fotossíntese C₃ em ambas as formas. Outro estudo que utilizou a espécie *Vriesea sanguinolenta* Cogn. & Marchal (syn. *Werauhia sanguinolenta*) demonstrou que a razão $\delta^{13}\text{C}$, independente da forma, era típica de plantas C₃ (Zotz *et al.*, 2004).

Contudo, sabe-se que espécies que apresentam a forma atmosférica na fase adulta são, na grande maioria, plantas CAM (Martin, 1994). Reyes-García (2008a) compararam as espécies com tanque *Tillandsia makoiana* e *Tillandsia rothii* às

bromélias adultas atmosféricas *Tillandsia eistetteri*, *Tillandsia ionantha*, *Tillandsia pseudobaileui*, *Tillandsia schiedeana* e verificaram que as formas com tanque apresentaram uma fotossíntese CAM mais fraca nos períodos secos, enquanto as formas atmosféricas aumentaram a expressão do CAM.

Recentemente Beltrán *et al.* (2013) publicaram um trabalho em que realizaram medidas de acúmulo noturno de acidez, trocas gasosas e razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ em três espécies de bromélias: *Werauhia sanguinolenta*, *Guzmania monostachia* e *Guzmania ligulata*. Esses autores concluíram que as formas atmosféricas de todas as espécies foram capazes de expressar um CAM de baixa intensidade.

Devido à escassez de pesquisas sobre a relação entre a ontogenia e o CAM em bromélias heteroblásticas, somada ao fato de que a espécie *Guzmania monostachia* é capaz de exibir a fotossíntese CAM induzível, decidimos estudar a indução ao CAM nesta espécie de bromélia, analisando a parte bioquímica do CAM (atividade das enzimas MDH e PEPC e acúmulo noturno de ácidos orgânicos) em diferentes fases ontogenéticas da planta inteira e em estágios diferentes de desenvolvimento das folhas.

II. Objetivos

O presente trabalho teve como principais objetivos:

1. Caracterizar a competência à indução ao CAM por déficit hídrico em plantas da bromélia epífita C_3 -CAM facultativa *Guzmania monostachia* em diferentes fases ontogenéticas. Além disso, verificar se há influência do estágio de desenvolvimento foliar sobre a capacidade de expressão do CAM.
2. Investigar como se daria a indução do CAM em porções apical e basal da lâmina foliar pertencentes a grupos de folhas em fases distintas de desenvolvimento.

Estratégias experimentais:

Para alcançar os objetivos propostos, o projeto foi dividido em duas etapas:

1. Na primeira delas, caracterizou-se o CAM em plantas pertencentes a 3 fases ontogenéticas e em 3 estágios de desenvolvimento das folhas.
 - a. As 3 fases ontogenéticas foram caracterizadas segundo a ausência ou a presença do tanque (uma fase atmosférica e duas fases tanque) e parâmetros biométricos, como o volume do tanque.
 - b. Em câmaras de cultivo, as plantas nas 3 fases de desenvolvimento foram submetidas a 7 dias de déficit hídrico. As folhas foram coletadas inteiras para as análises bioquímicas. Folhas de plantas atmosféricas foram reunidas em um único grupo devido à limitação de massa, tendo em vista o tamanho diminuto das plantas nessa fase ontogenética. As folhas de plantas com tanque foram divididas em 3 grupos, representando estágios de desenvolvimento distintos.

c. Para cada grupo de folha foram quantificados o conteúdo hídrico, as atividade das enzimas PEPC e MDH e os teores dos ácidos málico e cítrico para a determinação do acúmulo noturno desses ácidos orgânicos.

2. Na segunda etapa, procedeu-se a caracterização do CAM nas porções foliares basal e apical, analisando-se a competência para a expressão do CAM e relacionando ao conteúdo hídrico dessas regiões.

a. Foram selecionadas plantas com tanque bem desenvolvido, suas folhas foram separadas em 3 grupos. As folhas foram divididas em 3 porções foliares: basal, mediana e apical. A porção mediana foi descartada. As porções basal e apical foram utilizadas por apresentarem os comportamentos mais díspares entre si, seja com relação ao teor de água seja com relação à expressão do CAM.

b. Foram quantificadas os teores de água, as atividade das enzimas PEPC e MDH e os teores dos ácido málico nas porções basal e apical.

III. Material e Métodos

III. 1. Obtenção do material vegetal

As plantas de *Guzmania monostachia* (L.) Rusby ex Mez var. *monostachia* foram obtidas através do cultivo *in vitro* em meio de cultura composto por macronutrientes Knudson (1962) e micronutrientes Murashige & Skoog (1962). Nesta condição, o brotamento lateral ocorre naturalmente, sem a necessidade de adição de substâncias reguladoras do crescimento. Após cerca de 4 meses de cultivo *in vitro*, essas plantas foram transplantadas para uma mistura de substratos comerciais constituída por casca de pinus e pelo substrato “Tropistrato” (Vida Verde®) e transferidas para uma casa de vegetação no fitotério do IBUSP. Sob essas condições, as plantas foram adubadas a cada duas semanas com solução nutritiva de mesma formulação que a utilizada no cultivo *in vitro* das plantas, porém com os macronutrientes diluídos pela metade. As plantas foram cultivadas seguindo esse protocolo até atingirem as diferentes fases do desenvolvimento escolhidas para serem estudadas nesse trabalho: 1) atmosférica, quando ainda não apresentavam tanque; 2) Tanque-1, quando o tanque estava parcialmente formado; e 3) Tanque-2, quando o tanque estava bem desenvolvido (Fig. 1).

Figura 1. Plantas representantes das fases ontogenéticas selecionadas para os experimentos. Da esquerda para a direita: fase atmosférica, Tanque-1 e Tanque-2. Escala = 3cm.

III. 2. Caracterização morfológica do material vegetal utilizado

Medidas da altura e do diâmetro das rosetas (cm), do comprimento da maior folha, da massa fresca da planta (parte aérea e raízes) (g), do volume do tanque (mL) e do número de folhas foram tomadas de cada planta atmosférica, Tanque-1 e Tanque-2, antes do período de aclimação às condições experimentais. O volume do tanque foi estimado a partir do volume de água necessário para preencher todo o compartimento. A massa fresca foi determinada, pesando-se cada planta inteira.

III. 3. Tratamento de indução ao CAM e coleta das folhas para as análises bioquímicas

Antes de se iniciarem os experimentos, plantas nas 3 fases de desenvolvimento em estudo foram transferidas para sementeiras de isopor (plantas atmosféricas) ou vasos plásticos (plantas Tanque-1 e Tanque-2), preenchidos com vermiculita. Este substrato foi utilizado por ser pobre em nitrogênio, facilitando a indução ao CAM (de acordo com testes realizados no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento

Vegetal). As plantas foram aclimatadas por pelo menos 7 dias em câmaras de crescimento sob condições controladas de temperatura ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$), luminosidade ($200\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$), fotoperíodo (12 h) e umidade relativa ($70\pm 10\%$). Elas foram regadas diariamente de maneira que as folhas entrassem em contato com a água e os tanques, quando formados, fossem completamente preenchidos. Após o período de aclimação, plantas sob déficit hídrico tiveram seus tanques esvaziados e a rega foi suspensa por 7 dias (tratamento de indução ao CAM), sendo que, durante esse período, o grupo controle continuou a receber a rega diariamente.

Dois experimentais foram realizados: o primeiro visou caracterizar o CAM nas diferentes fases ontogenéticas da planta e nos estágios de desenvolvimento da folha. Depois dos 7 dias de tratamento, as plantas atmosféricas tiveram todas as suas folhas coletadas inteiras sem se distinguir o estágio de desenvolvimento em que se encontravam. Plantas com tanque (Tanque-1 e Tanque-2) tiveram suas folhas coletadas inteiras (todo o limbo foliar), distinguindo-se seus estágios de desenvolvimento de modo que o número total de folhas foi contado e, a seguir, dividido em 3 conjuntos: F1, F2 e F3. As folhas do grupo F1 foram as 7 mais internas da roseta (as folhas muito jovens, não foram utilizadas por estarem no centro do tanque em posição vertical, sob baixa incidência luminosa e eventualmente submersas em água); as do F2 compreenderam as 7 folhas seguintes na roseta e as do F3 foram as 7 folhas localizadas mais na base da roseta (Fig. 2).

Figura 2. Esquema representando a coleta realizada no primeiro experimento. Plantas atmosféricas tiveram suas folhas coletadas sem distinção em estágios de desenvolvimento. Já

as folhas das plantas Tanque-1 e Tanque-2 foram divididas em três grupos, representando diferentes estágios de desenvolvimento: F1, F2, F3.

No segundo experimental, foram utilizadas apenas plantas na fase Tanque-2. Após 7 dias de tratamento, as folhas foram separadas nos grupos F1, F2 e F3, como descrito anteriormente. Os limbos foliares foram, então, divididos em porções basal, mediana e apical. Dessas, foram utilizadas as porções de tecidos basal e apical.

