Marcos Marchesi da Silva

Mudanças no perfil metabólico de *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae) resultantes do estresse hídrico e cultivo em nitrato como fonte única de nitrogênio

Changes in the metabolic profile of *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae) resulting from drought stress and cultivation in nitrate as the sole nitrogen source

> São Paulo 2021

Marcos Marchesi da Silva

Mudanças no perfil metabólico de *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae) resultantes do estresse hídrico e cultivo em nitrato como fonte única de nitrogênio

Changes in the metabolic profile of *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae) resulting from drought stress and cultivation in nitrate as the only nitrogen source

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

Orientadora: Profa. Dra. Helenice Mercier Coorientadora: Dra. Ana Zangirolame Gonçalves

São Paulo 2021 Marchesi da Silva, Marcos

Mudanças no perfil metabólico de Guzmania monostachia (Bromeliaceae) resultantes do estresse hídrico e cultivo em nitrato como fonte única de nitrogênio / Marcos Marchesi da Silva ; orientadora Helenice Mercier ; coorientadora Ana Zangirolame Gonçalves -- São Paulo, 2021.

83 p.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Botânica.

1. bromélia epífita. 2. estresse hídrico. 3. fotossíntese CAM. I. Mercier, Helenice, orient. II. Zangirolame Gonçalves, Ana, coorient. III. Título.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Helenice Mercier

Orientadora

Dedicatória

Dedico à minha amada mãe que me ensinou com amor que a educação constrói pontes para transformação do ser!

# Epígrafe

## AO MESTRE, A FLOR

Adubar a terra com números e letras asas e poemas. Para colher lírios, cravos e alfazemas. Agricultor, o bom mestre sabe, que espinhos e pétalas fazem parte da primavera. Porque ensinar é regar a semente

sem afogar a flor.

Sérgio Vaz Livro "Colecionador de pedras" Meus sinceros agradecimentos!

À minha amada mãe Margarete M. e ao meu amado pai Francisco B. pelo amor, atenção, carinho, força, incentivo e por sempre me apoiarem nos meus sonhos.

Às minhas amadas irmãs Ahfia D. e Dra. Aline M. pela parceria, amor, apoio e por sempre me darem todo o suporte para o meu crescimento.

À minha amada companheira Maíra A. por todo apoio, amor e por ser meu porto seguro.

À querida Profa. Dra. Helenice Mercier pela oportunidade, confiança, aprendizado, paciência e apoio.

À querida amiga e coorientadora Dra. Ana Z. por me mostrar o caminho das pedras e também por me inspirar a ser sempre, uma pessoa e pesquisador melhor a cada dia.

Aos Professores Dr. Gilberto Barbante, Dr. Luciano Freschi e Dra. Magdalena Rossi pelo apoio, confiança, amizade e também por sempre compartilharem seus conhecimentos.

Às técnicas Aline e Ana Maria pelos aprendizados, risos, amizade, apoio e disponibilidade em me ajudar.

Aos queridos amigos da Pós Ana Z., Scarlet M., Aline P., Patricia R., Renata D., Aline L., Renata F., Valéria F., Antônio C., Paulo M., Filipe P., Rafael Z., Renata F., Patrícia L., Letícia L. e Larissa S. por todos momentos bons compartilhados.

A todos meus professores que compartilharam seus conhecimentos e sabedorias durante todos esses anos, me guiando até aqui.

Ao laboratório de Ecofisiologia do Núcleo de Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica por disponibilizar a utilização de seus equipamentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa concedida.

Sem cada um de vocês, nada disso seria possível!

# Índice

Introdução1
Justificativa e relevância do tema12
Materiais e Métodos15
Aclimatação em câmara de crescimento15
Delineamento experimental16
Coleta do material vegetal17
Análises Bioquímicas18
Análise da concentração endógena de nutrientes18
Análise de potencial osmótico18
Determinação de prolina19
Condutividade relativa19
Análise de conteúdo relativo de água20
Análise de acidez titulável20
Ensaio da atividade da enzima PEPC21
Quantificação de malato22
Análises estatísticas22
Resultados24
Conteúdo relativo de água24
Condutividade específica25
Potencial osmótico
Concentração endógena de nutrientes27
Quantificação de prolina29
Acúmulo noturno de malato, acidez titulável e atividade da enzima PEPc30
Expressão gênica: PEPC133
Discussão
Conclusões46
Resumo47
Abstract
Referências Bibliográficas51

## Introdução

Ao longo da vida e do desenvolvimento das plantas, elas podem ser expostas a vários estresses ambientais em condições naturais e agrícolas. Entre os tipos de estresses abióticos, o hídrico é um dos mais severos e que afetam a produtividade das plantas. Isso acontece, pois a água é a principal constituinte da planta, constituindo cerca de 80-95% da biomassa total das mesmas e desempenhando um papel vital em vários processos fisiológicos, como crescimento, desenvolvimento e metabolismo (Abbasi & Abbasi, 2010; Brodersen et al. 2019).

Com as mudanças climáticas que vem ocorrendo por atividades antrópicas não ecológicas, como o desmatamento e o aumento da liberação de  $CO_2$  para atmosfera, está havendo um rápido incremento das temperaturas médias globais da superfície, trazendo efeitos danosos aos padrões de precipitação, os quais apresentam períodos de estresse hídrico mais recorrentes e, portanto, ocasionando uma menor disponibilidade de água para as plantas (Gray & Brady, 2016; Bulgari et al. 2019; Fatima et al. 2020).

As plantas são organismos sésseis que precisam lidar com vários e complexos tipos de interações envolvendo fatores ambientais. No curso da evolução, elas desenvolveram mecanismos específicos que lhes permitem adaptar-se e sobreviver a eventos estressantes. A exposição de plantas aos estresses biótico e abiótico induz uma interrupção no crescimento vegetal, implicando em custos fisiológicos (Swarbrick et al. 2006; Bolton, 2009; Massad & Dyer, 2012).

Para sobreviver aos estresses é importante que assim que a planta perceba as variações ambientais, comece a responder de maneira rápida e eficiente. Após o reconhecimento do estresse, os mecanismos de defesa basal constitutivos das plantas levam à ativação de cascatas de sinalização complexas de defesa que variam de um estresse para outro (Chinnusamy et al. 2004; Andreasson & Ellis, 2009; Abou et al. 2009). Com isso, uma série de respostas acontecem, como ativação de canais iônicos específicos e cascatas de cinase (Fraire et al. 2011), produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Laloi et al. 2004), acumulação e realocação de nutrientes (Upadhyaya et al. 2011; Pottosin et al. 2014) causando uma reprogramação do maquinário genético que resulta em reações de defesa adequadas que

podem aumentar a tolerância das plantas, a fim de minimizar os danos biológicos causados pelo estresse (Fujita et al. 2006).

Os estresses abióticos mais citados são os provocados por deficiência hídrica e nutricional, podendo ser deflagrados por condições ambientais que provocam a redução do crescimento e a biomassa abaixo dos níveis ideais para a espécie (Cramer, 2010). As respostas das plantas aos estresses dependem do tecido ou órgão afetados, pois as respostas transcricionais ao estresse podem ser específicas do tecido ou da célula e podem ser bastante diferentes dependendo do estresse envolvido (Dinneny et al. 2008). Além disso, o nível e a duração do estresse podem ter um efeito significativo na complexidade dos eventos desencadeados (Tattersall et al. 2007; Pinheiro & Chaves, 2011).

As respostas das plantas aos estresses abióticos podem envolver interações e sinais com muitas vias moleculares (Takahashi et al 2004). É recorrente que em muitos estresses abióticos resultem em maior produção das espécies reativas de oxigênio (ROS da sigla em inglês), que podem modificar a atividade enzimática e regulação de genes (Mittler et al. 2011). As espécies reativas de oxigênio podem desempenhar distintos papéis na célula vegetal, atuando como sinalizadores em concentrações equilibradas, mas em altas concentrações, atuam como agente oxidante (Foyer, 2020). As ROS podem ser geradas de diversas formas nas células vegetais, como durante o processo respiratório nas mitocôndrias ou durante a fotossíntese nos cloroplastos (Sies et al. 2017).

Algumas das ROS geradas pelas células vegetais são  $H_2O_2$  (peróxido de hidrogênio),  $HO_2^-$  (hidroperoxila), OH\* (hidroxila), ROOH (hidroperóxidos) e radicais superóxido ( $O_2^-$ ) (Foyer, 2018). As ROS podem ser consideradas formas altamente reativas de oxigênio que têm pelo menos um elétron desemparelhado em seu arranjo, podendo interagir com vários constituintes celulares, como lipídios, proteínas, DNA, RNA e oxidá-los. Para que haja uma regulação e equilíbrio das espécies reativas de oxigênio dentro das plantas, há mecanismos eficientes para diminuição dos mesmos que envolvem enzimas antioxidantes (Pandy et al. 2016 ; Silva et al. 2020), como superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APx), glutationa peroxidase (GPx), glutationa S-transferase (GST), catalase (CAT) e metabólitos não enzimáticos, como ácido ascórbico (ASH), glutationa (GSH), alfatocoferol, carotenóides, flavonóides e também o aminoácido prolina (Mittler et al. 2011; Chen & Dickman, 2004; Gill & Tuteja, 2010).

Outro mecanismo importante de tolerância ao estresse hídrico ou osmótico é a síntese e o acúmulo de osmoprotetores, que podem ser definidos como moléculas pequenas, não tóxicas em concentração molar, que podem proteger as membranas e proteínas do efeito desnaturante induzido por estresses abióticos, como o hídrico (Munns, 2002). Os osmoprotetores podem ajudar a superar os estresses osmótico ou hídrico, pelo evento denominado ajuste osmótico que pode reduzir o potencial de soluto, aumentando as concentrações dos osmólitos e, assim, melhorando a retenção e a captação de água (Fang & Xiong, 2015; Blum, 2017). Um dos osmólitos que podem ser sintetizados e acumulados sob déficit hídrico em plantas é o aminoácido prolina, sendo um dos aminoácidos mais importantes para as plantas (Bouchareb, 2008).

Acredita-se que acumulação de prolina pode desempenhar função importante na adaptação das plantas ao ambiente seco. Segundo Rhodes et al. (1999) e Ashraf & Harris (2004), este aminoácido pode ser considerado um composto compatível, ou seja, não danifica as estruturas celulares em altas concentrações, e diminui o potencial osmótico celular. Além disso, pode ser uma das formas de armazenar carbono e nitrogênio nas plantas (Hare & Cress 1997).

Foi demonstrado que células e tecidos vegetais com elevada concentração de prolina, sob estresses osmótico e hídrico, têm degradações significativamente diminuídas das membranas plasmáticas e menor desnaturação das proteínas da membrana (Taey et al. 2010). Foi proposto por Smirnoff & Cumbes (1989) que a prolina pode ser um eliminador de ROS, funcionando como agente tamponante citosólico de pH e também como um estabilizador do estado redox celular. Logo, a acumulação de prolina pode influenciar positivamente na melhor adaptação das plantas às respostas aos estresses (Maggio et al. 2002).

Os estresses hídrico, nutricional ou osmótico também podem desencadear aumento da suberização e lignificação das paredes celulares, sendo uma das estratégias mais comuns e eficientes para diminuir a difusão de água em condições adversas (Lux et al. 2004; Kotula et al. 2009; Krishnamurthy et al. 2009, 2011; Ranathunge et al. 2011; Kreszies et al. 2019).

A suberina é um biopoliéster complexo que pode formar barreiras na via apoplástica, podendo ser depositada na camada interna da parede celular da endoderme ou também na exoderme. (Nawrath et al. 2013). As suberinas das paredes podem ter dois tipos de domínios, os polialifáticos e poliaromáticos (Bernards, 2002; Kolattukudy et al. 1975). A suberina alifática é a principal barreira no transporte de água devido à sua característica hidrofóbica (Hose et al. 2001; Zimmermann et al. 2000), enquanto a suberina aromática representa a principal barreira para solutos e entrada de patógenos (Enstone et al. 2002; Lulai et al. 1998). Já a lignina, é um biopolímero aromático complexo (Lupoi et al. 2015), que constitui grande parte das estrias de Caspary, juntamente com a suberina (Zeier & Schreiber, 1998).

Uma vez que as plantas podem responder aos estresses com aumento da lignificação e/ou suberização das paredes e banda de Caspary formando barreiras no transporte apoplástico, a água, deve continuar seu caminho pelo transporte simplástico de célula para célula, por aquaporinas e/ou plasmodesmos (Roberts & Oparka, 2003; Ranathunge et al. 2004; Tyerman et al, 2017).

As aquaporinas são proteínas localizadas em diversas células e tecidos das plantas e podem desempenhar papeis importantes no melhor uso da água (Maurel et al. 2015). Segundo a revisão de Gaspar (2011), a identificação funcional da primeira aquaporina de plantas ocorreu em 1993, tendo grande aumento atualmente das quantidades de informações sobre a estrutura, localização e a função dos diferentes membros desta família multigênica de proteínas de membrana. Devido à semelhança dos genes que codificam para aquaporinas e às suas diversas presenças nos órgãos e tecidos vegetais, essas proteínas têm sido consideradas essenciais na manutenção de funções fisiológicas, como movimento de água e soluto, carga e descarga de floema, controle da abertura estomática, manutenção da condutância hidráulica de raízes, caule e folhas (Gaspar, 2011; Ayadi et al., 2019).

Segundo Jaykumar & Avinash (2021), as aquaporinas podem ser classificadas de acordo com suas características estruturais e sua localização em cinco grupos: proteínas intrínsecas da membrana plasmática (PIPs), proteínas intrínsecas do tonoplasto (TIPs), proteínas intrínsecas do tipo nodulina (NIPs), pequenas proteínas intrínsecas (SIPs) e proteínas X intrínsecas (XIPs) (Maurel et al. 2008). Há vários fatores como estresses abióticos, nutrição nitrogenada, hormônios vegetais e luz que ajustam e controlam as atividades biológicas e nível de expressão, transcrição, pós-transcrição, tradução e póstradução das aquaporinas (Kaldenhoff & Fischer, 2006; Li et al. 2016). Recentemente Li et al. (2016) e Tyerman et al. (2017), evidenciaram que a condutividade hidráulica de raízes pode ser regulada por aquaporinas ligadas à membrana plasmática, sob diferentes tratamentos de NO<sub>3</sub><sup>-,</sup> usando plantas de *Arabidopsis*. Esses pesquisadores observaram que tanto a transcrição dos genes *PIP1;1*, *PIP1;2*, *PIP2;1* e *PIP2;3* aumentaram, quanto a abundância de proteínas PIP1 e PIP2 incrementaram, melhorando assim o fluxo simplástico de água. Em consonância, Darren et al. (2020) acrescentaram que a forma, concentração de N, espécie vegetal e exposição ao estresse hídrico podem mudar a condução de água nas plantas por meio das aquaporinas. Dessa forma, tem sido relacionado que a presença e função das aquaporinas e sua plasticidade podem melhorar a condutividade hidráulica, permitindo que a água seja transportada através das membranas celulares, seguindo gradientes de pressão osmótica e hidrostática (Wang et al. 2019).

Outro mecanismo que pode ser utilizado pelas plantas em situação de escassez hídrica no ambiente é a modificação na concentração de certos nutrientes (Waraich et al. 2011). Foi demonstrado que os macronutrientes podem mitigar os impactos negativos do estresse hídrico em diferentes culturas, incluindo milho (Kaya et al. 2006; Aslam et al. 2013; Usmani et al. 2020), arroz (Chen et al. 2011), sorgo (Hattori et al. 2005; Asgharipour e Heidari 2011), soja (Dimkpa et al. 2017) e trigo (Karim et al. 2012; Shabbir et al. 2016; Shah et al. 2017; Alzahrani et al. 2018; Maghsoudi et al. 2019).

Segundo Façanha et al. (2019), classicamente os nutrientes têm sido classificados de acordo com a quantidade exigida pelas plantas, sendo que os necessários em maiores concentrações são nomeados de macronutrientes, como o nitrogênio (N), fósforo (P), potássio ( $K^+$ ), cálcio ( $Ca^{2+}$ ), magnésio ( $Mg^+$ ), enxofre (S). Já os micronutrientes, que tem grande importância fisiológica, mas são requeridos em menores quantidades são o boro (B), cloro (Cl), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), zinco (Zn), molibdênio (Mo) e níquel (Ni) que podem estar em maior ou menor quantidade nos ecossistemas e são suscetíveis a intempéries como a seca (Lambers e Oliveira, 2019; Terrer et al. 2020; Isbell et al. 2019).

A baixa precipitação diminui a disponibilidade de nutrientes no solo (Delgado-Baquerizo *et al.* 2013), mas ao mesmo tempo, pode provocar respostas adaptativas das plantas fazendo com que elas aumentem a absorção de N, K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> e melhorem com isso sua resistência à seca (Tripler *et al.* 2006 ; Sardans *et al.* 2012; Sardans & Penuelas, 2015). Dentre os macronutrientes, o nitrogênio é fundamental para o ciclo e manutenção da vida (Oosterhuis et al. 2014). Este nutriente compõe uma vasta gama de metabólitos e compostos estruturais, incluindo proteínas, ácidos nucleicos, clorofila, co-enzimas, fitohormônios e metabólitos secundários, sendo disponíveis no ambiente sob diferentes formas, como amônio ( $NH_4^+$ ), nitrato ( $NO_3^-$ ), aminoácidos, dentre outros (Cordeiro, 2004; Evans & Wildes 1971; Leigh & Wyn, 1984; Britto & Kronzucker 2008; Marschner, 2011).

A absorção de N através da membrana plasmática pode ocorrer por dois tipos de carregadores (Siddiqi et al. 1990; Lea, 1993; Von et al. 1997). Os transportadores de baixa afinidade (Low Affinity Transport System - LATS) que absorvem N quando sua concentração externa é alta e são caracterizados como constitutivos, e os carregadores de alta afinidade (High Affinity Transport System - HATS), os quais absorvem menores concentrações de N externos (Aslam et al. 1992; Lea, 1993; Von et al. 1997). Para o nitrato, sob concentrações externas inferiores de 100-200  $\mu$ M<sup>-1</sup>, o transporte pela membrana ocorre via carregadores de alta afinidade (HATS). Acima dessas concentrações, a absorção de nitrato ocorre pelos carregadores de baixa afinidade (Von et al. 1997).

O N pode também ajudar na tolerância à seca, melhorando a eficiência do fotossistema II (PSII), diminuindo o grau de fotoinibição e auxiliando na eficiência fotossintética (Fv/Fm) (Zhou et al. 2012). Em mudas de algodão estressadas pela seca, a resistência ao estresse hídrico é influenciada pela concentração de nitrogênio e tem uma forte associação com as atividades de enzimas antioxidantes, aumentando a atividade das mesmas e resultando na redução da peroxidação lipídica (Zhou et al. 2012). Segundo Saneoka et al. (2004), o estresse hídrico aumenta a concentração o malondialdeído (MDA) nas folhas, das quais ao serem suplementadas com nitrogênio reduziram este composto (Saneoka et al. 2004).

Outro macronutriente essencial para o desenvolvimento das plantas em escassez hídrica é o potássio (Cakmak, 2005). O potássio desempenha funções vitais na manutenção do status hídrico da planta, movimento estomático, atividade enzimática, osmorregulação e estabilidade da membrana (Farooq et al. 2009; Marschner, 2011; Ahmad et al. 2014; Jatav et al. 2014; Cherel et al. 2014). É um nutriente com alta mobilidade em transporte de longa distância, através do xilema e floema (Marschner, 1995), sendo o mais abundante cátion no citoplasma e desempenhando importante função na diminuição do potencial osmótico celular (Shabala & Pottosin, 2014). O potássio pode ser absorvido de duas maneiras. A primeira é realizada por um transportador de baixa afinidade e a outra possibilidade por um transportador de alta afinidade, sendo ambos localizados na membrana plasmática (Epstein; Rains; Elzam, 1963; Vale; Jackson; Volk, 1987; Santa; Danna; Czibener, 2000; Banuelos *et al.* 2002; Martinez & Cordero; Matinez; Rubio, 2005).

O sistema de absorção de alta afinidade opera principalmente em baixas concentrações externas (<1 mM) de K<sup>+</sup>, contra um gradiente eletroquímico, e pode ocorrer tanto pelos transportadores simporte de K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> da família (KT/HAK/KUP) e transportadores simporte de K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> da família *HKT1*. (Vale; Jackson; Volk, 1987; Hirsch et al. 1998; Spalding et al. 1999; Santa; Danna; Czibener, 2000; Véry & Sentenac, 2003; Martinez & Cordero; Matinez; Rubio, 2005). Já o sistema de transporte de baixa afinidade (LATS), domina em concentrações externas mais altas (> 1 mM), principalmente por meio da atividade dos canais de potássio, como os da família (*AKT*) (Maathuis e Sanders, 1997).

A absorção de potássio também está envolvida em respostas fisiológicas e mecanismos moleculares que melhoram as condições das plantas em estresse hídrico pelo melhor uso da água (Eakes et al. 1991; Egilla et al. 2001; Jatav et al. 2014). Maiores concentrações endógenas de potássio podem facilitar a sobrevivência das platas em ambientes secos por meio de diferentes mecanismos, como ajuste osmótico, alongamento celular, estabilidade da membrana plasmática, regulação estomática, bem como, desintoxicação de espécies reativas de oxigênio, resultando assim, na melhor tolerância ao estresse hídrico (Wang et al. 2010). Os transportadores de potássio também são essenciais para maior eficiência no uso da água (Bañuelos et al, 2002), tendo em vista que transportadores de K<sup>+</sup> podem atuar como fatores-chave no ajuste osmótico em *Arabidopsis thaliana*, uma vez que maiores concentrações endógenas de K<sup>+</sup> melhoraram a retenção de água por baixar o potencial hídrico, garantindo melhor regulação estomática e mantendo a atividade fotossintética via translocação de fotoassimilados (Römheld & Kirkby, 2010; Zörb et al. 2014).

Além dos nutrientes N e K<sup>+</sup>, o cálcio (Ca<sup>2+</sup>) também pode participar de uma ampla gama de resposta a fatores ambientais estressantes, como a seca, cujo processo de sinalização endógena das plantas é acompanhado por alterações na concentração citossólica de cálcio (Gilroy & Trewavas, 2001).

O cálcio desempenha funções primordiais em processos celulares, cujas alterações na sua concentração intracelular modulam respostas a estresses como hídrico, nutricional, fótico, patógenico e hormonal (Harper, 2001; Knight & Knight, 2001). Para que haja a modulação de respostas, assinaturas específicas de cálcio codificam as informações para o estímulo de respostas eficientes (McAinsh & Hetherington, 1998; Allen et al. 2001; Hetherington & Brownlee 2004). As informações codificadas por essas assinaturas podem ser reconhecidas por proteínas sensoras que as transmitem em respostas a jusante, como cascatas de fosforilação e regulação da expressão gênica (Luan et al. 2002; Scrase et al. 2003).

As proteínas sensoras de cálcio podem ser diferenciadas em proteínas semelhantes à calcineurina B (CBLs) e proteínas cinases dependentes de cálcio (CDPKs). As CBLs interagem com um grupo específico de proteínas cinases, designadas, proteínas cinases de interação com CBL (CIPKs), desempenhando funções essenciais (Cheong et al. 2007). Umas dessas funções é a ativação da CIPK (uma proteína cinase), pelos sensores de cálcio CBL que auxiliam a CIPK a formar o complexo CBL / CIPK que, por sua vez, podem fosforilar, regular e ativar os transportadores de outros nutrientes na membrana plasmática, como o K<sup>+</sup> e o NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, aumentando o influxo desses nutrientes (Behera et al. 2017).

Segundo Manishankar et al. (2018), há um notável papel multifuncional da cinase CIPK23, que em combinação com os sensores de Ca<sup>2+</sup>, CBL1 e / ou CBL9 podem coordenar a nutrição de plantas para alguns nutrientes como é o caso da nutrição de K<sup>+</sup>, cuja CIPK23 regula a entrada de K<sup>+</sup> tanto pelo canal AKT1, quanto pelo transportador de alta afinidade HAK5 de potássio (Ragel et al. 2015; Xu et al. 2006). Além disso, a CIPK23 pode regular o canal TPK para facilitar a liberação de K<sup>+</sup> que está dentro do vacúolo para o citoplasma (Tang et al. 2020). Segundo Ho et al. (2009), a cinase CIPK23 pode formar um complexo com CBL1, chamado complexo CBL1-CIPK23 da cinase sensor Ca<sup>2+</sup> que pode fosforilar o resíduo Thr101 do transportador de nitrato NPF6.3 / NRT1.1, que em seu status fosforilado determina o modo de afinidade de transporte desta proteína, para alta ou baixa afinidade em relação à absorção do nitrato (Ho et al. 2009). Segundo Liu et al. (2020), já foi verificado que o mesmo complexo CBL1/2-CIPK23 pode ser ativado pelo aumento de cálcio intracelular, que pode passa através de proteínas de membrana do tipo OSCA1, que por usa vez, é ativada por estresses como o hídrico ou o osmótico.

Um dos ambientes que comumente apresentam grandes variações na disponibilidade de água, luz e nutrientes e que pode ocasionar periodicamente estresses, como hídrico, fótico e nutricional, é o ambiente epifítico (Benzing, 2000). Esse ambiente é habitado por plantas epífitas podendo esse hábito ser descrito como, uma forma de vida que compreende espécies de plantas vasculares e não vasculares que podem utilizar troncos e galhos de árvores como apoio para se estabelecerem e crescerem, sem depender do solo para a obtenção de água e nutrientes (Zotz, 2013). A disponibilidade de água pode influenciar fortemente o estabelecimento e o crescimento das epífitas em seu habitat, podendo causar estresse hídrico nessas plantas em tempos de pouca chuva (Zotz, 2016).

Uma das plantas que normalmente pode ser encontrada nesse habitat epifítico é a bromélia (Benzing, 2000). A família Bromeliaceae possui 75 gêneros e 3600 espécies (Abrahamczyk & Kessler, 2015; Gouda & Butcher, 2019) que apresentam grande diversidade morfológica e ecológica, colonizando desde ambientes áridos até florestas ombrófilas densas com distribuição nas regiões tropicais e subtropicais da América. Aproximadamente 900 espécies podem ser encontradas na Floresta Atlântica (Luther & Sieff 1994, 1997; Luther 2001).

Para poderem habitar o dossel das árvores, as bromélias, ao longo da evolução, desenvolveram adaptações morfológicas, tais como, conter folhas dispostas em roseta, formando um tanque que permite uma certa retenção da água de chuva e detritus (Benzing, 2000). Uma solução nutritiva é formada, principalmente, por meio da água que escorre das folhas e galhos da planta hospedeira, carregando consigo, nutrientes inorgânicos e orgânicos que ficam contidos no tanque. Há também associações com anfíbios, formigas, invertebrados e uma vasta flora microbiana que contribuem para a nutrição das bromélias (Leme, 1993; Benzing, 2000; Leroy *et al.* 2019).

Além de possuírem adaptações morfológicas, as bromélias epífitas, geralmente, possuem adaptações metabólicas, como poder ajustar o potencial osmótico por meio da acumulação de alguns nutrientes e/ou compostos orgânicos, poder mudar o tipo de fotossíntese de C<sub>3</sub> para CAM. Essas adaptações ajudam a reduzir a perda de água por transpiração, auxiliando no uso da água de maneira mais eficiente sob déficit hídrico e mantendo assim, maior conteúdo de água nos tecidos em condição de seca (Nievola et al. 2005; Yue et al. 2006; Freschi et al. 2010, Castillo et al. 2016; Basu et al. 2016). Em relação ao ajuste osmótico, muitas bromélias epífitas diminuim os potenciais osmóticos dos tecidos, chegando a valores mais negativos que -1,0 MPa (Lüttge et al. 1986; Zotz & Andrade, 1998). Essa redução pode ser causada pelo aumento da concentração celular de certos compostos orgânicos, através da síntese ou acúmulo de osmólitos, como a prolina, os açúcares ou de certos nutrientes, como K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup>, causando diminuição do potencial hídrico e contribuindo para maior entrada de água nas células (Barathi et al. 2001, Garg et al. 2001;Morgan, 2003; Parida et al. 2007).

Segundo Garg et al. e Barathi et al. (2001), o estresse hídrico aumentou os teores de açúcar solúveis totais e prolina livres em plantas de *Vigna aconitifolia* (Fabaceae), ajudando na melhor retenção de água. Da mesma forma, a espécie *Acanthostachys strobilacea* (Bromeliaceae), teve o conteúdo endógeno aumentado de prolina, permitindo a ação eficiente das enzimas antioxidantes e promovendo vias alternativas de desintoxicação das ROS o que dominuiu a formação de ROS em restrição hídrica (Szabados & Savouré, 2010).

Outro mecanismo que pode aparecer em algumas bromélias e que permite o melhor uso da água sob restrição hídrica, é ter uma fotossíntese flexível e serem capazes de mudar de C<sub>3</sub> para o CAM (Larcher, 2006; Borland et al. 2011). A fotossíntese é o sistema fisiológico mais importante na manutenção da vida na Terra, quando plantas com fotossíntese C<sub>3</sub> utilizam uma molécula com três carbonos (i.e., 3-fosfoglicerato) para sintetizar carboidratos. Já o sistema fotossintético CAM utiliza um mecaismo com baixo custo de transpiração, abrindo seus estômatos no período noturno, assimilando CO<sub>2</sub> e acumulando ácidos orgânicos no vacúolo, que, subsequentemente, serão descarboxilados no período diurno, quando seus estômatos se encontram fechados e incorporando o carbono ao 3-fosfoglicerato via Rubisco (Osmond & Holtum, 1981).

O modo de fotossíntese CAM é expresso em aproximadamente 300 gêneros de 24 famílias, e em aproximadamente 50% das espécies de bromélias epífitas (Larcher, 2006; Borland et al. 2011). Segundo Osmond (1978) e Lüttge (2004), o CAM pode ser dividido em quatro fases: na primeira, os estômatos estão abertos no período noturno, fixando o CO<sub>2</sub> atmosférico pela enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) e formando oxaloacetato, que pela ação da enzima malato desidrogenase (MDH) é transformado em malato. Este é armazenado no vacúolo na forma de ácido málico (Ranson & Thomas, 1960; Lüttge et al.1986). A segunda fase inicia-se no começo do período diurno, quando os estômatos estão se

fechando, ocorrendo a diminuição da atividade da PEPC e aumento da atividade da enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (RUBISCO), podendo o carbono ser fixado pelas duas enzimas (RUBISCO e PEPC) (Winter & Tenhunen, 1982). A terceira fase ocorre durante o período luminoso, quando os estômatos se encontram fechados e o ácido málico é descarboxilado ao ser exportado do vacúolo, liberando o  $CO_2$  que poderá ser fixado pela RUBISCO (Cushman & Borland, 2002; Lüttge, 2004). A fase quatro ocorre no início do período escuro, quando a RUBISCO diminui sua atividade e a PEPC começa a fixar o  $CO_2$  atmosférico, retomando novamente o CAM (Osmond, 1978; Lüttge, 2004).