Figura 3. Esquema representando a coleta realizada no segundo experimental. Plantas na fase Tanque-2 tiveram suas folhas separadas em 3 grupos representando diferentes estágios de desenvolvimento. As folhas também foram segmentadas em três porções (apical, mediana e basal) das quais apenas as regiões basal (mais jovem) e apical (mais madura) foram utilizadas para os ensaios.

III. 4. Determinação do teor de água

O teor de água presente nas folhas de *G. monostachia* foi analisado calculando-se o percentual de água contido em um grama de tecido fresco. Para tanto, as folhas das plantas submetidas ao déficit hídrico, além do controle, foram coletadas, uma hora antes do início do período de escuro. As amostras foram imediatamente pesadas para a determinação da massa fresca (MF). Em seguida, o material foi mantido em estufa a 60°C por 7 dias, seguindo-se pela determinação da matéria seca (MS). As coletas sempre foram realizadas em triplicatas. Os cálculos foram realizados conforme a seguinte equação: $TA (\%) = [(MF-MS) / MF] \times 100$.

III. 5. Parâmetros fisiológicos indicativos da expressão do CAM em resposta ao déficit hídrico

Determinação das atividades da PEPC e MDH

A determinação das atividades das enzimas PEPC e da MDH foi realizada pelo método descrito por Freschi *et al.* (2010). Amostras de tecido foliar (0.5 g de massa fresca) foram coletadas 1 hora depois do início do período de luz na câmara de crescimento. Elas foram maceradas em nitrogênio líquido e, em seguida, homogeneizadas com 2.5 mL do tampão de extração (pH 8.0), composto por 200 mM de Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM de MgCl₂, 5 mM de ditioneitol (DTT), 1 mM de EDTA, 0.5% (m/v) albumina bovina (BSA) e 10% (v/v) de glicerol. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 278.217 rcf por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante foi coletado e, em seguida, utilizado no ensaio enzimático. As atividades das

enzimas foram ensaiadas a 30°C. Para o ensaio da PEPC, foram utilizados em 1.6 mL de meio de reação contendo 50 mM de Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM de DTT, 10 mM de MgCl₂, 100 mM de NaHCO₃, 2 mM de NADH, 3 mM fosfoenolpiruvato (PEP). Já para o ensaio da MDH, foram empregados 1.6 mL de meio de reação contendo 50 mM de Tris-HCl (pH 8.0) e 5 mM MgCl₂, 2 mM de NADH e 20 mM de oxaloacetato. A reação foi iniciada pela adição de 400 µL do extrato diluído 2X para o ensaio da PEPC, enquanto que para o da MDH foi adicionado 400 µL do extrato diluído 40X. As atividades enzimáticas foram baseadas no consumo de NADH quantificado em espectrofotômetro (340 nm) em um intervalo de 0 a 10 minutos.

Determinação do acúmulo noturno de ácidos orgânicos

A variação noturna dos ácidos orgânicos (Δ ácido málico e Δ ácido cítrico) foi quantificada por HPLC como descrito por Amorós *et al.* (2003) e Hasegawa *et al.* (2010). Foi coletado 0,5 g de massa fresca foliar, em triplicata, uma hora após acender a luz da câmara de crescimento e uma hora antes do início do período escuro. As amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido e logo maceradas no momento da extração. O material foi transferido para microtubos de 2 mL, ao qual se adicionou uma solução aquosa de 0.25% (volume/volume) ácido fórmico, com o intuito de medir as perdas envolvidas durante o processamento das amostras. A mistura foi homogeneizada e centrifugada a 16.100 rcf e 4°C. O sobrenadante foi filtrado em membrana ultrafiltrante de malha 0.22 µm e injetado em HPLC, utilizando-se uma coluna de troca iônica Rezex™ ROA-Organic Acid H⁺ (8%), LC Column 30 x 4.6 mm, Ea. As concentrações de malato, de citrato e de formiato das amostras foram calculadas a partir das áreas dos picos correspondentes ao tempo de corrida de cada ácido-padrão

injetado. A diferença entre a concentração de ácido fórmico da solução inicial injetada e a concentração de ácido fórmico detectada foi calculada e a porcentagem da perda foi usada para correção dos valores de concentração dos ácidos orgânicos das amostras. O volume da injeção foi de 50 μL . A corrida das amostras foi feita a uma temperatura de 28°C. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol ânion g}^{-1}$ de massa seca.

IV. Resultados

IV. 1. Primeiro experimental

Caracterização dos estágios de desenvolvimento

As medidas biométricas que caracterizam cada fase ontogenética da *Guzmania monostachia* encontram-se na Tabela I. Comparando-se as plantas atmosféricas com as plantas Tanque-1 houve um aumento da altura da roseta de três vezes aproximadamente. Também houve um acréscimo de 50% no número de folhas. Plantas Tanque-1 possuíam um tanque em desenvolvimento com volume de 4.5 ± 1.4 mL e plantas Tanque-2 apresentavam mais que o dobro do volume do tanque das Tanque-1 (10.5 ± 3.7 mL).

Tabela I. Medidas de altura da roseta, diâmetro da roseta, número de folhas, comprimento da maior folha, massa fresca da planta e volume do tanque das plantas em diferentes estágios do desenvolvimento.

Fase ontogenética	Atmosférica	Tanque-1	Tanque-2
Altura da roseta (cm)	4.2 ± 0.5	12.5 ± 1.7	16.2 ± 1.5
Diâmetro da roseta (cm)	9.6 ± 0.8	15.0 ± 1.4	23.5 ± 2.3
Número de folhas	14 ± 2	21 ± 3	20 ± 3
Comprimento da maior folha (cm)	4.5 ± 0.5	7.8 ± 0.9	14 ± 1.4
Massa fresca (g)	1.2 ± 0.2	5.4 ± 1.7	10.80 ± 2.66
Volume do tanque (mL)	-	4.5 ± 1.4	10.5 ± 3.7

Teor de água dos tecidos foliares

Todas as plantas que foram irrigadas, independente de suas fases ontogenéticas, tiveram o teor de água variando entre 84.3–90.2%. As submetidas ao déficit hídrico sofreram uma significativa redução. A fase atmosférica diminuiu seu percentual d'água em aproximadamente 50%. Os grupos de folhas das plantas Tanque-1 submetidas à escassez hídrica (F1, F2 e F3) perderam 10.3%, 12.7% e 14.8%, apresentando teor de água de 77.4%, 77.1% e 72.3%, respectivamente. De maneira semelhante, para Tanque-2, as F1 apresentaram a menor desidratação (de 10%), enquanto os outros dois grupos foliares (F2 e F3) desidrataram sucessivamente mais, 14.8% e 18.2%. Os mesmos grupos de folhas (F1, F2 e F3) apresentaram conteúdo hídrico de 79.4%, 77.3% e 73.9%, respectivamente (Fig. 4).

Figura 4. Teor de água do conjunto total das folhas de plantas atmosféricas e dos grupos de folhas F1, F2 e F3 de plantas Tanque-1 e Tanque-2 sob déficit hídrico de 7 dias. Foram coletados limbos foliares inteiros. As plantas controle foram regadas diariamente. Asteriscos indicam diferença significativa entre o tratamento e o controle, segundo o teste t-Student em nível de 5% de significância.

Atividade das enzimas MDH e PEPC

As plantas na fase atmosférica não apresentaram diferenças significativas entre as atividades da MDH para as plantas controle e as do tratamento de limitação d'água. Já as plantas Tanque-1 em déficit hídrico, apresentaram decréscimos de atividade da MDH variando em aproximadamente 20-40%. Ao contrário, nas plantas mais desenvolvidas (Tanque-2) as atividades dessa enzima aumentaram nas folhas mais jovens (F1) e de idade intermediária (F2) mais de 2.5 vezes. F3 exibiu um incremento menos pronunciado, em torno de 40% (Fig. 5).

Figura 5. Atividade da MDH do conjunto total de folhas e dos grupos de folhas F1, F2 e F3 de plantas Tanque-1 e Tanque-2 sob déficit hídrico de 7 dias. Foram coletados limbos foliares inteiros. As plantas controle foram regadas diariamente. Asteriscos indicam diferença significativa entre o tratamento e o controle, segundo o teste t-Student em nível de 5% de significância.

O ensaio enzimático para PEPC revelou um incremento significativo da atividade dessa enzima em plantas atmosféricas sob suspensão de rega em comparação ao controle, evidenciando um aumento de 136%. Em plantas Tanque-1, as folhas F1 tiveram queda da atividade de PEPC de 19%; as F2 reduziram 45% e as F3, 25% (Fig. 6). As plantas Tanque-2 exibiram aumentos de aproximadamente 50% na atividade da PEPC nas folhas F1 e F2, enquanto que nas F3 a atividade dessa enzima caiu para aproximadamente a metade do valor mensurado para as plantas controle.

Figura 6. Atividade da PEPC do conjunto total das folhas de plantas atmosféricas e dos grupos de folhas F1, F2 e F3 de plantas Tanque-1 e Tanque-2 sob déficit hídrico de 7 dias. Foram coletados limbos foliares inteiros. As plantas controle foram regadas diariamente. Asteriscos indicam diferença significativa entre o tratamento e o controle, segundo o teste t-Student em nível de 5% de significância.