Existem três tipos principais de CAM, que podem ser identificados como CAM clássico, CAM *cycling* e CAM *idling*. Enquanto as plantas que apresentam CAM clássico possuem as características descritas nas 4 fases acima, as plantas caracterizadas como CAM *cycling* apresentam um comportamento estomático semelhante ao de uma planta  $C_3$ , mas com um pequeno acúmulo noturno de ácido orgânico. Durante o dia, seus estômatos permanecem abertos e os ácidos são descarboxilados, liberando CO<sub>2</sub> para a enzima Rubisco (Cushman, 2001; Herrera, 2009). No caso das plantas CAM *idling*, os estômatos permanecem fechados praticamente durante 24 horas e apresentam acidificação pela síntese noturna de ácidos orgânicos por meio da refixação do CO<sub>2</sub> respiratório. Esse tipo de CAM se expressa, geralmente, em condições ambientais muito estressantes (Borland et al. 2011).

Uma das espécies que apresenta facultatividade fotossintética, podendo transitar entre C<sub>3</sub>-CAM em diferentes condições ambientais, é a bromélia *Guzmania monostachia* (L.) Rusby ex Mez. Essa espécie pode ser encontrada no nordeste do Brasil, com maiores registros no Ceará e Pernambuco (Martinelli, 2008). Durante o seu crescimento a *G. monostachia* pode mudar sua morfologia, desenvolvendo um tanque formado pela sobreposição das bases foliares na fase adulta (Freschi et al. 2010).

Segundo Freschi et al. (2010), as folhas dessa espécie podem ser divididas em diferentes porções: apical, mediana e basal, as quais apresentam algumas adaptações morfofisiológicas distintas, permitindo a elas desempenharem diferentes funções, sendo essas muito imporatntes para a sobrevivência da mesma em diversos ambientes. Enquanto o ápice de suas folhas tem maior concentração de estômatos, clorofilas e carotenóides, possuindo maior capacidade de expressão do CAM, sua base foliar apresenta maior espessura de hidrênquima, menor expressão do CAM e maior concentração de tricomas absorventes que ficam em contato direto com a solução do tanque.

Segundo Pereira et al. (2018), em pesquisa que averiguou o efeito de formas de nitrogênio (nitrato e amônio) sobre a modulação da intensidade do CAM em escassez hídrica (utilização de PEG), foi encontrado que folhas destacadas de G. monostachia tiveram maior expressão do CAM quando cultivadas na presença exclusiva de amônio (5,0 mM total de N), comparativamente aos outros tratamentos (nitrato ou nitrato de amônio). Esses autores observaram que o amônio estimula o transporte de ácido málico para o vacúolo através da ação do transportador ALMT9, fazendo com que o CAM seja mais pronunciado. Em contrapartida, quando o nitrato foi disponibilizado na mesma concentração do amônio (5 mM de N), a intensidade do CAM foi reduzida e o conteúdo relativo de água na parte apical foi aumentado. Segundo Ota (1988a), o nitrato é conhecido por inibir a atividade da enzima V-ATPase, que juntamente com a V-PPiase são responsáveis pelo transporte de ácidos orgânicos para o vacúolo e pela saída de prótons dessa organela. Entretanto, não há estudos mostrando o efeito negativo do nitrato sobre a indução do CAM em plantas facultativas, como na bromélia G. monostachia. Assim, algumas questões surgiram: estaria a absorção de nitrato influenciando a aquisição de outros nutrientes fazendo com que houvesse mudanças no perfil metabólico das folhas? O K<sup>+</sup> poderia estar sendo absorvido conjuntamente como o NO<sub>3</sub><sup>-</sup> influenciando, por exemplo, o abaixamento do potencial osmótico e a acumulação de água nos tecidos foliares, o que causaria um atraso ou uma inibição do CAM quando as plantas fossem submetidas à escassez hídrica?

Segundo observações de Rubio et al. (2014), a nutrição com nitrato pode intensificar a absorção líquida de potássio, visando ao equilíbrio de cargas dentro da célula. Assim, o fornecimento de  $NO_3^-$  poderia regular a expressão de genes transportadores de K<sup>+</sup> em algumas espécies, ocorrendo uma coregulação no transporte e equilíbrio entre  $NO_3^-$  e K<sup>+</sup> (Wang et al, 2012; Rubio et al, 2014).

Logo, se a absorção de nitrato estiver associada à de potássio em *G. monotachia*, as plantas com maiores concentrações de  $NO_3^-$  no tanque teriam incrementos significativos de potássio endógeno. A absorção conjunta desses nutrientes permitiria o ajuste osmótico das plantas, acarretando a redução do potencial hídrico e favorecendo a absorção de água a partir do tanque ou sua manutenção nas células foliares. Assim, como consequência de um melhor

status hídrico, mesmo após a aplicação de 7 dias de escassez de água, haveria um atraso ou até mesmo uma certa inibição da passagem do metabolismo  $C_3$  para o CAM.

#### Justificativa e relevância do tema

Uma vez que o mau uso das fontes hídricas é causado principalmente pela utilização de métodos de irrigação inadequados (Tundisi, 2003), juntamente com uso excessivo de fertilizantes aplicados em plantações, onde grande parte é lixiviado poluindo rios e oceanos (Garnett *et al.* 2015), e que, regiões desérticas e semiáridas estão aumentando com as mudanças climáticas globais (Cushman & Borland 2002), tornam-se cruciais os estudos básicos em plantas, como *G. monostachia*, que apresentam modulações da expressão do CAM em função da escassez hídrica e de diferentes fontes de N. Pois entender os mecanismos de atuação dos nutrientes pode facilitar, futuramente, o desenvolvimento de novas estratégias biotecnológicas, por meio da bioengenharia, as quais permitam a obtenção de plantas mais tolerantes à deficiência hídrica. Assim, estudos fisiológicos e moleculares acerca da interação dos nutrientes, como, por exemplo, nitrogênio e potássio, e seus efeitos na modulação do status hídrico e do perfil metabólico das plantas, além da indução do CAM, são de suma importância para a Ciência Vegetal.

## **Objetivos**

O presente trabalho teve como objetivos: 1) caracterizar mudanças no perfil metabólico e no *status* hídrico das folhas, comparando-se as porções apical e basal, de plantas de *Guzmania monostachia* que foram cultivadas na presença de nitrato (0,05 ou 2,5mM N total), previamente à aplicação do estresse hídrico; 2) compreender a influência do nitrato sobre a indução do CAM nos ápices foliares.

## Material e Métodos

Para a realização desse experimental foram utilizadas bromélias epífitas da espécie *Guzmania monostachia* (L.) Rusby ex Mez. adultas, com aproximadamente 3 anos de idade, com tanque completamente desenvolvido e cultivadas em casa de vegetação no fitotério do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da USP. As bromélias foram cultivadas em casa de vegetação (Fig. 1) onde estavam submetidas a regas regulares e padronizada por aspersores e tiveram fornecimento de nutrientes a cada 15 dias com aplicação de solução nutritiva, uma a uma, dentro do tanque.



**Figura** 1: Bromélias da espécie *Guzmania monostachia* em cultivo em casa de vegetação no fitotério do Departamento de Botânica do Instituto de Biocências da USP.

#### Aclimatação em câmara de crescimento

Um mês antes do início dos experimentos as plantas foram transferidas para a câmara de crescimento (fitotron) para aclimatação e a fim de se esgotar, pelo menos em parte, o conteúdo de nitrogênio endógeno. Elas permaneceram sob condições controladas de temperatura ( $25 \pm 2^{\circ}$ C durante o período claro e  $22 \pm 2^{\circ}$ C durante o período escuro),

luminosidade (170 a 200  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), umidade relativa do ar (60% durante o período claro e 70% durante o período escuro) e fotoperíodo de 12 horas (Imagem – 2). As bromélias foram regadas diariamente com 30 mL de água destilada nos tanques durante todo o período de aclimatação, não havendo fornecimento algum de nutrientes.



**Figura 2:** Plantas de *Guzmania monostachia* em período de aclimatação dentro da câmara de crescimento.

#### **Delineamento experimental**

As bromélias após a aclimatação foram submetidas a dois tratamentos nutricionais, recebendo soluções nutritivas em seus tanques. Essas foram compostas por macronutrientes (metade da concentração) da formulação de Knudson (1946) e por micronutrientes de Murashige & Skoog (1962). Além disso, houve modificação com relação às concentrações de nitrogênio (N). Esse nutriente foi oferecido na forma exclusiva de nitrato de cálcio em duas concentrações: uma muito baixa, representando um possível controle sem nitrogênio - 0,05 mM de N total - e outra com boa disponibilidade de nitrato - 2,5mM N total. O sal CaSO<sub>4</sub> foi utilizado para repor os íons de SO<sub>4</sub>. que foram removidos de cada uma das soluções pela retirada do (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e o Ca<sup>2+</sup> foi balanceado com a adição de CaCO<sub>3</sub> em um dos tratamentos (Tabela 1). Cada bromélia recebeu no tanque 30 ml de solução nutritiva com diferentes concentrações de nitrato de cálcio. Após 30 dias com regas diárias, as plantas foram submetidas à restrição hídrica por sete dias. Foi criado um segundo controle que recebeu rega normal com água durante os mesmos sete dias. O tratamento com restrição hídrica visou estimular passagem da fotossíntese C<sub>3</sub> para CAM (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema ilustrativo do conjunto experimental, mostrando temporalmente as diferentes etapas de cultivo e os parâmetros escolhidos para as análises.

**Tabela 1.** Formulações das soluções nutritivas empregadas nos tratamentos com nitrato reduzido ou com boa suplementação de nitrato, como única forma de N.

Sais	½ Knudson (1946)	0,05mM de N total na forma de NO <sub>3</sub> -	0,05mM de N total na forma de NO <sub>x</sub> -
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	250 mg/ L		
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2, 4</sub> H <sub>2</sub> O	500 mg/ L	5,9 mg/ L	295 mg/ L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	125 mg/ L	125 mg/ L	125 mg/ L
MgSO <sub>4 7</sub> H <sub>2</sub> O	125 mg/ L	125 mg/ L	125 mg/ L
Micro MS	5 mL/ L	5 mL/ L	5 mL/ L
Fe-EDTA	10 mL/ L	10 mL/ L	10 mL/ L
CaCO <sub>3</sub>		122 mg/ L	
CaSO <sub>4</sub>		325,6 mg/ L	325,6 mg/ L

#### Coleta do material vegetal

Após 7 dias de estresse hídrico, foram coletadas das bromélias as folhas do oitavo ao décimo segundo nó (Fig. 4), utilizando-se as porções basais e apicais (com aproximadamente 5 cm de comprimento) para as análises fisiológicas e de expressão gênica. Nos ensaios que se seguiram, foram quantificadas as concentrações endógenas de potássio, nitrato, amônio e cálcio. Também foram analisados o potencial osmótico, conteúdo relativo de água, concentração de prolina, condutividade relativa, atividade da enzima PEPC, quantificação de malato, acidez titulável e a expressão do gene *PEPC1*.



**Figura 4:** Folhas retiradas da bromélia *Guzmania monostachia* após a planta ser submetida a 7 dias de escassez hídrica. Foram usadas apenas as do oitavo ao décimo segundo nó no experimental.

#### Análises Bioquímicas

Análise da concentração endógena de nutrientes

As análises dos nutrientes foram realizadas a partir das massas das partes apical e basal das folhas de cada tratamento. Os teores de nitrato, amônio, potássio e cálcio foram determinados em quadruplicatas de 8,0 g de massa fresca maceradas em N líquido e liofilizadas, segundo metodologia descrita por Malavolta *et al.* (1997), no Laboratório de Análises Agrícolas Ribersolo em Ribeirão Preto/SP.

Análise de potencial osmótico

Para a determinação do potencial osmótico ( $\Psi$ s), as amostras foram colhidas ao amanhecer (1h após o início da iluminação) conforme descrito por Vieira *et al.* (2017). Foi preciso retirar seiva das duas porções foliares (base e ápice) de cada amostra. Isso foi feito com auxílio de dois ependorffs; no primeiro com volume de 0,6g foi feito um furo no fundo com agulha, colocando-se dentro 300 mg de amostra fresca que anteriormente fora macerada em N líquido. Esse primeiro ependorff foi posto dentro de um segundo ependorff maior (de

1,2g), sendo levados à centrifuga a 13.000 rmp, durante 5 min em temperatura ambiente. Logo após essa centrifugação, a seiva que estava dentro no primeiro ependorff passou para o outro maior através do furo. A seiva foi analisada no osmômetro de pressão de vapor - modelo VAPRO 5520 (Wescor, Logan, UT, EUA) - do laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica de São Paulo. A osmolaridade foi medida em mmol kg<sup>-1</sup> e transformada em MPa, usando a equação de Van'tHoff (Santa-Cruz et al. 2002).

#### Determinação de prolina

Na determinação do teor endógeno de prolina usou-se um protocolo adaptado de Carillo et al. (2011) para a espécie G. monostachia. Para tanto, foram coletadas as porções apicais e basais das folhas das bromélias experimentais. Pesaram-se 300 mg de massa fresca de cada amostra (N=4), sendo maceradas em nitrogênio líquido. Após a maceração, foi adicionado a cada amostra 1 mL de uma solução contendo etanol:água (40:60 v/v), sendo agitada em vórtex, durante um minuto para homogeneização. Posteriormente, as amostras foram mantidas em geladeira durante 24 h para completar a extração. Para fazer o processo de reação, foi preparada uma solução mix contendo ninidrina 1% (v/v), diluída em ácido acético 60% (v/v) e etanol 20% (v/v). Em tubos com tampa de rosca de 1,5 mL foi adicionado 0,1 mL da solução que foi extraída da amostra para cada 0,2 mL da solução mix. Em seguida, os tubos foram fechados para serem novamente agitados em vórtex e, posteriormente, levados em banho-maria durante 20 minutos a 95°C. Após isso, os tubos foram resfriados até temperatura ambiente e 100 µL dessa solução final foram transferidos para os poços de microplacas. A leitura foi feita a 520 nm em leitor de microplacas. Para fazer a comparação da quantidade de prolina nas amostras, uma curva de L-prolina foi feita em etanol:água (40:60 v/v) sendo que o ponto mais baixo da curva tinha a concentração de 0,005 mM e o maior ponto 0.4 mM. A quantidade de prolina no material foi determinada em  $\mu$ mol g<sup>-1</sup> (MF).

#### Condutividade relativa

A condutividade relativa foi feita a partir do protocolo de Prasil & Zamecnık (1998). Para essa análise foram cortados 120 discos de 5 mm de diâmetro da porção apical das

bromélias experimentais por tratamento. Os discos foram, então, colocados em água ultrapura e secos levemente com papel toalha para remoção dos eletrólitos das células externas que podem ter sido danificadas pelo corte. Os discos foram colocados em tubos do tipo Falcon de 50 mL, contendo 10 discos em cada, com um total de 12 tubos por tratamento. Posteriormente, foram adicionados 20 mL de água ultra-pura em 4 tubos de cada tratamento e colocado o sensor do condutivímetro no interior dos mesmos imediatamente após a adição da água, a fim de medir o tempo que o aparelho levou para estabilizar a variação da medida, em relação à perda de eletrólitos ocorrida em cada tubo. Esses tubos foram usados como medidascontrole de cada tratamento. Quando a saída de eletrólitos estabilizou e os valores pararam de variar, foram feitas as medidas no leitor do condutivímetro, sendo anotado o tempo em segundos e o valor da condutividade ( $\mu$ S.cm<sup>-1</sup>).

Nos 4 tubos de cada tratamento foram adicionados 20 mL de água ultra-pura fechados e levados ao banho-maria (100°C) por 1 hora. Posteriormente, os tubos foram retirados do banho-maria e deixados resfriar em temperatura ambiente. Logo após, os tubos foram abertos para ser feita uma nova leitura.

Para a quantificação da condutividade relativa aseguinte equação foi usada após a obtenção dos dados: R0 (%) = 100\*(L0/L0M), onde RO= é a condutividade relativa de cada amostra em temperatura ambiente; LOM = condutividade específica de cada amostra após a fervura e LO= condutividade específica de cada amostra em temperatura ambiente.

#### Análise de conteúdo relativo de água

O conteúdo relativo de água (CRA) foi determinado conforme Weatherley (1950). Foram coletados dez discos de 0,50 cm<sup>2</sup> das duas porções foliares (ápice e base) de cada amostra. A massa fresca (MF) foi determinada imediatamente depois que os discos foram coletados. A massa túrgida (MT) foi obtida com a imersão dos discos em água destilada durante 24 h e a massa seca (MS) foi medida após 48 h de secagem a 65 °C. O conteúdo relativo de água foi determinado pela equação: CRA =  $[(MF - MS) / (MT - MS)] \times 100$ .

Para análise de acidez titulável foi utilizado o protocolo descrito por Matiz et al. (2013), sendo coletadas somente as porções apicais das folhas das bromélias experimentais, sendo maceradas em nitrogênio líquido. Para fazer a extração dos ácidos orgânicos, foi preparada uma solução que continha metanol/clorofórmio/água (12/5/1, v/v/v), da qual se utilizaram 500 µL para cada 100 mg (massa fresca) de amostras biológicas, as quais foram agitadas no vortex durante um minuto em microtubos de 1,5 µL. Após a homogeneização, foram colocadas em banho seco durante 30 minutos a 60°C. Posteriormente, foram adicionados 500 µL de água ultra-pura no mesmo microtubo, seguido de centrifugação por 10 minutos a 16000 g. Ao término do processo de extração, foi coletado o sobrenadante. Para quantificação dos ácidos foi usada uma placa de microtitulação, onde se colocaram em cada pocinho 100µL de uma solução de fenolftaleína (100mg/10mL de etanol), como indicador de pH, e adiconados nos primeiros poçinhos da placa 100µL de NaOH em concentrações decrescentes sendo que o maior ponto da curva tinha a concentração de 350 µL e o menor 25 µL para formação de uma curva para comparação. Após, foi adicionado 100 µL do extrato, sendo observada a diferença de coloração. O pocinho que apresentou o ponto de virada, representado pelo pocinho que passou de incolor para rosa, mostrou a quantidade necessária de NaOH para neutralizar os íons  $H^+$  presentes na amostra, indicando o nível de acidez das mesmas.

Ensaio da atividade da enzima PEPC

Foi determinada a atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) segundo o protocolo descrito por Nievola *et al.* (2005) e ajustado para *G. monostachia* conforme Freschi et al. (2010b). Para essa análise foram usados 0,5g de massa fresca dos ápices sendo macerada em nitrogênio líquido e em seguida imersa em tampão de extração (pH 8,0), contendo 200 mM de Tris-HCl, 10 mM cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), 5 mM de ditiotreitol (DTT), 1 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 0,5 % (m/v) de albumina bovina (BSA) e 10 % (v/v) de glicerol para serem centrifugadas a 15.000 rpm por 2 minutos a 4 °C. O sobrenadante resultante foi coletado e utilizado nos ensaios enzimáticos. A reação foi feita a 30 °C em 2 ml de meio de reação contendo 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>), 20 mM nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NADH) e 3 mM fosfoenolpiruvato (PEP). A atividade enzimática foi

baseada no consumo de NADH em (mmol min -1 g-1), sendo quantificada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 340 nm.

#### Quantificação de malato

Para quantificar o malato, amostras com 0,3 g de massa fresca dos ápices das folhas de *G. monostachi*a foram maceradas em nitrogênio líquido e transferidas para microtubos de 1,5 mL. Após isso, foi adicionado 0,5 mL de metanol, clorofórmio e água na proporção de 12:5:1. As amostras foram agitadas em vortex durante 3 minutos, permanecendo em banho-maria a 60 °C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 500  $\mu$ L de água ultrapurificada às amostras e o material foi centrifugado a 16.000 g durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram coletados, transferidos para microtubos que foram estocados em freezer a -20 °C. Para a derivatização dos ácidos orgânicos, foram utilizados 100  $\mu$ L do extrato, sendo colocados em um frasco apropriado para cromatografia a gás com detector de massa (GC-MS da sigla em inglês). Em seguida, as amostras foram secas sob vácuo, sendo acrescidas de 50  $\mu$ L de piridina e do derivatizante N-tert-butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamida (MTBSTFA). O material foi incubado por uma hora a 90 °C em estufa. Por fim, as amostras foram analisadas em GC-MS, injetando 1 $\mu$ L de amostra, com ajuste da rampa de temperatura de 100 a 300 °C, a 6 °C por minuto e mantido a 300 °C por mais 10 minutos. A unidade dessa medida foi expressa em µmol de malato.g<sup>-1</sup>MS.

#### Análises da expressão gênica

Foi realizada a expressão do gene que codifica para a enzima fosfoenolpiruvato carboxilase específica do (*PEPC*<sub>1</sub>) específica do CAM por meio da técnica de RT-qPCR. O RNA total foi extraído com Trizol® (Invitrogen®). O cDNA foi sintetizado com o kit SuperScriptFirst-StrandSynthesis System paraRT-PCR (Invitrogen®). A reação de PCR foi realizada no aparelho StepOnePlusTM PCR Real Time (AppliedBiosystems®) e os produtos foram detectados com oSYBR® Green PCR Master Mix (AppliedBiosystems®). Todos os passos foram realizados segundo as especificações dos fabricantes.

#### Análises estatísticas

Os resultados obtidos em relação às análises de conteúdo relativo de água das plantas, condutividade específica, potencial osmótico, concentrações endógenas de nutrientes, quantificação de prolina, acúmulo noturno de malato, acidez titulável e atividade da enzima PEPC e de expressão gênica foram comparados a partir de uma Análise de Variância (ANOVA). O teste *a posteriori* de Tukey HSD foi utilizado para comparações de pares. As análises foram feitas utilizando-se o software IBM SPSS Statistics 20 (2018).

## **Resultados**

#### Conteúdo relativo de água

De acordo com o resultado obtido de conteúdo relativo de água, as bases foliares de *Guzmania monostachia* mantiveram um maior conteúdo hídrico quando submetidas à deficiência hídrica se comparado ao ápice sob o mesmo tratamento (Figura 5). As bases foliares sob restrição hídrica e que receberam 0,05mM de N apresentaram menor conteúdo relativo de água em relação às plantas hidratadas, não havendo diferenças do conteúdo hídrico entre as plantas das distintas condições hídricas e que receberam 2,5mM de N. Já o ápice foliar teve aproximadamente 40% menos conteúdo hídrico, no tratamento de deficiência hídrica, se comparado com a base, sendo que o as plantas que receberam 0,05mM de N apresentaram diferenças significativas com maiores conteúdos hídricos em condição de restrição hídrica se comparado às plantas nutridas com 2,5mM de N também em restrição hídrica no ápice (Figura 5).



**Figura 5.** Conteúdo relativo de água das bases e ápices foliares de *Guzmania monostachia* que receberam diferentes concentrações de nitrato como fonte exclusiva de N (0,05 mM e 2,5 mM de N total) e posteriormente receberam água por sete dias (controle) ou foram submetidas à deficiência hídrica pelo mesmo período. As barras indicam médias e erro padrão. Letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas entre base e ápice nas mesmas concentrações de N

disponibilizadas nas bromélias controle; letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre base e ápice nas mesmas concentrações de N disponibilizadas quando as plantas foram submetidas ao déficit hídrico; asterisco indica diferenças estatísticas entre plantas bem hidratadas e sob deficiência hídrica na mesma porção foliar e os colchetes com asterisco, indicam diferenças estatísticas entre diferentes tratamentos nutricionais em restrição hídrica na mesma porção foliar (ANOVA/Tukey HSD *post-hoc*test,  $\alpha = 0.06$ ).

#### Condutividade específica

As plantas que foram submetidas à deficiência hídrica tiveram sua condutividade específica aumentada em aproximadamente duas vezes em relação às plantas controle. Observaram-se também diferenças nos resultados relativos às distintas concentrações de N oferecidas, sendo que a maior condutividade específica foi encontrada na concentração de 0,05mM de N total em comparação a 2,5mM, sempre sob deficiência hídrica (Figura 6).



**Figura 6.** Condutividade específica dos ápices foliares de *Guzmania monostachia* que receberam diferentes concentrações de nitrato como fonte exclusiva de N (0,05 mM e 2,5 mM de N total) e posteriormente receberam água por sete dias (controle) ou foram submetidas à deficiência hídrica pelo mesmo período. As barras indicam médias e erro padrão. Letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas entre ápices em distintas concentrações de N disponibilizadas nas bromélias controle; letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre ápices em distintas pelo mesmo período.

submetidas ao déficit hídrico e asterisco indica diferenças estatísticas entre plantas bem hidratadas e sob deficiência hídrica na mesma porção foliar (ANOVA/Tukey HSD *posthoc*test,  $\alpha = 0.06$ ).

#### Potencial osmótico

O potencial osmótico das bromélias foi mais negativo nos ápices foliares em relação às bases em restrição hídrica (Figura 7). Foi evidenciado que, nas bases das folhas, o potencial osmótico não diferiu em relação ao controle bem hidratado e também não houve diferença entre as distintas concentrações de N oferecidas.

Já nos ápices foliares houve diferenças em relação ao potencial osmótico nas plantas em restrição hídrica, as quais apresentaram valores mais negativos se comparados com os dos ápices bem hidratados, sendo que as plantas que receberam 2,5mM total de N diminuíram significativamente seus valores de potencial osmótico em comparação com 0,05mM de N. (Figura 7).



**Figura 7.** Potencial osmótico das bases e ápices foliares de *Guzmania monostachia* que receberam diferentes concentrações de nitrato como fonte exclusiva de N (0,05 mM e 2,5 mM de N total) e posteriormente receberam água por sete dias (controle) ou foram submetidas à deficiência hídrica pelo mesmo período. As barras indicam médias e erro padrão. Letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas entre base e ápice nas mesmas concentrações de N

disponibilizadas nas bromélias controle; letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre base e ápice nas mesmas concentrações de N disponibilizadas quando as plantas foram submetidas ao déficit hídrico; asterisco indica diferenças estatísticas entre plantas bem hidratadas e sob deficiência hídrica na mesma porção foliar e os colchetes com asterisco, indicam diferenças estatísticas entre diferentes tratamentos nutricionais em restrição hídrica na mesma porção foliar (ANOVA/Tukey HSD *post-hoc*test,  $\alpha = 0.06$ ).

#### Concentração endógena de nutrientes

As concentrações endógenas de nitrato nos ápices e bases foliares diminuíram, de forma geral, com a deficiência hídrica (Figura 8A). Foi evidenciada a redução na concentração de nitrato nas bases foliares das plantas submetidas à deficiência hídrica em relação ao controle na concentração de 0,05mM de N total, o que não foi observado quando as plantas receberam 2,5 mM. Da mesma forma, as plantas nutridas com 2,5mM de N total em restrição hídrica tiveram concentrações significativamente maiores de nitrato em relação às plantas nutridas com 0,05mM de N total também em restrição hídrica na porção basal (Figura 8A). Em relação ao ápice, houve diminuição da concentração de nitrato em restrição hídrica se comparado ao controle; com maior acúmulo desse nutriente na concentração oferecida de 2,5mM de N total em comparação a 0,05mM nas plantas hidratadas (Figura 8A).

Em relação ao potássio, um dos nutrientes mais relacionados com o ajuste osmótico, foi evidenciado um maior acúmulo desse nutriente nas bases foliares em relação ao ápice, independente das concentrações de N oferecidas (0,05mM ou 2,5mM de N total) (Figura 8B). Quando as bromélias foram submetidas à restrição hídrica, a concentração de potássio nas bases foi, aproximadamente, 43% maior em relação ao ápice foliar. Na concentração de 0,05mM de N total, houve maior concentração de potássio tanto nas bases quanto nos ápices sob deficiência hídrica em relação ao controle bem hidratado. Além disso, as plantas que receberam 2,5mM de N total em restrição hídrica também apresentaram maior conteúdo de potássio na base em relação ao controle hidratado. Já no ápice foliar, a concentração disponibilizada de 2,5mM de N total não mostrou diferença em comparação com o material hidratado ou com a concentração de 0,05mM de N total disponibilizada. (Figura 8B).

A concentração do macronutriente cálcio teve maior acúmulo nas bases foliares sob restrição hídrica independente das concentrações de N oferecidas comparando-se com o controle bem hidratado (Figura 8C). As bases apresentaram um aumento no acúmulo de cálcio de, aproximadamente, 31,3% em relação aos ápices foliares em deficiência hídrica. Assim como, as bases foliares que receberam 2,5mM de N total em restrição hídrica apresentaram aumentos significativos no acúmulo de cálcio em relação à concentração disponibilizada de 0,05mM de N total. Já no ápice foliar, apenas na concentração de 0,05mM de N total é que houve diferença significativa no maior nível de cálcio nas plantas sob deficiência hídrica em relação ao controle bem hidratado. Já quando se comparou as duas concentrações de N sob escassez hídrica, as plantas que receberam 0,05mM N total mostraram teores significativamente maiores de cálcio (Figura 8C).

Em relação ao conteúdo de amônio, as bases e ápices das bromélias não diferiram, mostrando concentrações semelhantes entre as plantas submetidas ao déficit hídrico e hidratadas (Figura 8D). Entretanto, os ápices foliares das bromélias sob restrição hídrica e que receberam 2,5mM de N total mostraram teores mais elevados de  $NH_4^+$  em relação ao controle hidratado e também apresentaram um aumento significativo em relação à concentração de 0,05mM de N total em restrição hídrica (Figura 8D).





**Figura 8.** Concentrações endógenas de nitrato (A), potássio (B), cálcio (C) e amônio (D) nas bases e ápices foliares de *Guzmania monostachia* que receberam diferentes concentrações de nitrato como fonte exclusiva de N (0,05 mM e 2,5 mM de N total) e posteriormente receberam água por sete dias (controle) ou foram submetidas à deficiência hídrica pelo mesmo período. As barras indicam médias e erro padrão. Letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas entre base e ápice nas mesmas concentrações de N disponibilizadas nas bromélias controle; letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre base e ápice nas deficitas plantas foram submetidas ao déficit hídrico; asterisco indica diferenças estatísticas entre plantas bem hidratadas e sob deficiência hídrica na mesma porção foliar e os colchetes com asterisco, indicam diferenças estatísticas entre diferentes tratamentos nutricionais em restrição hídrica na mesma porção foliar (ANOVA/Tukey HSD *post-hoc*test,  $\alpha = 0.06$ ).