Acúmulo noturno dos ácidos orgânicos

O acúmulo noturno de ácido cítrico ocorreu em situação de limitação hídrica somente em plantas atmosféricas. Em plantas Tanque-1 e Tanque-2 os acúmulos, quando ocorreram, foram sempre muito baixos ou estatisticamente não significativos (Tabela II).

Tabela II. Acúmulo noturno de ácido cítrico do conjunto total das folhas de plantas atmosféricas e dos grupos de folhas F1, F2 e F3 de plantas Tanque-1 e Tanque-2 sob déficit hídrico de 7 dias. As plantas controle foram regadas diariamente. As colunas com a letra M indicam as concentrações de ácido cítrico uma hora depois do acendimento das luzes das câmaras de cultivo, as colunas com a letra T indicam as concentrações de ácido cítrico uma hora antes das luzes da câmara de cultivo se apagarem, as colunas M - T indicam a variação noturna do ácido cítrico. Asteriscos indicam variação noturna do ácido cítrico significativa segundo o teste t-Student em nível de 5% de significância.

Fase ontogenética	Grupos de folhas	Ácido cítrico							
		Controle				Déficit hídrico			
		M	T	M-T	p-valor	M	T	M-T	p-valor
Atmosférica	Todas as folhas	13.8 ± 7.3	16.3 ± 4.4	-2.5	0.315	7.8 ± 1.6	0.1 ± 0	7.7	0.0005*
	F1	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.1	-0.1	0.3643	1.3 ± 0.2	1.1 ± 0.4	0.2	0.251
Tanque-1	F2	3.2 ± 3.2	6.2 ± 1.1	-3	0.0049*	6.2 ± 1.9	4.0 ± 0.3	2.2	0.0586
	F3	20.9 ± 6.8	24.6 ± 4.7	-3.7	0.2417	8.5 ± 3.5	12.0 ± 1.8	-3.5	0.1034
Tanque-2	F1	1.1 ± 0.1	1.4 ± 0.1	-0.3	0.0066*	1.1 ± 0.1	1.5 ± 0.1	-0.4	0.0090*
	F2	1.2 ± 0.2	1.1 ± 0.2	0.1	0.1932	1.2 ± 0.2	1.1 ± 0.2	0.1	0.1901
	F3	1.5 ± 0.2	1.8 ± 0.1	-0.3	0.0468*	1.5 ± 0.2	1.9 ± 0.1	-0.4	0.092

Com relação ao acúmulo noturno de ácido málico, todas as plantas o apresentaram em limitação hídrica. Plantas atmosféricas sob déficit hídrico foram capazes de acumular o ácido málico durante a noite, enquanto as plantas controle exibiram variação negativa do ácido, indicando que ele foi acumulado durante o dia. As plantas Tanque-1 acumularam ácido málico em todos os grupos de folhas, sendo que, comparando-se à condição controle, os maiores acréscimos foram obtidos sob déficit hídrico nas folhas mais jovens (F1) e de idade intermediária (F2): 10 e 15 vezes maiores, respectivamente, se comparados à condição controle. A fase com o tanque mais desenvolvido (Tanque-2), quando sob suspensão de rega, também acumulou ácido málico em todos os grupos de folha, sendo o maior incremento nesse parâmetro encontrado nas pertencentes ao grupo F1 (Tabela III).

Tabela III. Acúmulo noturno de ácido málico do conjunto total das folhas de plantas atmosféricas e dos grupos de folhas F1, F2 e F3 de plantas Tanque-1 e Tanque-2 sob déficit hídrico de 7 dias. As plantas controle foram regadas diariamente. As colunas com a letra M indicam as concentrações de ácido málico uma hora depois do acendimento das luzes das câmaras de cultivo, as colunas com a letra T indicam as concentrações de ácido málico uma hora antes das luzes da câmara de cultivo se apagarem, as colunas M - T indicam a variação noturna do ácido málico. Asteriscos indicam variação noturna de ácido málico significativa segundo o teste t-Student em nível de 5% de significância.

Fase ontogenética	Grupos de folhas	Ácido málico							
		Controle	Déficit hídrico						
		M	T	M-T	p-valor	M	T	M-T	p-valor
Atmosférica	Todas as folhas	261.8 ± 37.2	281.7 ± 21.8	-19.9	0.2343	209.3 ± 23.9	166.1 ± 7.0	43.2	0.0199*
	F1	15.6 ± 1.1	12.6 ± 2.1	3	0.0463*	106.6 ± 3.3	74.7 ± 14.2	31.9	0.0095*
Tanque-1	F2	123.1 ± 2.8	119.8 ± 2.1	3.3	0.0896	143.0 ± 8.6	87.2 ± 6.2	55.8	0.0004*
	F3	162.6 ± 4.7	130.5 ± 7.5	32.1	0.0017*	136.4 ± 4.0	94.3 ± 10.7	42.1	0.0016*
	F1	106.0 ± 4.1	132.0 ± 20.8	-26	0.0505	171.5 ± 25.7	125.7 ± 9.7	45.8	0.0221*
Tanque-2	F2	163.9 ± 17.7	143.0 ± 7.6	20.9	0.0673	152.6 ± 14.6	110.8 ± 6.3	41.8	0.0053*
	F3	186.2 ± 45.0	190.8 ± 15.5	-4.6	0.4371	102.3 ± 13.1	84.3 ± 2.1	18	0.0393*

IV. 2. Segundo experimental

Após a caracterização do CAM em três fases ontogenéticas das plantas de *Guzmania monostachia* e em três estágios de desenvolvimento de suas folhas inteiras, essa etapa do trabalho caracterizou o CAM nas diferentes porções foliares dos grupos de folhas em diferentes estágios de desenvolvimento. Nesse experimento foi analisado o acúmulo noturno de ácido málico nos tecidos foliares, pois ele demonstrou ter sido o parâmetro mais adequado para indicar a indução do CAM. Foi também medida a porcentagem d'água nas amostras coletadas.

Teor de água dos tecidos foliares

Primeiramente, observou-se que independente do tratamento as porções basais apresentaram os maiores valores de teor de água enquanto as porções apicais exibiram as menores. Os grupos de folhas F1, F2 e F3 do controle exibiram em suas porções basais 90.5%, 89.5% e 89.0% de água em seus tecidos, respectivamente. Já suas porções apicais apresentaram, na mesma ordem, um conteúdo hídrico de 83.5%, 83.6% e 84.4% (Fig. 7).

Sob a limitação hídrica, ambas as porções foliares demonstraram um padrão de redução no conteúdo de água similar ao obtido no experimental realizado com folhas inteiras, isto é, tecidos de folhas jovens tiveram os menores decréscimos em seus teores de água e tecidos de folhas mais maduras apresentaram as maiores redução quanto ao mesmo parâmetro. As porções basais das folhas dos grupos F1, F2 e F3 perderam 8%, 10% e 12% de água, respectivamente e, na mesma ordem, apresentaram um conteúdo hídrico de 83.2%, 80.5% e 78.1% (Fig. 7). Já as porções apicais das folhas F1 perderam 7%, chegando a 76.8% de porcentagem d'água e F2 e

F3, reduziram em 12% seu conteúdo hídrico, apresentando teor de água de aproximadamente 74% (Fig.7).

Figura 7. Teor de água das porções basal e apical dos grupos de folhas F1, F2 e F3 de plantas Tanque-2 sob déficit hídrico de 7 dias. As plantas controle foram regadas diariamente. Asteriscos indicam diferença significativa entre o tratamento e o controle, segundo o teste t-Student em nível de 5% de significância.

Acúmulo noturno dos ácidos orgânicos

Não foram significativos os acúmulos noturnos de ácido málico na porção basal das folhas de plantas Tanque-2 sob déficit hídrico. Enquanto as porções apicais já demonstravam variações positivas desse ácido mesmo sob rega contínua (Tabela IV). As plantas submetidas ao déficit hídrico exibiram um aumento aproximado de 80% no acúmulo noturno de ácido málico nas folhas F1. Para as folhas do grupo F2, a variação do ácido málico não foi significativa. Da mesma forma, folhas F3 não acumularam ácido durante o período noturno (Tabela IV).

Tabela IV. Acúmulo noturno de ácido málico das porções basais e da porção apicais de F1, F2 e F3 sob um déficit hídrico de 7 dias. As plantas controle foram regadas diariamente. As colunas com a letra M indicam as concentrações de ácido málico uma hora depois do acendimento das luzes das câmaras de cultivo, as colunas com a letra T indicam as concentrações de ácido málico uma hora antes das luzes da câmara de cultivo se apagarem, as colunas M - T indicam a variação noturna do ácido málico. Asteriscos indicam variação noturna de ácido málico significativa segundo o teste t-Student em nível de 5% de significância.