#### Quantificação de prolina

As bases e ápices foliares das bromélias mostraram comportamentos diferentes no que tange ao conteúdo de prolina em restrição hídrica na concentração de 0,05mM de N total (Figura 9). As bases foliares tiveram os maiores conteúdos de prolina sob deficiência hídrica na concentração de 0,05mM de N total em relação ao ápice em restrição hídrica e também em relação às bases foliares que receberam 2,5mM de N total em restrição hídrica com uma diminuição significativa de prolina nessa concentração. Do mesmo modo, houve aumento no conteúdo de prolina nos ápices foliares em deficiência hídrica na concentração de 0,05mM de N total em relação. Do mesmo modo, houve aumento no conteúdo de prolina nos ápices foliares em deficiência hídrica na concentração de 0,05mM de N total disponibilizada se comparada ao controle bem hidratado (Figura 9).


**Figura** 9. Quantificação de prolina das bases e ápices foliares de *Guzmania monostachia* que receberam diferentes concentrações de nitrato como fonte exclusiva de N (0,05 mM e 2,5 mM de N total) e posteriormente receberam água por sete dias (controle) ou foram submetidas à deficiência hídrica pelo mesmo período. As barras indicam médias e erro padrão. Letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas entre base e ápice nas mesmas concentrações de N disponibilizadas nas bromélias controle; letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre base e ápice nas mesmas concentrações de N disponibilizadas quando as plantas foram submetidas ao déficit hídrico; asterisco indica diferenças estatísticas entre plantas bem hidratadas e sob deficiência hídrica na mesma porção foliar e os colchetes com asterisco, indicam diferenças estatísticas entre diferentes tratamentos nutricionais em restrição hídrica na mesma porção foliar (ANOVA/Tukey HSD *post-hoc*test,  $\alpha = 0.06$ ).

## Acúmulo noturno de malato, acidez titulável e atividade da enzima PEPc

As bromélias submetidas ao tratamento de deficiência hídrica apresentaram aumento do acúmulo noturno de malato e do delta de acidez nos ápices foliares quando foram nutridas com 2,5mM de N total em relação à condição hidratada (Figura 10A, 10B). Já a atividade da enzima PEPC apresentou aumento na sua atividade quando as bromélias receberam 0,05mM de N total em deficiência hídrica se comparado ao controle bem-hidratado (Figura 10C).

O acúmulo noturno de malato dos ápices foliares apresentou um aumento nas duas concentrações oferecidas de N total (0,05mM e 2,5mM) em deficiência hídrica se comparado 30 ao controle bem hidratado (Figura 10A). Da mesma forma, a concentração disponibilizada de 2,5mM de N total apresentou aumento significativo no acúmulo de noturno de malato em plantas sob deficiência hídrica em comparação com 0,05mM N também em deficiência hídrica.Do mesmo modo, a acidez titulável teve um aumento de 68,5% na concentração de 2,5mM de N total no tratamento de deficiência hídrica se comparado com o controle bem-hidratado (Figura 10A).

O delta de acidez dos ápices foliares apresentou um aumento na concentração oferecida de 2,5mM de N total em restrição hídrica em relação à mesma concentração em disponibilidade hídrica, não havendo diferença entre as duas concentrações disponibilizadas de N em restrição hídrica (Figura 10B).

A atividade da enzima PEPc das bromélias em deficiência hídrica e na concentração de 0,05mM de N total resultou em um aumento de 40,8% em relação ao controle bem hidratado na mesma concentração de N disponibilizada. Já entre as distintas concentrações oferecidas de N em restrição hídrica não houve diferenças significativas (Figura 10C)



**A**)



**Figura 10.** Acúmulo de malato (A), acidez noturna (B) e atividade da enzima PEPC (C) nos ápices foliares de *Guzmania monostachia* que receberam diferentes concentrações de nitrato como fonte exclusiva de N (0,05 mM e 2,5 mM de N total) e posteriormente receberam água por sete dias (controle) ou foram submetidas à deficiência hídrica pelo mesmo período. As barras indicam médias e erro padrão. Letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas entre os ápices nas distintas concentrações de N disponibilizadas nas bromélias controle; letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os ápices nas distintas concentrações de N disponibilizadas nas bromélias controle; letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os ápices nas distintas concentrações de N disponibilizadas quando as plantas foram submetidas ao déficit hídrico e asterisco indica diferenças estatísticas entre plantas bem hidratadas e sob deficiência hídrica na mesma porção foliar (ANOVA/Tukey HSD *post-hoc*test,  $\alpha = 0.05$ ).

## Expressão gênica: PEPC1

O resultado de expressão do gene *PEPC1* dos ápices das bromélias não variou com as diferentes concentrações oferecidas de N total, bem como, não diferiu nas plantas em deficiência hídrica e controle (Figura 11).



**Figura 11**. Expressão do gene *PEPC1* dos ápices foliares de *Guzmania monostachia* que receberam diferentes concentrações de nitrato como fonte exclusiva de N (0,05 mM e 2,5 mM de N total) e posteriormente receberam água por sete dias (controle) ou foram submetidas à deficiência hídrica pelo mesmo período. As barras indicam médias e erro padrão. Letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas entre os ápices nas distintas concentrações de N disponibilizadas nas bromélias controle; letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os ápices nas distintas concentrações de N disponibilizadas quando as plantas foram submetidas ao déficit hídrico e asterisco indica diferenças estatísticas entre plantas bem hidratadas e sob deficiência hídrica na mesma porção foliar (ANOVA/Tukey HSD *posthoc*test,  $\alpha = 0.05$ ).

## Discussão

De maneira interessante, nossa pesquisa revelou que quando as bromélias foram submetidas à restrição hídrica a porção foliar que mais acumulou água foi a basal em relação ao ápice foliar. Investigações anteriores do nosso grupo submeteram as bromélias à restrição hídrica durante 7 ou 21 dias e observaram que o conteúdo relativo de água no ápice era sempre maior do que na base. No entanto, as plantas de *Guzmania monostachia* haviam sido cultivadas em outras concentrações e formas de nitrogênio, o que deve ter influenciado sobre maneira os resultados previamente obtidos. Foi sugerido que haveria um transporte de água da base para o ápice e que manter a água no ápice teria importância para a expressão do CAM nessa porção quando as plantas são expostas ao estresse hídrico (Freschi et al. 2010; Freschi & Mercier, 2012; Pereira et al. 2018).

A absorção e condução de água nas plantas podem ser determinadas pela condutância radial, ou seja, a absorção e condução de água que passa radialmente pelas raízes em plantas terrestres e, no caso das bromélias epífitas, pela base de suas folhas, já que essas adquiriram ao longo do tempo algumas das funções das raízes relacionadas à absorção de água e nutrientes (Gonçalves et al. 2020). Os tricomas especializados, localizados em maior quantidade nas bases foliares, onde ficam em contato direto com a solução contida nos tanques das bromélias, exercem importante função em absorver e conduzir radialmente a água para dentro das folhas (Steudle & Peterson, 1998).

Mas, para a água ser conduzida nas plantas terrestres, primeiramente ela tem que ser absorvida pelas raízes, que têm um papel crucial na percepção de disponibilidade de água, que, uma vez restringida, pode acarretar estresse hídrico caso não haja reposição da mesma (Pereira & Chaves, 1993). Segundo Aroca & Ruiz-Lozano (2012) e Sade & Moshelion (2017), durante o estresse hídrico, tanto a condução de água pelas raízes quanto pelas folhas são afetados nas plantas vasculares. Uma das estratégias mais comuns e eficientes para perder menor quantidade de água para o ambiente em condições adversas é a suberização e/ou lignificação intensificadas das paredes celulares dos tecidos radiculares, causando uma diminuição do transporte apoplástico radial. A via apoplástica transporta água e solutos pelos espaços intercelulares não encontrando muitos obstáculos até o ponto em que encontram barreiras potentes, como a faixa de Caspary, que contém suberina que é depositada frequentemente nas lamelas médias do tecido da endoderme (Steudle & Peterson, 1998; Hose et al. 2001). Mudanças na suberização e a lignificação das paredes celulares das raízes são conhecidas por aumentarem com a exposição a estresses abióticos, como o osmótico, o hídrico e o estresse nutricional. Essa maior deposição de suberina e/ou lignina ajuda na melhor eficiência no uso da água pela planta em restrição hídrica (Lux et al. 2004; Kotula et al. 2009; Krishnamurthy et al. 2009; Ranathunge et al. 2011; Kreszies et al. 2019).

Recentemente, Darren et al. (2020) mostraram que há maior ou menor deposição de lignina e/ou suberina nas paredes celulares de raízes conforme as plantas foram expostas a diferentes condições de disponibilidade hídrica, assim como, a diferentes concentrações e formas de N. Em plantas que foram nutridas com doses suficientes de nitrato e com disponibilidade hídrica adequada houve uma menor deposição dessas substâncias nas paredes celulares. No entanto, quando as plantas foram expostas à restrição hídrica, mesmo nutridas com doses suficientes de nitrato, houve maior deposição desses compostos hidrofóbicos nas paredes celulares, dificultando o transporte apoplástico. Essa deposição foi aumentada quando as plantas foram submetidas ao tratamento de restrição hídrica e diminuição da concentração de nitrato, evidenciando que não só a deficiência hídrica, mas também a concentração de nitrato fornecida influencia na maior deposição de lignina e/ou suberina nas paredes celulares. Da mesma forma, quando o amônio foi oferecido em quantidade suficiente, observou-se que houve menor deposição, sendo aumentada apenas quando as plantas foram expostas ao tratamento de restrição hídrica. De modo intrigante, observou-se que com a diminuição da concentração de amônio, houve um aumento da condutividade hidráulica. Assim, foi possível verificar que a forma nítrica do N disponibilizada em menores concentrações pode ocasionar uma diminuiçãodo transporte de água, enquanto o NH4<sup>+</sup> em baixas concentrações pode ter um efeito contrário, auxiliando no melhor transporte de água. Logo, uma vez que o fluxo de água pela via apoplástica pode ser prejudicado por barreiras hidrofóbicas, dependendo da forma e concentração de N empregada, o  $NO_3^-$  nas concentrações empregadas nesta pesquisa pode ter causado uma diminuição do transporte de água entre a base e o ápice das folhas de G. monostachia em restrição hídrica.

Uma vez que o fluxo de água não consegue prosseguir continuamente pela via apoplástica, a condução deve seguir através da via simplástica, que possui grande resistência ao movimento da água (Tyerman et al. 1999). Segundo Raven et al. (2010), o caminho simplástico transporta água através das membranas celulares e também pelos plasmodesmos, que são estreitos filamentos de citoplasma que interligam os protoplastos celulares, formando um contínuo denominado simplasto. Ao longo do transporte percorrido de célula para célula, as aquaporinas e os plasmodesmos são responsáveis pela regulação da intensidade do fluxo de água e de solutos (Roberts & Oparka, 2003; Ranathunge et al. 2004; Tyerman et al, 2017).

Quando as plantas estão sob estresse hídrico, ambas as vias de fluxo, apoplástico e simplástico, são afetadas (Scoffoni et al. 2011) e as aquaporinas localizadas nas membranas plasmáticas podem reduzir a resistência e desempenhar um papel importante na regulação do movimento da água fora do xilema, principalmente em condição de estresse hídrico (Javot & Maurel, 2002; Buckley, 2015; Gambetta et al. 2017). Foi proposto por alguns pesquisadores que as aquaporinas podem ser reguladas por N na forma de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, o qual aumentaria a condutância hidráulica de raízes por meio de uma regulação positiva das aquaporinas ligadas à membrana plasmática (Wilkinson et al. 2007; Cramer et al. 2010).

Recentemente, houve progresso significativo no entendimento da regulação da condutividade hidráulica de raízes e aquaporinas ligadas à membrana plasmática sob diferentes tratamentos de NO3<sup>-</sup> no modelo Arabidopsis. Mostrou-se que tanto a transcrição dos genes de aquaporinas de membrana plasmática do tipo PIP1;1, PIP1;2, PIP2;1 e PIP2;3 aumentaram, quanto a abundância de proteínas PIP1 e PIP2 incrementaram, melhorando o fluxo simplástico de água (Li et al. 2016; Tyerman et al. 2017). Mais recentemente, Darren et al. (2020) confirmaram que a condução de água nas plantas pode ser afetada tanto pela forma quanto pela concentração de N e destacaram que a espécie vegetal também influencia. Por exemplo, em plantas de arroz (Oryza sativa), que têm preferência por amônio, a mudança de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> para NO<sub>3</sub><sup>-</sup> em seu cultivo resultou em repressão da expressão de certos genes de aquaporinas, como: OsPIP1;1, OsPIP2;3, OsTIP1;1 e OsTIP2;2 (Tyerman et al. 2017). Em outras pesquisas, também com arroz, os resultados evidenciaram que a nutrição com amônio aumentou a tolerância à seca das plantas quando comparada com a nutrição com nitrato (Guo et al. 2007; Li et al. 2009). Além disso, o N na forma de NH4<sup>+</sup> aumentou a expressão de aquaporinas e também houve uma maior condutividade hídrica nessa espécie (Gao et al. 2010; Yang et al. 2012; Ding et al. 2015).

Assim, sabendo-se que a espécie *G. monostachia* é semelhante ao arroz em termos de preferência por amônio e uréia (Gonçalves et al. 2020), e por termos oferecido N unicamente na forma de  $NO_3^-$  em concentrações menores àquelas usadas em trabalhos anteriores do grupo, hipotetizamos que houve menor condução de água da base para o ápice

foliar na condição de restrição hídrica em função do menor fluxo de água transportado pelas aquaporinas para a região apical, acarretando num maior conteúdo relativo de água na porção da base foliar em restrição hídrica.

Os dados obtidos de conteúdo relativo de água podem estar relacionados também com a diminuição do potencial osmótico nos ápices foliares, uma vez que a possível diminuição do transporte de água para os ápices pode ter gerado um menor potencial osmótico. Segundo Souza et al. (2012), o potencial osmótico das plantas é a principal variável que influencia na regulação do potencial hídrico. Nossos resultados corroboram com a pesquisa de mestrado feita por Mancilha em 2017, que observou diminuição do potencial hídrico sob condição de escassez hídrica nos ápices foliares de *G. monostachia*.

Segundo Akinci & Lösel (2019), o efeito do estresse hídrico pode causar redução do turgor celular, promover o fechamento estomático, diminuir a absorção de CO<sub>2</sub> minimizando a eficiência fotossintética, reduzir a absorção de água e nutrientes pela planta, bem como causar danos à integridade das membranas plasmáticas. Com relação à membrana plasmática, os dados de condutância específica de *G. monostachia* são inéditos e evidenciam que o vazamento de eletrólitos pode ser consequência de danos ocorridos nessas membranas, principalmente na condição de escassez hídrica associada com a deficiência de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,05mM de N total). A técnica que quantifica danos causados à integridade da membrana já foi usada em diversas plantas (Coursolle et al. 2000; Tamura 2000; Vainola e Repo 2000), sendo demonstrado que o vazamento de eletrólitos pode estar relacionadoa condições ambientais estressantes as quais as plantas foram expostas (Garty et al. 2000; Vainola & Repo 2000).

Os estresses ambientais, tais como, salinidade, radiação UV, metais pesados, temperaturas extremas, deficiência nutricional e seca também podem proporcionar o desequilíbrio entre a produção e a eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS, da sigla em inglês). Esses distúrbios podem levar ao aumento nos níveis intracelulares de ROS que podem causar danos significativos às estruturas celulares dos tecidos vegetais (Bhattachrjee, 2005). As ROS podem ter várias formas como,  $H_2O_2$  (peróxido de hidrogênio),  $HO_2^-$  (hidroperoxila), OH\* (hidroxila) e ROOH (hidroperóxidos), que são altamente reativas podendo tornarem-se tóxicas, caso suas concentrações não sejam equilibradas, podendo afetar muitas funções celulares, danificar e oxidar as proteínas e/ou lipídios.