Fase ontogenética	Grupos de folhas	Ácido málico							
		Controle				Déficit hídrico			
		M	T	M-T	p-valor	M	T	M-T	p-valor
Tanque-2 porção basal	F1	113.3 ± 16.5	144.5 ± 9.0	-31.2	0.0227*	72.7	135.2	-62.5	0.0221*
	F2	104.4 ± 9.3	100.1 ± 25.9	4.3	0.3989	101.4	183.4	-82	0.0310*
	F3	82.4 ± 13.4	69.1 ± 6.9	13.3	0.1002	82	100.3	-18.3	0.0380*
Tanque-2 porção apical	F1	219.2 ± 16.7	161 ± 8.2	58.2	0.0028*	270.9	107.3	163.6	0.0026*
	F2	206.2 ± 4.5	123.6 ± 40.5	82.6	0.0123*	153.5	159.5	-6	0.3998
	F3	207.2 ± 14.3	144.8 ± 2.9	62.4	0.0008*	104.2	205.3	-101.1	0.0001*

V. Discussão

A biometria observada nas plantas foi importante para encontrar parâmetros referentes à caracterização de cada fase ontogenética da espécie *G. monostachia*, fornecendo medidas como referência para a separação entre as fases atmosférica, Tanque-1 (com tanque em desenvolvimento) e Tanque-2 (com tanque mais desenvolvido). A ausência ou presença do tanque foi utilizada para caracterizar as estágio atmosférico. Para as fases com tanque, a capacidade de armazenar água (volume) foi a referência mais importante para separá-las. As plantas Tanque-2 apresentaram uma média de valores médios de volume do tanque aproximadamente duas vezes maior do que a exibida pelas plantas Tanque-1.

O tanque representa uma reserva de água que supriria as bromélias em períodos de seca esporádica. Zotz & Thomas (1999), em um trabalho detalhado sobre a função ecofisiológica do tanque nas espécies *Tillandsia fasciculata* e *G. monostachia*, desenvolveram um modelo matemático que demonstra que plantas maiores ficariam menos tempo com os tanques vazios. Portanto, plantas na fase Tanque-2 (com o tanque mais desenvolvido) estariam menos sujeitas aos déficits hídricos causados pela intermitência de água na natureza do que as plantas das fases atmosféricas e Tanque-1.

A ausência ou a presença da estrutura de reserva d'água em bromélias heteroblásticas durante a ontogenia e as alterações morfológicas e anatômicas que acompanham esse fenômeno foram estudadas em algumas espécies. Ainda, a

heteroblastia levou os botânicos a indagarem se as mudanças morfológicas que ocorriam durante a ontogenia seriam acompanhadas de alterações fisiológicas. Nesta parte do texto serão apresentados alguns destes trabalhos e discutidos dados referentes à morfologia e à anatomia, as alterações na fisiologia serão abordadas mais adiante quando forem analisados os resultados referentes ao teor de água e ao CAM.

Zotz *et al.* (2004) compararam a biometria, medidas anatômicas e fisiológicas de bromélias atmosféricas e com tanque pequenas da espécie heteroblástica *Vriesea sanguinolenta*, submetendo-as ao um tratamento de déficit hídrico, a fim de verificar se ocorreria uma mudança fisiológica simultânea às alterações morfológicas e anatômicas, características da transição entre plantas na fase atmosférica e plantas pequenas com tanque. Alguns dos parâmetros morfológicos observados que se alteraram de maneira conspícua foram: a forma da folha (razão comprimento foliar/largura foliar), que diminuiu, e a espessura relativa da folha (razão largura foliar/espessura foliar), que aumentou (Zotz *et al.*, 2004).

No presente estudo, não foram examinados caracteres anatômicos. Contudo, a literatura indica que bromélias heteroblásticas apresentam um padrões anatômicos característicos de cada fase ontogenética como observado por Reinert & Meirelles (1993). Os pesquisadores coletaram espécimes de *Vriesea geniculata* da natureza e examinaram a anatomia, a razão entre isótopos C^{13}/C^{12} e acidez titulável. Os autores verificaram principalmente que plantas atmosféricas juvenis possuíam características anatômicas, como alta densidade de tricomas, baixa densidade de estômatos e folhas suculentas comparável às espécies de bromélias que possuem a forma atmosférica quando adultas, descritas por Pittendrigh (1948). Já plantas com tanque adultas

possuíam alta densidade de tricomas apenas na porção basal da folha e alta densidade estomática na porção restante da folha.

Schmidt & Zotz (2001) realizaram a biometria de plantas atmosféricas e de tamanhos variados de plantas com tanque da bromélia epífita *Vriesea sanguinolenta*. Além disso, esses autores expuseram as plantas a um tratamento de restrição hídrica de 11 dias e acompanharam diversas respostas fisiológicas nesse período. Os resultados anatômicos de maior destaque, que ocorreram concomitantes à mudança de forma de plantas atmosféricas para plantas com tanque, foram a diminuição da densidade de tricomas e espessura da folha, além do aumento da densidade estomática. Zotz *et al.* (2004) confirmaram esses relatos em *Vriesea sanguinolenta*, mas observaram mais especificamente plantas atmosféricas e plantas com tanque pequenas, a fim de descrever melhor as mudanças características da heteroblastia, que ocorrem quando as plantas ainda são jovens.

As plantas de *G. monostachia* que foram submetidas ao déficit hídrico, nas fases atmosférica, Tanque-1 e Tanque-2, sofreram um decréscimo hídrico nos seus tecidos quando comparadas ao controle (Figs. 4 e 7). Porém, houve diferença no grau de desidratação dependendo da fase ontogenética. As plantas atmosféricas foram as que desidrataram mais, em torno de 50%, enquanto as plantas das fases Tanque-1 e Tanque-2 perderam aproximadamente 10% de água, o que pode ter sido consequência do pouco controle do fechamento estomático das plantas juvenis e maior controle estomático das plantas com tanque, como já relatado na literatura (Adams III & Martin, 1986; Schmidt & Zotz, 2001).

Adams III & Martin (1986) limitaram o fornecimento de água a bromélias epífitas da espécie *Tillandsia deppeana* por 9 dias e acompanharam as respostas fisiológicas dessa espécie com medidas da acidez titulável, razão entre isótopos $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e trocas gasosas, entre outros parâmetros. Esses pesquisadores perceberam que as plantas atmosféricas sob limitação hídrica exibiam pouca variação na condutância estomática, enquanto que as plantas com tanque apresentaram um decaimento desse parâmetro.

Schmidt & Zotz (2001) observaram um comportamento semelhante ao relatado por Adams III & Martin (1986), porém notaram que a queda na condutância estomática em plantas sob condições desfavoráveis de água se intensificava gradualmente durante o crescimento das plantas de *Vriesea sanguinolenta*, não estando relacionado, portanto, à heteroblastia e sim ao crescimento. Assim, plantas pequenas em déficit hídrico apresentaram menor queda na condutância estomática, resultando em decréscimos maiores nos conteúdos de água dos tecidos. Por causa desses resultados, os autores propuseram que as plantas pequenas estariam mais sujeitas à flutuação do conteúdo de água nos seus tecidos e precisariam ser mais tolerantes à seca, ao contrário, plantas maiores teriam maior controle estomático e se valeriam do tanque para adquirir água sendo, portanto, consideradas "evitadoras de seca".

Os teores d'água bastante reduzidos indicam que as plantas atmosféricas de *G. monostachia* podem ter perdido mais água por não serem capazes de reduzir a condutância estomática de maneira eficiente, sugerindo pouco controle do fechamento dos estômatos e possivelmente uma resposta de tolerância à seca nessa

fase ontogenética. Já plantas tanque perderam menos água, talvez pelo controle eficiente da transpiração estomática, evidenciando uma resposta de evitar a seca.

Também foi possível perceber que em plantas jovens adultas (Tanque-1) e adultas (Tanque-2) houve uma tendência de conservar a água nas folhas mais jovens (Figs. 4 e 7). Dessa forma fica evidente que a progressão do déficit hídrico na planta atinge primeiro as folhas maduras (F3) e depois atinge, em sequência, as folhas mais jovens (F2 e F3 respectivamente). Como revisado por Morgan (1984), o teor de água nos tecidos de plantas pode ser conservado através do ajuste osmótico por meio do qual a planta acumula altos teores de solutos em resposta ao estresse hídrico. Panin *et al.* (2012) ainda argumentaram que, como a água possui um papel imprescindível no crescimento das plantas, é possível que, manter os tecidos jovens mais túrgidos possa favorecer a manutenção do metabolismo desses órgãos mais jovens, permitindo que eles se recuperem rapidamente de um estresse hídrico, retomando o crescimento em momento de disponibilidade de água favorável. Portanto, em *G. monostachia*, o ajuste osmótico pode ter ocorrido nas folhas mais jovens como uma proteção contra o estresse hídrico, facilitando que os tecidos-alvo da osmorregulação possam reiniciar o processo de crescimento assim que o conteúdo hídrico da planta se torne favorável.

A limitação hídrica é reconhecida por ser capaz de induzir plantas C₃-CAM facultativas ao CAM esse fenômeno é geralmente acompanhado por incrementos na atividade da MDH e da PEPC, bem como da assimilação noturna de CO₂ e caracterizado, sobretudo, pelo acúmulo noturno dos ácidos málico e cítrico, além de aumentos noturnos na acidez titulável (ΔH^+) de tecidos fotossintetizantes (Winter *et al.*, 2008; Freschi *et al.*, 2010; Borland *et al.*, 2011; Mioto & Mercier, 2013, Pereira *et*

al., 2013). Neste trabalho foram ensaiadas as enzimas MDH e a PEPC e quantificados os acúmulos noturnos dos ácidos málico e cítrico. A MDH catalisa a interconversão do malato em oxaloacetato, que por sua vez, é fundamental em algumas das principais vias metabólicas da planta, como o Ciclo de Krebs, a fotorrespiração e síntese de aminoácidos (Goward & Nicholls, 1994). Atualmente, sabe-se que os dois tipos de isoformas existentes da MDH atuam no CAM: as MDHs NAD-dependentes (NAD-MDHs), encontradas no citosol e nas mitocôndrias e as MDHs NADP-dependentes (NADP-MDH), encontradas geralmente nos cloroplastos de plantas C₃, C₄ e CAM (Goward & Nicholls, 1994). O experimento realizado com *G. monostachia* foi específico para NADP-MDH, cuja atividade aumentou apenas nas plantas Tanque-2 submetidas à limitação hídrica (Fig. 5). Embora o mesmo incremento não tenha ocorrido nas plantas atmosféricas e nas plantas Tanque-1, a atividade enzimática observada é mais de 20 vezes maior do que a atividade da PEPC, o que seria suficiente para converter todo o oxaloacetato produzido por esta enzima.

A PEPC é uma enzima citosólica e também possui várias isoformas. Está envolvida em vários processos, além da fotossíntese: como interações carbono/nitrogênio, acúmulo de carbono em vacúolos de frutos, aclimação de raízes a estresses abióticos, germinação, desenvolvimento da semente e abertura estomática (O'Leary *et al.*, 2011). Aumentos significativos na atividade dessa enzima ocorreram em *G. monostachia* nas plantas atmosféricas e nos grupos de folhas em expansão (F1) e folhas expandidas (F2) em plantas Tanque-2 (Fig. 6). O mesmo não ocorreu nas plantas Tanque-1 e nas folhas F3 das plantas Tanque-2, mas todas as fases ontogenéticas apresentaram acúmulos noturnos de ácido málico, sugerindo que acréscimos de atividade da PEPC não seriam essenciais para a indução ao CAM.

Aumentos na atividade da PEPC e da MDH em plantas induzidas ao CAM são comuns (Borland *et al.*, 2011), inclusive já foram verificados em plantas intactas e em folhas excisadas de *G. monostachia* em nosso próprio laboratório (Freschi *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2013; Mioto & Mercier, 2013). Freschi *et al.* (2010) conduziram um experimento no qual submeteram plantas adultas de *G. monostachia* a 7 dias de restrição d'água e ao término desse tratamento voltaram a irrigar as plantas. Foram quantificados a atividade da PEPC, a variação noturna de acidez titulável e o teor relativo de água. Esses autores verificaram que o déficit hídrico causava um aumento significativo nas atividades da PEPC e da MDH, sobretudo nas porções apicais das folhas sob estresse hídrico.

Pereira *et al.* (2013) submeteram folhas excisadas de *G. monostachia* ao déficit hídrico submergindo uma pequena porção da base foliar em uma solução composta por 30% de PEG (polietilenoglicol), visando investigar a relação entre os metabolismos de carbono e nitrogênio nessa espécie. Foi observado que esse tratamento resultava em aumentos significativos nas atividades da PEPC e da MDH, acompanhados por aumentos nos acúmulos noturnos de ácido málico e de acidez titulável. Já Mioto & Mercier (2013) restringiram a água em folhas excisadas de *G. monostachia* com o objetivo de estudar a sinalização do CAM pelo ácido abscísico (ABA) e pelo óxido nítrico (NO) e verificaram incrementos na atividade da PEPC e da variação noturna de acidez titulável, mas não na atividade da MDH.

A maioria dos trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal com *G. monostachia* mostrou correlação entre o déficit hídrico, o aumento da atividade da PEPC e os acúmulos noturnos de acidez titulável e

ácido málico. No presente trabalho a única fase ontogenética que não apresentou aumentos das atividades dessa enzima, acompanhando acúmulos noturnos de ácido málico, foi a fase Tanque-1. Contudo, a quantificação desse ácido orgânico nos permitiu sugerir que existe a expressão do CAM em todas as plantas.

De maneira geral, o ácido cítrico só se acumulou no período noturno significativamente nas plantas atmosféricas; nas fases com tanque o mesmo praticamente não ocorreu, tornando difícil afirmar que o CAM em *G. monostachia* resulte em acúmulos noturnos de ácido cítrico. Todavia, todas as plantas submetidas ao déficit hídrico exibiram aumentos no acúmulo noturno de ácido málico, inclusive as juvenis atmosféricas (Tabela III). As variações positivas de ácido málico verificadas para as folhas da fase atmosférica e os grupos de folhas das fases Tanque-1 e Tanque-2 foram bastante próximas. Portanto, verificamos que todas as fases ontogenéticas da *G. monostachia* expressam o CAM aproximadamente a mesma intensidade. De modo diferente, Winter *et al.* (2008), que acompanharam as trocas gasosas durante a ontogenia de espécies dos gêneros *Kalanchöe*, *Clusia* e *Opuntia*, esses autores observaram que plantas CAM desses gêneros em fase juvenil expressaram preferencialmente a fotossíntese C₃, enquanto plantas mais desenvolvidas expressaram o CAM.

Assim, também parece improvável a existência de um mecanismo que indique um aumento da expressão do CAM à medida que a planta se desenvolva, como observado por Fißlthaler *et al.* (1994) em *Mesembryanthemum crystallinum*. Esses pesquisadores caracterizaram a sequência do RNAm da piruvato ortofosfato dicinase (PPDK), enzima que fosforila o piruvato originado pela descarboxilação do malato em

fosfoenolpiruvato (PEP) e observaram que os transcritos da PPDK aumentavam durante a transição do *Mesembryanthemum crystallinum* (espécie conhecida por ser induzida ao CAM quando se torna mais madura) da fase C₃ para a fase CAM. É possível que a PPDK em *G. monostachia* também tenha aumentado os seus transcritos durante a limitação de água.

Beltrán *et al.* (2013) mediram trocas gasosas, flutuações noturnas de acidez e a razão isotópica de carbono ¹³C/¹²C de plantas atmosféricas e com tanque de *Guzmania monostachia*, *G. ligulata* e de *Vriesea sanguinolenta*. Principalmente em *G. monostachia*, eles puderam constatar que plantas juvenis atmosféricas eram capazes de expressar o CAM. O presente estudo também verifica que plantas juvenis são capazes de expressar o CAM, mas apresenta dados relativos ao conteúdo hídrico das folhas, dados bioquímicos de atividade das enzimas PEPC e MDH, como o acúmulo noturno de ácidos orgânicos. Até então, todos os trabalhos anteriores que investigaram a fisiologia de bromélias heteroblásticas não detectaram a competência de bromélias na fase atmosférica para a expressão do CAM. Adams III & Martin (1986) quantificaram a acidez titulável em plantas juvenis de *Tillandsia deppeana* e não verificaram acúmulo noturno de ácido málico, relatando que bromélias com a forma atmosférica expressariam exclusivamente a fotossíntese C₃. Reinert & Meirelles (1993) e Zotz *et al.* (2004) também mediram a variação noturna de acidez nas espécies *Vriesea geniculata* e *V. sanguinolenta*, respectivamente, não obtendo resultados indicativos da expressão do CAM.

Plantas Tanque-1 (com tanque pouco desenvolvido) e Tanque-2 (com tanque mais desenvolvido), que sofreram restrição hídrica, apresentaram incrementos no

acúmulo noturno de ácido málico em todos os grupos de folhas estudados (Tabela III). Não evidenciando, portanto, o padrão ontogenético de expressão do CAM observado por Jones (1975) e Holthe *et al.* (1983). Jones (1975) verificou que folhas jovens da planta CAM-constitutiva *Kalanchöe fedtschenkoi* (Crassulaceae) exibiam aumentos discretos na variação noturna de acidez e no ganho de carbono noturno. Já folhas maduras tinham esses níveis aumentados. De maneira parecida, Holthe *et al.* (1983) relataram que folhas da epífita *Peperomia scandens* (Piperaceae) expressavam um tipo mais brando de CAM (CAM *cycling*) quando ainda estavam em processo de expansão e ao atingirem a maturidade se tornavam competentes para expressar um CAM mais intenso (CAM-constitutivo). Guralnick *et al.* (1984) testaram os efeitos do déficit hídrico e do fotoperíodo (dia longo ou dia curto) em plantas da espécie C₃-CAM facultativa *Portulacaria afra* (Portulacaceae), observando que a combinação de dias longos e a restrição d'água induziam apenas as folhas maduras ao CAM.