A peroxidação lipídica pode causar danos irreversíveis, que em última instância, pode resultar em morte celular (Foyer & Noctor, 2005). O acúmulo de ROS, induzido por estresse, pode ser neutralizado por sistemas antioxidantes enzimáticos variados como, por exemplo, através da ação da superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APx), glutationa peroxidase (GPx), glutationa S-transferase (GST), catalase (CAT) e metabólitos não enzimáticos de baixo peso molecular, como o ácido ascórbico (ASH), a glutationa (GSH), o alfa-tocoferol, carotenóides, flavonóides e também a prolina (Mittler et al. 2004; Chen & Dickman, 2004; Gill et al. 2010).

Entre os danos que podem ser causados pelo desequilíbrio provocados pelas ROS, a peroxidação lipídica é um dos principais parâmetros usados para determinar o nível de destruição de lipídios das membranas. Os estresses não afetam somente os níveis normais de funcionamento celular, mas também podem agravar o estresse oxidativo através da produção de radicais derivados de lipídios, danificando as proteínas da membrana plasmática e de organelas, aumentando o vazamento de substâncias que normalmente não a atravessam e causando desestruturação das membranas celulares de modo geral (Montillet et al. 2005; Garg & Manchanda, 2009).

Nossa hipótese, então, propõe que o estresse hídrico, ao ser adicionado ao nutricional (0,05mM de N total), causou, provavelmente, um maior desequilíbrio entre as ROS e o sistema antioxidante de *G. monostachia*, propiciando um aumento da peroxidação dos lipídeos das membranas plasmáticas, danificando a integridade das mesmas e fazendo com que aumentasse o vazamento dos eletrólitos em maior quantidade nos ápices foliares das plantas cultivadas em deficiência de N. No entanto, esse efeito pode ter diminuído na concentração de 2,5mM de N total pela maior disponibilidade de nitrato que, provavelmente, auxiliou na redução da formação de ROS. Yilancioglu et al. (2014) observaram aumento na produção de ROS, bem como maior peroxidação lipídica na alga *Dunaliella salina* sob condições limitadas de disponibilidade de nitrogênio.

Em consonância com a explicação sobre os estresses hídrico e nutricional poderem ter aumentado as quantidades de ROS, já foi visto em outras pesquisas que o aminoácido prolina é reconhecidamente uma molécula multifuncional, acumulando em altas concentrações em resposta a uma variedade de estresses abióticos (Kishor & Sreenivasulu, 2014). A prolina pode estar relacionada à melhor estabilização de proteínas das membranas celulares em plantas submetidas ao estresse hídrico (Matysik, Alia & Mohanty 2002).

A prolina, ao ter seu teor endógeno aumentado, pode melhorar a tolerância aos estresses abióticos (Saradhi et al. 1995; Hare & Cress, 1997; Siripornadulsil et al. 2002; Kishor et al. 2005), por ter funções tanto de osmólito compatível quanto de eliminador de ROS, fornecendo proteção contra danos causados pela salinidade ou seca (Szabados & Savouré 2010; Natarajan et al. 2012). Dependendo da espécie vegetal, severidade e duração do estresse, as concentrações de prolina podem atingir o nível de mM, aumentando, portanto, várias vezes em relação ao seu teor normal de concentração endógena (Delauney & Verma, 1993). A prolina pode ser sintetizada na parte aérea e também nas raízes sob condições de estresse hídrico, mas também pode ser transportada pelo floema para a raiz por transportadores de prolina, como o ProT2. Altas concentrações de prolina já foram quantificadas no floema em plantas sob estresse hídrico (Lee et al. 2009).

Em relação ao perfil metabólico consonante aos nutrientes: nitrato, amônio, potássio e cálcio, foi verificado que as concentrações de  $NO_3^-$  diminuiuram em ambas as porções quando as plantas foram expostas à restrição hídrica. A entrada e uso do N pela planta envolvem os processos de absorção e assimilação (Huang *et al.* 2017; Weih *et al.* 2018). Uma vez absorvido, o nitrato pode ser utilizado pela a enzima redutase do nitrato (RN) que reduz o  $NO_3^-$  a nitrito ( $NO_2^-$ ). Em seguida, a redutase de nitrito (RNi) reduz esse último a  $NH_4^+$ . O amônio pode ser, então, incorporado em aminoácidos por duas enzimas, a glutamina sintetase (GS) e a glutamato sintase (GOGAT) (Hachiya et al. 2007).

De modo interessante, as concentrações endógenas de amônio em restrição hídrica foram maiores que as de nitrato nas duas porções foliares de *G. monostachia* com aumento significativo nos ápices das plantas tratadas com a maior disponibilidade de N. A maior concentração de amônio pode ser decorrente de uma intensa redução de nitrato a amônio pela ação das enzimas RN e RNi na porção basal foliar. Trabalhos do grupo já evidenciaram que há um predomínio da atividade da enzima NR nas bases foliares de *G. monostachia* e, ao contrário, uma maior atividade da enzima GS nos ápices foliares. Já o aumento de amônio nos ápices das bromélias que foram nutridas com uma maior concentração de nitrato, pode ter ocorrido pelo fato da enzima GS ter sofrido algum tipo de restrição provocada pela escassez hídrica, não dando sequência ao ciclo GS/GOGAT e, consequentemente, não formando aminoácidos e acúmulando  $NH_4^+$  nos ápices.

Além da quantificação endógena de N nas formas de  $NO_3^-$  e  $NH_4^+$ , foram dosados os macronutrientes  $Ca^{2+}$  e K<sup>+</sup>. A quantificação endógena de K<sup>+</sup> em especial foi feita a priori para investigar se o N na forma de  $NO_3^-$  poderia auxiliar na maior absorção de K<sup>+</sup> em *G. monostachia*, como visto por Wang et al. (2012) e Rubio et al. (2014). Esses autores observaram que a absorção de nitrato intensificou a captação líquida de potássio, pois o  $NO_3^$ funcionou como um carregador móvel de K<sup>+</sup>, durante o transporte e absorção de  $NO_3^-$ . Além disso, o fornecimento de  $NO_3^-$  poderia regular positivamente a expressão de genes transportadores de K<sup>+</sup> em algumas espécies, o que apoiava fortemente a possibilidade da existência de uma coregulação em nível de transporte entre  $NO_3^-$  e K<sup>+</sup> em *G. monostachia*.

Assim, inicialmente, hipotetizamos que uma maior concentração de nitrato fornecida às bromélias poderia auxiliar na maior absorção de potássio e que, por sua vez, poderia melhorar a eficiência no uso da água de *G. monostachia*, pois se trata de um nutriente com propriedades osmorreguladoras que poderia contribuir no ajuste osmótico em situação de restrição hídrica. No entanto, isso não pôde ser confirmado nas condições empregadas e com os métodos utilizados, uma vez que nas diferentes concentrações de nitrato oferecidas a quantidade endógena de potássio foi semelhante, mesmo em restrição hídrica.

De maneira interessante, os macronutrientes  $K^+$  e Ca<sup>2+</sup> tiveram maior acúmulo nas bases foliares em resposta à restrição hídrica. Esses dois nutrientes exercem papel importante como elementos nutricionais osmoticamente ativos que influenciam no ajuste osmótico, podendo baixar o potencial osmótico dos tecidos foliares da região basal, onde, provavelmente, ocorre a absorção de água e outros nutrientes (Upadhyaya et al. 2011; Shabala & Pottosin, 2010).

Segundo Hadi & Karimi (2012), além do cálcio ter propriedades osmóticas, ele também desempenha importante papel em termos estruturais e fisiológicos nas plantas, como manter a estabilidade das paredes celulares, membranas celulares e de proteínas de membrana. Além disso, há também vários processos fisiológicos e moleculares que são mediados por Ca<sup>2+</sup> nas plantas, incluindo divisão e diferenciação celular, polaridade celular, fotomorfogênese, bem como respostas aos estresses e defesa da planta. O cálcio tem propriedades únicas e a capacidade universal de transmitir diversos sinais, portanto, serve

como um importante mensageiro secundário, podendo desencadear respostas fisiológicas nas células após exposição a estímulos ambientais como, por exemplo, as restrições hídrica e nutricional.

Liu et al. (2018) mostraram que a deficiência hídrica ou o estresse osmótico podem causar tensões na membrana plasmática, que são detectadas pelas proteínas de membrana do tipo OSCA1. Essas se referem a canais de cálcio que permitem a abertura do poro e entrada de Ca<sup>2+</sup> na célula. O aumento da concentração de Ca<sup>2+</sup> intracelular é decodificado e o sinal é transmitido por proteínas sensoras de cálcio, como as proteínas semelhantes à calcineurina B (CBLs) e proteínas cinases dependentes de cálcio (CDPKs). As CBLs interagem com um grupo específico de proteínas cinases, designadas proteínas cinases de interação com CBL (CIPKs) que desempenham funções essenciais (Cheong et al. 2010). Umas dessas funções é a ativação da CIPK23 (uma proteína cinase) pelos sensores de cálcio CBL1 e CBL2 que auxiliam a CIPK23 a formar o complexo CBL / CIPK23 que, por sua vez, fosforila, regula e ativa os transportadores de outros nutrientes na membrana plasmática, aumentando o influxo de diversos nutrientes, como K<sup>+</sup> e NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Behera et al. 2017).

Foi identificado que as proteínas sensoras de  $Ca^{2+}$ , CBL1 e CBL9, junto com sua cinase de interação, são necessárias para ativação do canal de absorção de K<sup>+</sup> (AKT1) em Arabidopsis (Xu et al. 2006). Segundo Ragel et al. (2015) e Manishankar et al. (2017), a cinase CIPK23 pode desempenhar também um papel multifuncional que, frequentemente, opera em conjunto com os sensores de  $Ca^{2+}$ , CBL1 e / ou CBL9, que no caso da nutrição de K<sup>+</sup>, pode regular tanto o canal de baixa afinidade de absorção de K<sup>+</sup> (AKT1) quanto o de alta afinidade de K<sup>+</sup> (HAK5). O mesmo complexo de cinases dependente de  $Ca^{2+}$ , CBL1 / 9-CIPK23 pode modular a absorção de nitrogênio através da fosforilação do carregador de nitrato NPF6.3 / NRT1.1, podendo também alterar a afinidade do sensor para alta ou baixa afinidade em resposta à disponibilidade de nitrato (Ho et al. 2009).

Assim, hipotetizamos que o aumento das concentrações endógenas de  $Ca^{2+} e K^+$ nas bases foliares em restrição hídrica pode estar envolvido tanto com o ajuste osmótico, influenciando na melhor hidratação celular, quanto com o mecanismo de sensibilidade e adaptação da planta ao estresse hídrico. A entrada de  $Ca^{2+}$  através de OSCA1, quando as plantas estavam sob déficit hídrico, pode ter influenciado positivamente as absorções de K<sup>+</sup> e também do próprio NO<sub>3</sub><sup>-</sup> quando este foi oferecido na concentração de 2,5 mM de N total. É provável que uma remobilização de cálcio e potássio aconteça na parede celular, permitindo aumentar o influxo desses nutrientes para o citossol.

Com auxílio do banco de dados das sequências gênicas obtidas de *G. monostachia* no transcriptoma, realizado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (Mercier et al. 2019), pode ser verificado que houve uma maior expressão dos genes *OSCA1* e *HAK5* nas bases foliares em restrição hídrica (Fig. 11 - heatmap) em comparação com o ápice foliar, sugerindo que a resposta de aumento da concentração de K<sup>+</sup> pode ser decorrente do estresse hídrico e não da absorção do  $NO_3^-$ . Já o ápice foliar não apresentou aumento da expressão do *OSCA1* e nem do transportador de alta afinidade de K<sup>+</sup>. Ao contrário, mostrou uma maior expressão do gene AKT1 (transportador de potássio de baixa afinidade) (Fig. 11).

As concentrações de  $NO_3^-$  também podem ter influenciado as respostas relativas à indução da fotossíntese do tipo CAM sob efeito do estresse hídrico, uma vez que o maior acúmulo noturno de malato foi encontrado nos ápices foliares das bromélias que foram expostas a 2,5mM de N total. Esse resultado não era o esperado, tendo em vista que trabalhos anteriores do grupo tinham identificado que o nitrato na concentração de 5mM de N total na forma nítrica atrasou ou inibiu a indução do CAM em folhas de G. monostachia. Entretanto, para outras plantas que realizam a fotossíntese CAM (obrigatória ou facultativamente), a influência do NO<sub>3</sub><sup>-</sup> foi vista como positiva na expressão desse metabolismo (Winter et al. 1982; Ota, 1988; Pereira et al. 2018). Foi observado, por exemplo, que para plantas de Kalanchoë blossfeldiana que cresceram com concentrações menores que 1 mM de N nas formas de NO<sub>3</sub> ou de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> apesar de terem as mesmas taxas de crescimento, apresentaram maior captação noturna de CO<sub>2</sub> e conteúdo noturno de malato na presença de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Ota, 1988). Em outro estudo realizado com essa mesma espécie, foi encontrado um aumento de três vezes no delta de malato após dois meses de cultivo nessa fonte de N, e um aumento de cinco vezes após quatro meses na presença de 10 mM de N na forma de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> se comparada com 10 mM de N na forma de  $NH_4^+$  (Ota, 1988).

Pereira et al. 2017 verificaram que na concentração de 2,5mM de N na forma de nitrato houve maior acúmulo noturno de malato e maior transporte de prótons para o vacúolo em duas espécies de CAM obrigatórias: *Kalanchoë laxiflora* e *Kalanchoë delagoensis*. Mas, quando essas mesmas espécies foram nutridas com 5,0 mM de N (forma nítrica) houve uma diminuição no acúmulo noturno de ácidos orgânicos totais (malato + fumarato + citrato).

Portanto, sugere-se que a indução do CAM é dependente da concentração de  $NO_3^-$  oferecida às plantas. Segundo Ota (1988), o nitrato é conhecido por inibir a atividade da enzima V-ATPase, que juntamente com a V-PPiase são responsáveis pelo transporte de prótons e ácidos orgânicos para o vacúolo. Pereira et al. (2018) demonstraram para a espécie *G. monostachia* que quando as plantas foram cultivadas na presença de  $NO_3^-$  em concentração de 5,0 mM de N e exposta ao estresse de déficit hídrico, não houve a passagem de C<sub>3</sub> para CAM em comparação com as plantas cultivadas na presença de  $NH_4^+$  em 5,0 mM de N e na mesma condição de escassez hídrica. No entanto, de modo interessante, quando a concentração de N na forma de nitrato foi reduzida para 2,5mM de N foi observado um aumento atividade da PEPC se comparada a essa mesma concentração de N, mas na forma amoniacal e em restrição hídrica (Pereira et al. 2018). Inesperadamente em nossa pesquisa, não conseguimos observar diferenças significativas tanto na expressão do gene *PEPC1* quanto na atividade da enzima PEPC.

Assim, nosso resultado de indução do CAM na presença de nitrato (2,5mM de N total), resultando no aumento do acúmulo noturno de malato em restrição hídrica poderia ser uma resposta dependente de concentração e que nunca havia sido detectada antes da presente investigação com *G. monostachia*. Entretanto, podemos sugerir fortemente, tendo em vista os níveis de acidez noturna registrados comparativamente aos dados que já foram obtidos anteriormente pelo grupo, que as plantas de *G. monostachia* sob restrição hídrica modificaram sua fotossíntese, passando de C<sub>3</sub> para CAM.