Uma possível explicação para o aumento da competência das folhas dessas plantas ao CAM à medida que se desenvolvem foi descoberta por Hartwell *et al.* (1999). Esses autores clonaram pela primeira vez genes da PEPC cinase, enzima que fosforila a PEPC ativando-a, de plantas de *Kalanchöe fedtschenkoi*. Eles verificaram que a atividade dessa proteína era regulada pela produção noturna e pela degradação diurna de seus transcritos e que a síntese desses transcritos era mais intensa nos pares de folhas mais maduros. Tal regulação nas folhas parece improvável acontecer em *G. monostachia* tendo como base os resultados apresentados no presente estudo, onde as folhas de *G. monostachia* em diferentes estágios de desenvolvimento apresentaram competência para a expressão do CAM. Em um trabalho realizado com orquídeas, um resultado similar foi obtido, Guo & Lee (2006) expuseram a espécie CAM-constitutiva

Phalaeonopsis amabilis a diversos termoperíodos em fotoperíodos de 12 horas e mediram o ganho de carbono da planta e a fixação noturna de CO₂ através do acúmulo noturno de ácido málico em seis folhas de idades diferentes. Eles relataram que a segunda folha da planta era a que apresentava a maior assimilação noturna de CO₂ e ao se tornarem mais maduras ou próximas à senescência esses parâmetros diminuía, no entanto, todas expressavam o CAM. Klavsen & Madsen (2008) observaram um comportamento semelhante na planta aquática CAM-constitutiva *Littorella uniflora*, que apresentou valores de atividade da PEPC e de acúmulo noturno de acidez mais alto em folhas mais jovens, sobretudo na segunda classe de idade. Como Guo & Lee (2006) eles sugeriram que todas as folhas independentemente da idade eram competentes para expressar o CAM.

É importante ressaltar que, quando Beltrán *et al.* (2013) verificaram a competência para a expressão do CAM em plantas atmosféricas de *G. monostachia*, eles alertaram que os tecidos dessas plantas não eram estritamente jovens por possuírem idade estimada de 6 a 12 meses. No entanto, o desenho experimental do presente trabalho, dividindo as folhas das plantas com tanque em três grupos em diferentes estágios de desenvolvimento, possibilitou que fossem utilizados tecidos foliares de idade aproximada de 1 a 3 meses no caso do grupo F1. Além disso, optou-se por não utilizar as folhas de tamanho reduzido, que se encontram no interior da roseta, pois fatores além da ontogenia, como a baixa luminosidade e a submersão na solução do tanque, frequentes em condições naturais, tornariam improvável a expressão do CAM.

Portanto, fica demonstrado neste trabalho que em *G. monostachia* as folhas do grupo mais jovem (F1), assim como plantas na fase juvenil, são competentes a expressar o CAM em seus tecidos e que o fator que parece influenciar mais a capacidade de expressão do CAM, neste caso, parece ser o teor de água nos tecidos e não a ontogenia.

Os estudos realizados por Freschi *et al.* (2010), Mito & Mercier (2013) e Pereira *et al.*, (2013) sugeriram que os aumentos da expressão do CAM por limitação hídrica em folhas de *G. monostachia* era acompanhada pela diminuição do conteúdo hídrico dos tecidos da base foliar, que estariam fornecendo água para a manutenção do teor de água das porções apicais, que, nessas condições, expressariam o CAM. Portanto, a manutenção dos teores de água nesta porção da folha parece ter um papel importante na expressão do CAM. Esperava-se que o mesmo ocorresse no presente trabalho para todos os grupos de folhas, já que quando submetidas ao déficit hídrico, folhas inteiras, independente do estágio de desenvolvimento, foram capazes de expressar o CAM. Contudo, verificou-se que as porções apicais das folhas não mantiveram seus teores de água (Fig. 7). O grupo de folhas F1 teve o menor decréscimo nesse parâmetro (7%) e foi o único que apresentou acúmulo noturno de ácido málico (Fig. 7 e Tabela IV). Os demais grupos atingiram valores de conteúdo hídrico menores do que 75%, perdendo 12% de seu conteúdo hídrico, e não apresentaram a resposta típica do CAM (Fig. 7 e Tabela IV).

Algumas considerações se fazem necessárias para o entendimento desse resultado, pois pela primeira vez em nosso laboratório, foram obtidos dados que indicam que a porção basal da folha talvez não tenha sido capaz de suprir a porção

apical da folha com suficiente quantidade de água. Isso resultaria em um déficit hídrico severo o bastante para causar uma inibição do metabolismo (e, consequentemente, do CAM) na porção apical. Presume-se que, no presente trabalho, as câmaras de cultivo não tenham conseguido reproduzir as mesmas condições nas quais foram realizados os trabalhos anteriores do laboratório e isso tenha provocado um estresse hídrico mais intenso nas plantas sob restrição de água.

Outro aspecto a ser observado neste estudo é que ele foi o primeiro do nosso grupo a utilizar plantas em fases ontogenéticas diferentes, por isso, as estratégias que as plantas atmosféricas e com tanque utilizam para manejar a limitação hídrica devem ser consideradas para a análise desses resultados. Plantas atmosféricas juvenis, como já mencionadas nessa discussão, possuiriam tecidos mais tolerantes à perda de água, resistindo a grandes flutuações hídricas em seus tecidos; plantas adultas dotadas de tanque (Tanque 1 e Tanque-2) evitariam a seca através de um rígido controle estomático e pelo armazenamento de água em seus reservatórios (Adams III & Martin, 1986; Schimdt & Zotz, 2001 e Zotz *et al.*, 2004). Assim, em teoria, essas plantas não suportariam flutuações tão grandes nos conteúdos de água tecidual. Por isso, plantas atmosféricas conseguiriam expressar o CAM mesmo com um baixo percentual de água em suas folhas, enquanto que uma perda d'água equivalente nas plantas adultas poderia causar uma baixa taxa metabólica e provavelmente a queda da atividade CAM.

A maior tolerância à seca em bromélias atmosféricas acompanhada da indução ao CAM e o decréscimo da expressão do CAM em bromélias com tanque sob uma limitação hídrica prolongada já foi observado na natureza. Reyes-García *et al.* (2008) relataram que as espécies de bromélias com tanque *Tillandsia makoiana* e *Tillandsia*

rothii tinham a fotossíntese CAM reduzida nos períodos secos do ano, enquanto as espécies atmosféricas (*Tillandsia schideana*, *Tillandsia ionatha* e *Tillandsia pseudobaileyi*) exibiam um incremento na expressão do CAM. O presente trabalho relata um fenômeno semelhante a esse, no qual plantas atmosféricas são capazes de expressar o CAM em déficits hídricos intensos e plantas tanque têm o CAM nas porções apicais das suas folhas inibido. No entanto isto ocorreu ao longo da ontogenia de uma única espécie, a *G. monostachia*, que apresenta durante o seu desenvolvimento tanto a forma atmosférica quanto a com tanque.

VI. Conclusões

O presente trabalho é o primeiro estudo sobre a indução ao CAM no decorrer da ontogenia da espécie de bromélia epífita C₃-CAM facultativa *Guzmania monostachia* realizado no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal do IB-USP. Por isso, esse esforço foi importante para nos dar a dimensão da dificuldade e dos cuidados necessários de se trabalhar com a temática proposta, além de nos fornecer subsídio teórico necessário para a investigação da fisiologia da espécie.

Considerando-se a ontogenia da planta, os resultados obtidos no decorrer desta investigação mostraram que a *G. monostachia* não apresentou diferenças marcantes quanto à expressão do CAM em suas diferentes fases ontogenéticas. Todas as fases estudadas (Atmosférica, Tanque-1 e Tanque-2) foram competentes para a expressão do CAM.

De modo semelhante, os grupos de folhas de *G. monostachia* investigados nesse estudo (F1, F2 e F3) não indicaram diferenças na competência para a expressão

do CAM em seus diferentes estágios de desenvolvimento, pois todas as folhas foram capazes de expressar o CAM.

O fator mais importante, no conjunto dos experimentais realizados, para induzir o CAM em plantas de *G. monostachia* parece ter sido teor de água dos tecidos foliares. Há indícios de que a água seja transportada das folhas mais maduras para as folhas mais jovens de *G. monostachia* e de que o transporte de água da porção basal para a apical das folhas seja de grande importância para a expressão do CAM.

Aparentemente, plantas jovens atmosféricas de *G. monostachia* possuem a capacidade de manter seu metabolismo mais ativo mesmo em condições que resultem em uma baixa quantidade de água dentro dos tecidos das folhas. Já nas plantas adultas com tanque, essa capacidade não parece ser tão acentuada.