Figura 11. Esquema representativo das principais hipóteses do trabalho, levando-se em consideração os resultados obtidos para o cultivo das plantas de Guzmania monostachia em 2,5mM de N na forma de nitrato com posterior efeito da escassez hídrica por sete dias. Ao lado esquerdo da figura está apresentado um *heatmap* cujos resultados de expressão gênica foram obtidos a partir do transcriptoma de Guzmania monostachia (Mercier et al. 2019). Acima do *heatmap* está a "régua" de expressão cuja cor mais próxima ao azul representa uma menor expressão comparativamente à cor vermelha, a qual indica uma maior expressão. Os dados mostram a expressão (o log2 (fold-change)) dos genes PEPC1 (fosfoenolpiruvato carboxilase), HAK5 (transportador de alta afinidade de potássio), AKT1 (canal de baixa afinidade de potássio), CIPK23 (cinase dependente de cálcio), CBL3 (proteínas sensoras de cálcio), CBL1 (proteínas sensoras de cálcio), OSCA1 (canal de cálcio) de plantas cultivadas na presença de nutrientes (incluindo 5mM de N) e que sofreram estresse hídrico por sete dias. A folha foi representada subdividida entre as porções apical e basal e os principais resultados foram indicados com setas que ilustram a comparação entre essas porções (setas para cima significam aumento e setas para baixo, diminuição dos valores). Do lado direito, está representada uma ampliação de uma célula da base foliar mostrando uma das principais hipóteses do trabalho: o canal de cálcio, OSCA1, sendo ativado pela escassez hídrica, iniciando o processo de absorção. Uma possível remobilização de K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> da parede celular foi indicada. Esse aumento na concentração citossólica de Ca2+ sinalizaria as proteínas

sensoras de cálcio do tipo CBL, as quais se unem a proteínas cinases dependentes de cálcio (CIPKs), formando o complexo CBL-CIPK que pode fosforilar e ativar os transportadores de alta (HAK5) e baixa afinidade de potássio (AKT1). Sabe-se que esse complexo pode influenciar também a atividade de outros transportadores nutricionais, como os de nitrato (NRT1).

# Conclusões

A restrição hídrica, após as plantas serem nutridas com N unicamente na forma de nitrato, causou mudanças significativas no perfil metabólico das folhas de Guzmania monostachia, alem de alterar o status hídrico. A porção apical foliar foi a mais afetada pelos 7 dias sem suplementação de água no tanque, em relação ao conteúdo relativo de água, resultado esse confirmado pelos valores mais baixos de potencial osmótico medidos nessa região. A condutividade específica aumentou cerca de duas vezes em relação aos tecidos hidratados e o fornecimento de nitrato (2,5mM de N total) pareceu aliviar significativamente o estresse hídrico, por, talvez, diminuir as ROS nos ápices, causando menos danos às membranas plasmáticas. O transporte de água da porção basal para a apical, pelas vias apoplástica e simplástica, parece ter sido afetado. Supõe-se que a deposição de lignina e/ou suberina aumentou nas paredes celulares e/ou a indução de aquaporinas diminuiu quando as plantas foram cultivadas na presença de nitrato (2,5mM N total), anteriormente à aplicação da restrição hídrica. O nitrato, após ser absorvido pelos tricomas da base, pode ter sido reduzido a amônio pela enzima nitrato redutase. Entretanto, este parece não ter prosseguido na sua rota de assimilação via GS/GOGAT, localizada predominantemente no ápice, durante o período de seca, acumulando-se no ápice. Por sua vez, o nível de cálcio endógeno aumentou na base, provavelmente, pela ação do canal de entrada OSCA1 que é responsivo à seca. Esse incremento pode ter se originado pela remobilização de cálcio da parede celular. Este, por sua vez, pode ter sinalizado positivamente a entrada de potássio nas células basais por meio da estimulação dos transportadores de alta afinidade (HAK5). O estresse hídrico induziu também aumento significativo na concentração de malato e houve uma forte tendência de acúmulo noturno de ácidos orgânicos, principalmente nos ápices das folhas cultivadas em 2,5mM de N total na forma de NO3, sugerindo que as folhas mudaram sua fotossíntese de C3 para CAM.

#### Resumo

Durante o desenvolvimento das bromélias epífitas, em seu ambiente natural, elas podem ser expostas a vários estresses ambientais. Entre os tipos de estresses abióticos, o hídrico é um dos mais severos, podendo afetar principalmente as epífitas que normalmente não estão em contato direto com o solo. Ao longo da evolução, surgiram e foram selecionados mecanismos morfo-fisiológicos específicos que permitiram a essas plantas adaptarem-se e sobreviverem a eventos de escassez hídrica intermitentes. A bromélia Guzmania monostachia (L.) Rusby ex Mez. é uma planta epífita com tanque que possui facultatividade em relação à sua fotossíntese, podendo variar de C<sub>3</sub> para CAM dependendo das condições ambientais. Além disso, suas folhas apresentam regiões com funcionalidades bem distintas: a porção apical tem funções mais relacionadas à fotossíntese enquanto a porção basal absorve nutrientes. Em estudos anteriores, foi averiguado que a fonte de N pode afetar a indução do CAM quando as plantas estão submetidas à escassez hídrica. Observou-se que a forma amoniacal aumentou a expressão do CAM, enquanto a nítrica reduziu. Em decorrência desse intrigante resultado de inibição do CAM pela nutrição com nitrato, surgiram novos questionamentos para a realização do presente estudo: qual seria o modo de ação do nitrato combinado à escassez hídrica sobre a fotossíntese CAM? Estaria a absorção de nitrato influenciando a absorção de outros nutrientes (p.ex., potássio) quando a planta está sujeita à limitação hídrica, fazendo com que houvesse mudanças no perfil metabólico e status hídrico das folhas? Foi descrito para algumas espécies que a absorção de nitrato pode estar associada com a de potássio, auxiliando o equilíbrio de cargas dentro da célula, também regulando a expressão de genes transportadores de  $K^+$ . Logo, hipotetizamos no presente estudo que G. monostachia que recebessem maiores concentrações de NO3<sup>-</sup> no tanque teriam incrementos significativos de potássio endógeno. A absorção conjunta desses nutrientes permitiria o ajuste osmótico das plantas, acarretando a redução do potencial hídrico e favorecendo a absorção de água a partir do tanque ou sua manutenção no interior das células foliares. Assim, como consequência de um melhor status hídrico, mesmo após a aplicação de sete dias de escassez de água, haveria um atraso ou até mesmo inibição da passagem do metabolismo C<sub>3</sub> para o CAM. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivos (1) caracterizar as mudanças no perfil metabólico e no status hídrico das folhas, comparando-se as porções apical e basal de plantas de G. monostachia que foram cultivadas na presença de nitrato previamente à aplicação do estresse hídrico; e (2) compreender o efeito do nitrato sobre a modulação do CAM nos ápices foliares. Para tanto, as plantas foram cultivas em câmara de crescimento com condições ambientais controladas sendo apenas regadas diariamente com água destilada nos tanques durante o período de aclimatação (30 dias). Após isso, as plantas receberam nitrato compreendendo dois tratamentos (0,05 ou 2,5mM de N total na forma de nitrato). Ao final de 30 dias, as bromélias foram submetidas à restrição hídrica durante sete dias, esvaziando-se seus tanques. Os resultados demontraram que houve mudanças significativas no perfil metabólico das plantas cultivadas com 2,5mM de N total na forma de nitrato sob estresse hídrico, resultando em bases foliares com maior conteúdo relativo de água e maior acúmulo dos nutrientes K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup>. Por outro lado, os ápices sob essa mesma condição apresentaram dimunuição do seu potencial osmótico, menor conteúdo relativo de água e maior acúmulo de NH4<sup>+</sup>. O estresse hídrico induziu também aumento significativo na concentração de malato e houve uma forte tendência de acúmulo noturno de ácidos orgânicos, principalmente nos ápices das folhas cultivadas na maior conentração de N, sugerindo que as folhas mudaram sua fotossíntese de C3 para CAM. A maior concentração oferecida de nitrato em restrição hídrica proporcionou um menor transporte de água da base foliar para o ápice, possivelmente pela maior lignificação e/ou suberização das paredes celulares (via apoplástica), diminuindo assim o potencial osmótico do ápice foliar. Ao mesmo tempo, a deficiência hídrica pode ter ativado o canal de membrana responsivo à seca (OSCA1), responsável pelo aumento da absorção de Ca<sup>2+</sup> na base foliar. Uma maior quantidade de Ca<sup>2+</sup> citossólico pode ter levado a uma regulação positiva do complexo protéico CBL/CIPK, aumentando assim a absorção de outros nutrientes, como o K<sup>+</sup>, por meio da indução de transportadores de alta afinidade desse nutriente (HAK5). O K<sup>+</sup>, por sua vez, pode ter funcionado como um osmólito, ajudando na retenção da água nos tecidos basais foliares. Assim, observamos nesta pesquisa que o status hídrico e o perfil metabólico de G. monostachia podem ser modulados pela absorção do nitrato, interferindo na passagem da fotossíntese C3 para CAM sob efeito da deficiência hídrica.

### Abstract

During the development of epiphytic bromeliads, they can be exposed to numerous environmental stresses. Among the abiotic stresses, water is one of the most severe, affecting mainly epiphytes because they are not in direct contact with the soil. Throughout evolution, specific morphophysiological mechanisms that allowed these plants to adapt and survive to intermittent water scarcity events emerged and were selected. The bromeliad Guzmania monostachia, for example, is an epiphytic plant with a tank that has facultative photosynthesis which can vary from  $C_3$  to CAM depending on the environmental conditions. Its leaves have regions with very different functions: while the apical portion is related to photosynthesis, the basal portion absorbs nutrients. In previous studies, it was found that the source of N can affect the induction of CAM when plants were under water scarcity. It was observed that the ammonium increased CAM expression, while nitrate reduced it. As a result of this intriguing CAM inhibition by nitrate, new questions arose for the conduction of this study: what would be the action of nitrate combined with water scarcity on CAM photosynthesis? Is nitrate uptake influencing the uptake of other nutrients (e.g., potassium) when the plant is waterlimited, causing changes in the metabolic profile and water status of the leaves? It has been described for some species that nitrate uptake may be associated with potassium uptake, helping charge balance within the cell, also regulating the expression of  $K^+$  transporter genes. Therefore, we hypothesized in the present study that G. monostachia that received higher concentrations of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> would have significant increases in endogenous potassium. The joint absorption of these nutrients would allow the osmotic adjustment of the plants, reducing the water potential and favoring the absorption of water from the tank or its maintenance inside the leaf cells. As a consequence of better water status, there would be a delay or even inhibition of the CAM even after the application of seven days of water scarcity. In this context, the present work aimed to (1) characterize the changes in the metabolic profile and water status of G. monostachia leaves, comparing the apical and basal portions that were cultivated in the presence of nitrate before the application of water stress; and (2) evaluate the effect of nitrate on CAM modulation in leaf apexes. For that, the plants were cultivated in a growth chamber with controlled environmental conditions, being only watered daily with distilled water during the acclimation period (30 days). After that, the plants received two treatments of nitrate (0.05 or 2.5mM of total N). At the end of 30 days, the bromeliads were subjected to water restriction for seven days. The results showed that there were significant changes in the metabolic profile of plants grown with 2.5 mM of total N in the form of nitrate under water stress, resulting in leaf bases with higher relative water content and higher accumulation of  $K^+$  and  $Ca^{2+}$ . On the other hand, the apex under this same condition presented decreased osmotic potential, lower relative water content, and greater accumulation of  $NH_4^+$ . Water stress also induced a significant increase in malate concentration and there was a strong tendency for nocturnal accumulation of organic acids, especially in the apical leaf portion cultivated in the highest concentration of N, suggesting that the leaves changed their photosynthesis from C<sub>3</sub> to CAM. The higher concentration of nitrate offered previously to water restriction provided less water translocation from the leaf base to the apex, possibly due to greater lignification and/or suberization of cell walls (apoplastic pathway), decreasing the osmotic potential of the leaf apex. At the same time, water deficit may have activated the drought-responsive membrane channel (OSCA1), responsible for the increased absorption of  $Ca^{2+}$  at the leaf base. A greater amount of cytosolic  $Ca_{2}^{+}$  may have led to an up-regulation of the CBL/CIPK protein complex, increasing the absorption of other nutrients, such as K<sup>+</sup> through the induction of high-affinity transporters of this nutrient (HAK5). In turn, K<sup>+</sup> may have acted as an osmolyte, helping to retain water in the leaf's basal tissues. Thus, we observed in this research that the water status and metabolic profile of G. monostachia can be modulated by the absorption of nitrate, interfering in the modulation of C<sub>3</sub> to CAM photosynthesis under water deficit.

- Abbasi, T. & Abbasi, S. (2010). Biomass energy and the environmental impacts associated with its production and utilization. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 14; p. 919–937.
- Véry, A. & Sentenac, H. (2003). Molecular mechanisms and regulation of K+ transport in higher plants. *Annu Rev Plant Biol.* 54; p. 575–603.
- Maathuis, F. & Sanders, D. (1997) Regulation of K+ absorption in plant root cells by external K+: interplay of different plasma membrane K+ transporters. *J Exp Bot.* 48; p. 451–458.
- Abrahamczyk, S. & Kessler M. (2015). Morphological and behavioural adaptations to feed on nectar: how feeding ecology determines the diversity and composition of hummingbird assemblages. Journal of Ornithology, 156; p. 333–347.
- Ahmad, I. & Maathuis, F. J. (2014). Cellular and tissue distribution of potassium: physiological relevance, mechanisms and regulation. J. Plant Physiol, 171; p. 708– 714. doi: 10.1016/j.jplph.2013.10.016.
- Akinci, S. & Lösel D. (2019). Effects of water stress and recovery periods on total lipid and fatty acids in cucumis melo var. flexuosus (l.) naudin and related species. Pak. J. Bot., 51; p. 845-854.
- Alia, P. & Saradhi, P. (1991). Proline accumulation under heavy-metal stress. Journal of Plant Physiology, 138; p. 554–558.
- Allen, G., Chu, S., Harrington, C., Schumacher, K., Hoffmann, T., Tang, Y., Grill, E., Schroeder, J. (2001). A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. Nature, 411; p. 1053–1057.

- Alzahrani, Y., Kusvuran, A., Alharby, H., Kusvuran, S., Rady, M. (2018). The defensive role of silicon in wheat against stress conditions induced by drought, salinity or cadmium. Ecotoxicology and Environmental Safety, 154; p. 187–196.
- Aroca, R., Porcel, R., Ruiz-Lozano, J. M. (2012). Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions. J. Exp. Bot, 63; p. 43–57. doi: 10.1093/jxb/err266.
- Asgharipour, M. & Heidari, M. (2011). Effect of potassium supply on drought resistance in sorghum: Plant growth and macronutrient content. Pakistan Journal of Agricultural Sciences, 48; p. 197–204.
- Ashraf, M. & Harris, P. (2004). Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. Plant Sci, 166; p. 3–16.
- Aslam, M., Travis, R., Huffaker, R. (1992). Comparative kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in roots of uninduced and induced barley (Hordeum vulgare L.) seedlings. Plant Physiology, Lancaster, 99; p. 1124-1133.
- Aslam, M., Zamir, M., Afzal, I., Yaseen, M. (2013). Morphological and physiological response of maize hybrids to potassium application under drought. Journal of Agricultural Research, 51; p. 443–454.
- Ayadi, M., Brini, F., Masmoudi, K. (2019). Overexpression of a wheat aquaporin gene, TdPIP2;1, enhances salt and drought tolerance in transgenic durum wheat cv. Maali. International Journal of Molecular Sciences, 20; p. 23-89.
- Bañuelos, M., Garciadeblas, B., Cubero, B., Rodriguez, N. (2002). Inventory and functional characterization of the HAK potassium transporters of rice. Plant Physiology, 130; p. 784-795.
- Banuelos, M., Garcia D., Cubero, B., Odriguez N. (2002). Inventory and Functional Characterization of the HAK Potassium Transporters of Rice. Plant Physiology, 130; p. 784-795.
- Barathi, P., Sundar, D., Reddy, A.R. (2001). Changes in mulberry leaf metabolism in response to water stress Biol. Plant, 44; p. 83-87.