VII. Resumo

A *Guzmania monostachia* é uma espécie de bromélia heteroblástica, ou seja, na fase juvenil, ela apresenta a forma atmosférica e na fase adulta, ela adquire uma estrutura chamada de tanque, que pode armazenar água e nutrientes em momentos de seca esporádica. Ela também é reconhecida por ser C₃-CAM facultativa, podendo ser induzida ao CAM através de estímulos ambientais como o a escassez d'água. Estudos com outras espécies competentes para a expressão do CAM, há relatos de que tecidos jovens expressariam preferencialmente a fotossíntese C₃ e passariam a expressar o CAM à medida que se tornassem maduros. No Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal a indução do CAM em plantas adultas da espécie *G. monostachia* por déficit hídrico foi estudada e pôde-se constatar que essa bromélia possui folhas com regiões funcionais distintas: a porção basal seria responsável pela absorção de água e nutrientes e a porção apical encarregada de realizar, principalmente, a fotossíntese. Contudo, ainda não se possuía informação sobre como a ontogenia e as mudanças morfológicas estariam influenciando a competência para a expressão do CAM em folhas inteiras e nas diferentes porções foliares de *G. monostachia*. A fim de se caracterizar o CAM nesta espécie ao longo da ontogenia, foram selecionadas plantas em 3 fases ontogenéticas (Atmosférica, Tanque-1 e Tanque-2) e das fases Tanque-1 e 2 foram separados grupos de folhas representando 3 estágios de desenvolvimento (F1 – as 7 mais internas da roseta, F2- as 7 folhas seguintes da roseta e F3 – as 7 folhas localizadas mais na base da roseta). As plantas foram submetidas a 7 dias de déficit hídrico por meio da suspensão de rega. Outra coleta de material vegetal foi realizada com plantas Tanque-2 separando-se as folhas em grupos representando os mesmos 3 estágios de desenvolvimento utilizados no experimental anterior e dividindo-as em porções basal e apical. Medidas morfométricas foram feitas para caracterizar cada fase ontogenética. O teor de água dos tecidos das folhas foi determinado e o CAM foi detectado através do ensaio enzimático da PEPC, da MDH e da quantificação dos ácidos orgânicos (ácido cítrico e málico). As plantas Tanque-2 apresentaram mais que o dobro da capacidade de estocagem de água comparativamente às plantas Tanque-1. As plantas atmosféricas sofreram as maiores perdas de água em sua folhas (aproximadamente 50%); já as

plantas com tanque tiveram decréscimos mais discretos no teor hídrico (em torno de 15%). Plantas de todas as fases ontogenéticas acumularam significativamente ácido málico durante a noite, evidenciando que, independente da ontogenia, as plantas foram competentes para expressar o CAM. De maneira semelhante, tanto as folhas mais jovens quanto as mais maduras exibiram acúmulos significativos de ácido málico, indicando que elas foram capazes de expressar o CAM nos 3 estágios de desenvolvimento escolhidos para este estudo. Portanto, no conjunto dos experimentais realizados, sugere-se que o fator mais importante para a expressão do CAM em plantas de *G. monostachia* seja o teor de água dos tecidos foliares e não a ontogenia. Plantas atmosféricas apresentaram a maior perda de água (aproximadamente 50%) concomitantemente à expressão do CAM. Já as regiões apicais dos grupos de folhas F1 das plantas Tanque-2 exibiram um decréscimo de 7% com acúmulo noturno de ácido málico e os grupos F2 e F3 perderam 12% da água de seus tecidos, resultando na inibição do CAM. Há indícios que o transporte de água nas plantas com tanque sob estresse hídrico ocorra das folhas mais maduras para as folhas mais jovens. Aparentemente, plantas jovens atmosféricas de *G. monostachia* possuem a capacidade de manter seu metabolismo mais ativo mesmo em condições que resultem em uma baixa quantidade de água nos tecidos foliares, indicando um certo grau de tolerância à seca. Ao contrário, nas plantas com tanque, essa capacidade parece não ser tão acentuada, sugerindo que esta fase esteja mais relacionada com estratégias de evitação à seca.

VII. Abstract

Guzmania monostachia is a species of heteroblastic bromeliad, in other words, whereas in the juvenile phase, it assumes the atmospheric form, in the adult, it acquires a structure called a tank, by which water and nutrients can be stored in moments of sporadic drought. It is also recognized through being C₃-CAM facultative, thus inducible to CAM through environmental stimuli, such as the lack of water. In the young plants of other species capable of CAM expression, there are reports of preferential C₃ photosynthesis expression in young tissues, leading to CAM expression on reaching maturity. In the Laboratory of Plant Development Physiology, studies were made of CAM induction in adult plants of the species *G. monostachia* during the lack of water at times of drought. It was noted that this bromeliad possessed leaves with distinct functional regions: whereas the basal portion was responsible for the absorption of both water and nutrients, the apical was mainly responsible for photosynthesis. Nonetheless, there was no available information on how ontogeny and morphological changes could influence competence for CAM expression throughout the whole leaf, as well as in the different parts. In order to characterize CAM in this species throughout ontogeny, selection was concentrated on plants in the three ontogenetic phases (Atmospheric, Tank-1 and Tank-2), as well as in the Tank-1 and Tank-2 phases by separating groups of leaves representing the three stages of development in the rosette, viz., Stage1 – the seven inner-most leaves, Stage2 – the next seven, and Stage3 – the seven located more at the base. By suspending irrigation, all the plants were submitted to 7 days without water, whereupon further material was collected from Tank-2 plants. The leaves thus obtained were first divided into groups representing the same three developmental phases as used in the preceding experiment, and then separated into basal and apical portions. Morphometric measurement was applied to the characterization of each ontogenetic phase. Tissue water content in the leaves was defined, and CAM detected through PEPC enzymatic assaying, MDH, and organic acid (citric and malic) quantification. Tank-2 plants presented more than double the capacity to store water, when compared to Tank-1 plants. Whereas atmospheric plants underwent the greatest leaf-water loss (around 50%), the loss was less in those with tanks (around 15%). Significant nocturnal malic

acid accumulation in plants in all the ontogenetic phases, placed in evidence plant competency for CAM expression, independent of the stage of development. Likewise, significant malic acid accumulation in both young leaves and more mature ones indicated their capacity for CAM expression in the three stages of development chosen for the present study. Thus, in the experiments carried out, it can be presumed that the most important factor for CAM expression in *G. monostachia* plants is leaf-tissue water content, and not ontogeny. Atmospheric plants presented the highest water loss (around 50%), which was concomitant with CAM expression. On the other hand, in the apical regions of Tank-2 plants, there was a drop of 7% in water content with nocturnal malic acid accumulation in stage-1 leaves, and a loss of 12% in tissue water in those in stage 2 and 3, with the consequential CAM inhibition. There is every indication that water-transport in tank plants undergoing water-stress occurs from more mature leaves to those younger. Apparently the more active metabolism in young *G. monostachia* atmospheric plants, even under conditions inducing low leaf-tissue water content, indicates a certain degree of drought tolerance. On the contrary, although this capacity in tank plants appears to be less accentuated, the tank phase is apparently more related to strategies for avoiding the effects of drought.

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, p. 298-304, 1986.

BELTRÁN, J. LASSO, E. MADRIÑÁN, S. VIRGO, A. WINTER, K. Juvenile tank-bromeliads lacking tanks: do they engage in CAM photosynthesis? *Photosynthetica*, v. 51, n. 1, p. 55-62, 2013.

BENZING, D. H. RENFROW, A. The mineral nutrition of the Bromeliaceae. *Botanical Gazette*, v. 135, n. 4, p. 281-288, 1974.

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.

BORLAND, A. M. ZAMBRANO, A. B. CEUSTERS, J. SHORRACK, K. The photosynthetic plasticity of crassulacean acid metabolism: an evolutionary innovation for sustainable productivity in changing world. *New Phytologist*, p. 1-14, 2011.

CRAYN, D. M., WINTER, K., SMITH, J. A. C. Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the Neotropical family Bromeliaceae. *Pnas*, v. 110, n. 10, p. 3703-3708, 2004.

CUSHMAN, J. C. BORLAND, A. M. Induction of crassulacean metabolism by water limitation. *Plant cell and environment*, n. 25, p. 295-310, 2002.

DODD, A. BORLAND, A. M. HASLAM, R. P. GRIFFITS, H. MAXWELL, K. Crassulacean acid metabolism: plastic, fantastic. *Journal of experimental botany*, v. 53, n. 369, p. 569-580, 2002.

FIßTHALER, B. MEYER, G. BOHNERT, H. J. SCHIMITT, J. M. Age-dependent induction of pyruvate orthophosphate dikinase in *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Planta*, v. 196, p. 492-500, 1995.

FRESCHI, L. TAKAHASHI, C. A. CAMBUI, C. A. SEMPREGOM, T. R. CRUZ, A. B. MIOTO, T. P. 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*, v. 167, p. 526-533, 2010.

GUO, W. LEE, N. Effect of leaf and plant age and day/night temperature and net CO₂ uptake in *Phalaenopsis amabilis* var. *Formosa*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v. 131, n. 3, p. 320-326, 2006.

GURALNICK, L. J. RORABAUGH, A. HANSCOM III, Z. Influence of photoperiod and leaf age on crassulacean acid metabolism in *Portulacaria afra* (L.) Jacq.¹ *Plant Physiology*, v. 75, p. 454-457, 1984.

HARTWELL, J. GILL, A. NIMMO, G. A. WILKINS M. B. JENKINS, G. I. NIMMO, H. G. Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase is a 9l protein kinase regulated at the level of expression. *The plant journal*, v. 20, n. 3, p. 333-342, 1999.

HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, O., VILLARREAL, O.B. Crassulacean acid metabolism photosynthesis columnar cactus seedlings during ontogeny: the effect of light on

nocturnal acidity accumulation and chlorophyll fluorescence. *American Journal of Botany*, v. 94(8), p. 1344–1351, 2007.

HOLTHE, P. A. STERNBERG, S. L. TING, I. P. Developmental control of CAM in *Peperomia scandens*. *Plant Physiology*, v. 84, p. 743-747, 1987.

GOWARD, C. R. NICHOLLS, D. Malate dehydrogenase: A model for structure, evolution and catalysis. *Protein science*, v. 3, p. 1883-1888, 1994.

GRAHAM. E. A. ANDRADE, J. L. Drought tolerance associated with vertical stratification of two co-occurring epiphytic bromeliads in tropical dry forest. *American Journal of Botany*. v. 91, n. 5, p. 699-706, 2004.

GIVINISH, T. J. BARFUSS, M. H. J. VAN EE, B. RIINA, R. SCHULTE, K., HORRES, R. PHILIP, A. 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, BERRY, P. E. SYTSMA, K. J. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *American Journal of Botany*, v. 98, n. 5, p. 1-24, 2011.

GUO, W. LEE, N. Effect of leaf and plant age, and day/night temperature on net CO₂ uptake in *Phalaenopsis amabilis* var. *Formosa*. *Journal of American society of horticulture science*, v. 131, n. 3, p. 320-326, 2006.

GURALNICK, L. J. RORABAUGH, A. HANSCOM III, Z. Influence of photoperiod and leaf age on crassulacean acid metabolism in *Portulacaria afra* (L.) Jacq. *Plant physiology*, n. 75, 454-457.

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*, v. 103, p. 645–653, 2009.

HOLTHE, P. A. STERNBERG, L. S. L. TING, I. P. Developmental control of CAM in *Peperomia scandens*. *Plant physiology*, n. 84, p. 242-247, 1987.

JONES, M. B. The effect of leaf age on leaf resistance and CO₂ exchange of the CAM plant *Bryophyllum fedtschenkoi*. *Planta*, v. 123, p. 91-96. 1975.

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

KLAUSEN, S. K. MADSEN, T. V. Effect of leaf age on CAM activity in *Littorella uniflora*. *Aquatic botany*, v. 89, p. 50-56, 2008.

LÜTTGE, U. Ecophysiology of crassulacean acid metabolism (CAM). *Annals of Botany*, v. 93, p. 629-652, 2004.

LÜTTGE, U. Ability of crassulacean acid metabolism plants to overcome interacting stresses in tropical environments. *Aobplants*, v. 2010, p. 1-15, 2011.

MARTIN, C. E. Physiological ecology of the Bromeliaceae. *The Botanical Review*, v. 1, n. 60, p. 1-82, 1994.

MARTINELLI, G. VIEIRA, C. M. GONZALEZ, M. LEITMAN, P. PIRATININGA, A. DA COSTA, A. F. FORZZA, R. C. Bromeliaceae da Mata Atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. *Rodriguésia*, v. 59, n. 1, p. 209-258, 2008.

MAXWELL, C. GRIFFITHS, H. BORLAND, A. M. BROADMEADOW, M. S. J. MCDAVID, C. R. Photosynthetic responses of the epiphytic bromeliad *Guzmania monostachia* during the dry season in Trinidad maintain photochemical integrity under adverse conditions. *Plant cell and environment*, v. 15, p. 37-47, 1992.

MAXWELL, C. GRIFFITHS, H. YOUNG, A. J. Photosynthetic acclimation to light regime and water stress by the C₃-CAM epiphyte *Guzmania monostachia*: gas-exchange characteristics, photochemical efficiency and the xanthophyll cycle. *Functional ecology*, v. 8, p. 746-754, 1994.

MAXWELL, C. GRIFFITHS, H. BORLAND, A. M. YOUNG, A. J. BROADMEADOW, M. S. J. FORDHAM, M. C. Short term Photosynthetic responses of the C₃-CAM epiphyte *Guzmania monostachia* var. *monostachia* to tropical seasonal transitions under field conditions. *Australian journal of plant physiology*, v. 22, p. 771-781, 1995.

MAXWELL, C. MARRISON, L. LEECH, R. M. GRIFFITHS, H. HORTON, P. Chloroplast acclimation in leaves of *Guzmania monostachia* in response to high light. *American Society of Plant Physiologists*, v. 121, p. 89-95, 1999.

MAXWELL, C. Resistance is useful: diurnal patterns of photosynthesis in C₃ and crassulacean acid metabolism epiphytic bromeliads. *Functional plant biology*, v. 29, p. 679-687, 2002.

MIOTO, P. MERCIER, H. Abscissic 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*, v. 170, p. 996-1002, 2013.

MORGAN, J. M. Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, v. 35, p. 299-319, 1984.

NIMMO, H. G. Control of phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase higher plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 414, p. 189-196, 2003.

O'LEARY, B. PARK, J. PLAXTON, W. C. The remarkable diversity of plant PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase): recent insights into the physiological functions and post-translational controls of non-photosynthetic PEPCs. *Biochemistry journal*, v. 436, p. 15–34. 2011.

OSMOND, C. B. Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context. *Annual Review of Plant Physiology*, v. 29, p. 379-414, 1978.

PANIN, F. SIMONNEAU, T. MULLER, B. Coming of leaf age: control of growth by hydraulics and metabolics during leaf ontogeny. *New Phytologist*, v. 196, p. 349-366, 2012.

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*, p. 1067-1074, 2013.

PITTENDRIGH, C. S. The Bromeliad-Anopheles-Complex in Trinidad. I – The Bromeliad Flora. *Society for the Study of Evolution*, v. 2, n. 1, p. 58-89, 1948.

REINERT, F. MEIRELLES, S. T. Water acquisition strategy shifts in the heterophyllous saxicolous bromeliad, *Vriesea geniculata* (Wara) Wara. *Selbyana*, v. 14, p. 80-88, 1993.

REYES-GARCÍA, C. GRIFFTHS, H. RINCÓN, E. HUANTE, P. Niche differentiation in tank and atmospheric epiphytic bromeliad of a seasonally dry forest. *Biotropica*. v. 40, n. 2, p. 168-175, 2008a.

REYES-GARCÍA, C. MEJIA-CHANG, M. JONES, G. D. GRIFFTHS, H. Water vapour isotopic exchange by epiphytic bromeliads in tropical dry forest reflects niche differentiation and climatic signals. *Plant Cell and Environment*, v. 31, p. 828-841, 2008b.

REYES-GARCÍA, C. MEJIA-CHANG, M. GRIFFTHS. High but not dry: diverse epiphytic bromeliad adaptations to exposure within a seasonally dry tropical forest community. *Plant cell and environment*, v. 193, p. 745-754, 2011.

SAGE, R. NELSON, K. Functional constraints of CAM leaf anatomy: tight cell packing is associated with increased CAM function across a gradient of CAM expression. *Journal of Experimental Botany*, v. 59, n. 7, p. 1841-1850, 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*, v. 37, p. 995-1010. 2010.

SCHIMIDT, Z. ZOTZ, G. Ecophysiological consequences of differences in plant size: in situ carbon gain and water relations of the epiphytic bromeliad, *Vriesea sanguinolenta*. *Plant cell and environment*, v.24, p 101-111, 2001.

WEST-EBERHARD, M. SMITH, J. A. WINTER, K. Photosynthesis, reorganized. *Science*. v. 332, p. 311-312, 2011.

WINTER, K. GARCIA, M. HOLTUM, J. A. M. On the nature of facultative and constitutive CAM: environmental and developmental control of CAM expression during early

growth of *Clusia*, *Kalanchoë*, and *Opuntia*. *Journal of Experimental Botany*, p. 1-12, 2008.

WINTER, K. GARCIA, M. HOLTUM, J. A. M. Drought-stress-induced up-regulation of CAM in seedlings of a tropical cactus, *Opuntia elatior*, operating predominantly in the C3 mode. *Journal of experimental botany*, v. 62, n. 11, p. 4037–4042, 2011.

WOOD, A. J. Ecophysiological adaptations to water limited environments. In: JENKS, M. A. HASEGAWA, P. M. *Plant Abiotic Stress*. India: Blackwell Publishing, 2005. p. 1-13.

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*. v. 19(2), p. 119-126. 2007.

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.

ZOTZ, G. ENSLIN, A. HARTUNG, W. & ZIEGLER, H. Physiological and anatomical changes during the early ontogeny of heteroblastic bromeliad, *Vriesea sanguinolenta*, do not occur with the morphological change from atmospheric to tank form. *Plant, cell and environment*, v. 27, p. 1341-1350, 2004.

ZOTZ, G. THOMAS, V. How much water is in the tank? Model calculations for two epiphytic bromeliads. *Annals of Botany*, v. 83, p. 183-192, 1999.

ZOTZ, G. ANDRADE, J. Water relations of two co-occurring epiphytic bromeliads. *Journal of Plant Physiology*, v. 152, p. 545-554, 1998.

ZOTZ, G. BECKER, A. Heteroblasty – a review. *Botanical review*, n. 77, p. 109-151, 2011.