- Basu, S., Ramegowda, V., Kumar, A., Pereira, A. (2016). Adaptação da planta ao estresse hídrico. F1000 Research, 5; p.1-10.
- Behera, S., Long, Y., Schmitz, T., Wang, X., Zhang, C., Li, H., Steinhorst, L., Manishankar, P., Ren, X., Offenborn, J., Wu, W., Kudla, J., Wang, Y., (2017). Two spatially and temporally distinct Ca2+ signals convey Arabidopsis thaliana responses to K+ deficiency. New Phytol, 213; p. 739–750. https://doi.org/10.1111/ nph.14145.
- Benzing, D. (2000). Bromeliaceae: profile of in adaptative radiation. Cambridge.Cambridge University.
- Bernards, M. (2002). Demystifying suberin Can. J. Bot., 80; p. 227-240.
- Bhattacharjee, S. (2005). Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. Current Science Association, 89; p. 1113-1121.
- Blum, A. (2017). Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. Plant, Cell and Environment, 40; p. 4-10.
- Borland, A., Zambrano, V., Ceusters, J., Shorrock, K. (2011). The photosynthetic plasticity of Crassulacean acid metabolism: an evolutionary innovation for sustainable productivity in a changing world. New Phytologist, 191; p. 619-633.
- Bouchareb, R. (2008). The extent of the balance of nucleic and amino acids in durum wheat (Triticum durum Desf) grown under saline conditions. Master's thesis, University of Mentouri, Constantinople, Algeria.
- Britto, D. & Kronzucker, H. (2008). Cellular mechanisms of potassium transport in plants. Physiologia Plantarum, 133; p. 637–650.
- Brodersen, C., Roddy, A., Wason, J., McElrone, A. (2019). Functional status of xylem through time. Annu. Rev. Plant Biol, 70; p. 407–433.
- Buckley, T. (2015). The contributions of apoplastic, symplastic and gas phase pathways for water transport outside the bundle sheath in leaves. Plant Cell Environ, 38; p. 7–22. doi: 10.1111/pce.12372.

- Cakmak, I. (2005). The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. Jornal of Plant Nutrition and Soil Science, 168; p. 521-530.
- Carillo, P., Danila, P., Pasqualina, W., Giovanni, P., Giuseppina, M., Maria, G., Amodio F., Ronan S. (2011). Salt-induced accumulation of glycine betaine is inhibited by high light in durum wheat. Functional Plant, 38; p. 139-150.
- Castillo, R., Cervera, C., Navarro, A. (2016). Drought and extreme temperature tolerance for Tillandsia dasylyriifolia, an epiphytic bromeliad from the northern coastal dune scrubland in Yucatan, Mexico. Botanical Sciences, 94; p. 121-126.
- Chen, C. & Dickman, M. (2005). A prolina suprime a apoptose no fungo patógeno Colletotrichum trifolii. *Proceedings of the National Academy of Sciences dos Estados Unidos da América*, 102; p. 3459–3464. https://doi.org/10.1073/pnas.0407960102.
- Chen, W., Yao, X., Cai, K., Chen, J. (2011). Silicon alleviates drought stress of rice plants by improving plant water status, photosynthesis and mineral nutrient absorption. Biological Trace Element Research, 142; p. 67–76.
- Cheong, Y., Pandey, G., Grant, J., Batistic, O., Li, L., Kim, B., Lee, S., Kudla, J., Luan, S. (2007). Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase
  CIPK23, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in Arabidopsis. Plant J., 52; p. 223–239. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03236.x.
- Cheong, Y., Sung, S., Kim, B. (2010). Constitutive overexpression of the calcium sensor CBL5 confers osmotic or drought stress tolerance in *Arabidopsis*. Mol Cells, 29; p. 159–165.
- Cherel, I., Lefoulon, C., Boeglin, M., Sentenac, H. (2014). Molecular mechanisms involved in plant adaptation to low K (+) availability. J. Exp. Bot., 65; p. 833–848. doi: 10.1093/jxb/ert402.
- Cordeiro, L. & Kerbauy, G. (2004). Fisiologia Vegetal. Primeira edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ; p. 73-93.

- Coursolle, C., Francine, J., Hank, A. (2000). Assessment of Root Freezing Damage of Twoyear-old White Spruce, Black Spruce and Jack Pine Seedlings. Scandinavian Journal of Forest Research, 15; p. 343-353.
- Cramer, G. (2010). Abiotic stress & plant responses from the whole vine to the genes. Aust. J. Grape Wine Res, 16; p. 86-93.
- Cushman, J. & Borland, A. (2002). Induction of Crassulacean acid metabolism by water limitation. Plant, Cell and Environment, 25; p. 295-310.
- Cushman, J. (2001). Crassulacean acid metabolism. A plastic photosynthetic adaptation to arid environments. Plant Physiology, 127; p. 1439-1448.
- Darren, W., Stefano, L., Angela, C. (2020). Aquaporin-driven hydrogen peroxide transport: a case of molecular mimicry? RSC Chem. Biol, 1; p. 390-394.
- Delauney, A. & Verma, D. (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. The Plant Journal, 4; p. 215–223.
- Delgado, B., Maestre, F., Gallardol, A., Bowker, M., Wallenstein, M., Quero, J., Ochoa, V., Gozalo, B., Garcia, G., Soliveres, S., et al. (2013). Decoupling of soil nutrient cycles as a function of aridity in global drylands. Nature, 502; p. 672.
- Dimkpa, C., Bindraban, P., Fugice, J., Agyin, B., Singh, U., Hellums, D. (2017). Composite micronutrient nanoparticles and salts decrease drought stress in soybean. Agronomy for Sustainable Development, 37; p. 5.
- Ding, L., Gao, C., Li, Y., Li, Y., Zhu, Y., Xu, G., et al. (2015). The enhanced drought tolerance of rice plants under ammonium is related to aquaporin (AQP). Plant Sci, 234; p. 14–21. doi: 10.1016/j.plantsci.2015.01.016.
- Dinneny, J., Long, T., Wang, J., Jung, J., Mace, D., Pointer, S., Barron, C., Brady, S., Schiefelbein, J., Benfey, P. (2008). Cell identity mediates the response of Arabidopsis roots to abiotic stress. Science, 320; p. 942-945. 10.1126/science.1153795.
- Dioceni, M. (2017). Respostas à deficiência hídrica relacionadas à ontogenia foliar em Guzmania monostachia (Bromeliaceae): variações do potencial hídrico e expressão de

diferentes padrões do Metabolismo Ácido das Crassuláceas (CAM). Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

- Eakes, D., Wright, R., Seiler, J. (1991). Water Relations of Salvia splendens `Bonfire' as Influenced by Potassium Nutrition and Moisture Stress Conditioning, Journal of the American Society for Horticultural Science jashs, 116; p. 712-715.
- Egilla, J., Davies, F., Drew, M. (2001). Effect of potassium on drought resistance of Hibiscus rosa-sinensis cv. Leprechaun: Plant growth, leaf macro- and micronutrient content and root longevity. Plant and Soil, 229; p. 213–224.
- Enstone, D., Peterson, C., Ma, F. (2002). Root endodermis and exodermis: structure, function, and responses to the environment J. Plant Growth Regul, 21; p. 335-351, 10.1007/s00344-003-0002-2.
- Epstein, E., Rains, D., Elzam, O. (1963). Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 49; p. 684–692.
- Epstein, E. & Bloom, A. (2006). Nutrição Mineral de plantas. Princípios e Perspectivas. Brasil: Editora Planta, 2; p. 403.
- Evans, H. & Wildes, R. (1971). Potassium and its role in enzyme activation. In Proc. Colloq. Int. Potash Inst. Bern, 8; p. 13–39.
- Foyer, C. & Wilson, M. (2018). Wright Redox regulation of cell proliferation: Bioinformatics and redox proteomics approaches to identify redox-sensitive cell cycle regulators Free Radic. Biol. Med, 122; p. 137-149.
- Foyer, C. (2020). Making sense of hydrogen peroxide signals Plant Biol, 578; p. 518-519.
- Foyer, C. & Graham, N. (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. Plant, Cell & Environment, 28; p. 1056-1071.

- Freschi, L. & Mercier, H. (2012). Connecting environmental stimuli and crassulacean acid metabolism expression: phytohormones and other signaling molecules. D. Francis (Ed.), Progress in botany, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg; p. 231-255.
- Freschi, L., Takahashi, C., Cambui, C., Cruz, T., Mioto, P., Versieux, L., Calvente, A., Latansio, Aidar, A. (2010). Specific leaf areas of the tank bromeliad Guzmania monostachia perform distinct functions in response to water shortage. J Plant Physiol.
- Freschi, L., Rodrigues, M., Domingues, D., Purgatto, E., Sylus, V., Magalhães, J. (2010b). Nitric oxide mediates the hormonal control of crassulacean acid metabolism expression in young pineapple plants. Plant Physiology.
- Fujita, M., Fijita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka Y., Yamaguchi, S., Shinozaki, K. (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: A current view from the points of convergence in the stress signaling networks. Curr. Opin. Plant Biol, 9; p. 436–442. doi: 10.1016/j.pbi.2006.05.014.
- Gambetta, G., Knipfer, T., Fricke, W., Mcelrone, A. (2017). "Aquaporins and Root Water Uptake," in Plant Aquaporins: From Transport to Signaling, eds F. Chaumont and S. D. Tyerman (Cham: Springer); p. 133–153. doi: 10.1007/978-3-319-49395-4\_6.
- Gao, Y., Li, Y., Yang, X., Li, H., Shen, Q., Guo, S. (2010). Ammonium nutrition increases water absorption in rice seedlings (Oryza sativa L.) under water stress. Plant Soil, 331; p. 193–201. doi: 10.1007/s11104-009-0245-1.
- Garg, B., Kathju, S., Burman, U. (2001). Influence of water stress on water relations, photosynthetic parameters and nitrogen metabolism of moth bean genotypes Biol. Plant, 44; p. 289-292.
- Garg, N. & Manchanda, G. (2009). ROS generation in plants: Boon or bane? Plant Biosystems, 143; p. 81-96. DOI: 10.1080/11263500802633626.
- Garnett, T., Plett, D., Heuer, S., Okamoto, M. (2015). Genetic approaches to enhancing nitrogen-use efficiency (NUE) in cereals: challenges and future directions. Functional Plant Biology, 42; p. 921–941.

- Garty, J., Weissman, L., Tamir, O., Beer, S., Cohen, Y., Karnieli, A. et al. (2000).
  Comparação de cinco parâmetros fisiológicos para avaliar a vitalidade do líquen
  Ramalina lacera exposto à poluição do ar. Physiol. Plantar, 109; p. 410–418.
- Gaspar, M. (2011). Aquaporinas: de canais de água a transportadores multifuncionais em plantas. Revista Brasil. Bot., 34. 4; p. 481-491.
- George, D. & Mallery, P. (2018). IBM SPSS Statistics 25 Step by Step: A Simple Guide and Reference (15th ed.). Routledge. https://doi.org/10.4324/9781351033909.
- Gill S. & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiol. Biochem, 48; p. 909–930. 10.1016/j.plaphy.2010.08.016.
- Gilroy, S. & Trewavas, A. (2001). Signal processing and transduction in plant cells: the end of the beginning? Nat Rev Mol Cell Biol, 2; p. 307–314.
- Gonçalves, A., Paulo, M., Coutinho, A., Mercier, H. (2020). Thinking of the leaf as a whole plant: how does N metabolism occur in a plant with foliar nutrient uptake? Environmental and Experimental Botany.
- Gouda, E., Butcher, D., Gouda, C. (2019). Enciclopédia de bromélias, versão 4. Utrecht: Jardim Botânico da Universidade. Disponível em: http://bromeliad.nl/encyclopedia.
- Guo, S., Chen, G., Zhou, Y., Shen, Q. (2007a). Ammonium nutrition increases photosynthesis rate under water stress at the early development stage of rice (Oryza sativa L.). Plant Soil, 296; p. 115–124. doi: 10.1007/s11104-007-9302-9.
- Hachiya, T., Terashima, I., Noguchi, K. (2007). Increase in respiratory cost at high growth temperature is attributed to high protein turnover cost in Petunia x hybrida petals.Plant Cell Environ, 30; p. 1269–1283.
- Hadi, M. & Karimi, N. (2012). The role of calcium in plants' salt tolerance, Journal of Plant Nutrition, 35; p. 2037-2054. Doi: 10.1080/01904167.2012.717158.
- Hare, P. & Cress, W. (1997). Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. Plant Growth Regul, 21; p. 79–102.

- Harper, J. (2001). Dissecting calcium oscillators in plant cells. Trends Plant Sci, 6; p. 395–397.
- Hattori, T., Inanaga, S., Araki, H., An, P., Morita, S., Luxova, M., et al. (2005). Application of silicon enhanced drought tolerance in Sorghum bicolor. Physiologia Plantarum, 123; p. 459–466. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00481.x.
- Herrera, A. (2009). Crassulacean acid metabolism and fitness under water deficit stress: if not for carbon gain, what is facultative CAM good for? Annals of Botany, 103; p. 645-653.
- Hirsch, R., Lewis, B., Spalding, E., Sussman, M. (1998). A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. Science, 280; p. 918-921.
- Ho, C., Lin, S., Hu, H., Tsay, Y. (2009). CHL1 funciona como um sensor de nitrato em plantas. Cell, 138; p. 1184 1194, 10.1016 / j.cell.2009.07.004.
- Hose, E., Clarkson, D., Steudle, E.L., Schreiber, W. (2001). The exodermis: a variable apoplastic barrier J. Exp. Bot, 52; p. 2245-2264.
- Huang, J., Chang, X., Ridoutt, B.G., XueChun, W., PinAn, R. (2017). Nitrogen and phosphorus losses and eutrophication potential associated with fertilizer application to cropland in China, Journal of Cleaner Production, 159; p. 171-179.
- Prášil, I. & Zamecnik, J. (1998). The use of a conductivity measurement method for assessing freezing injury: I. Influence of leakage time, segment number, size and shape in a sample on evaluation of the degree of injury. *Environmental and Experimental Botany*, 40; p. 1-10.
- Isbell, F., Tilman, D., Reich, P., et al. (2019). Deficits of biodiversity and productivity linger a century after agricultural abandonment. Nat Ecol Evol, 3; p. 1533–1538. https://doi.org/10.1038/s41559-019-1012-1.
- Jatav, K., Agarwal, R., Nisha S., Shiv, R. (2014). Nitrogen metabolism, growth and yield responses of wheat (triticum aestivum l.) to restricted water supply and varying potassium treatments. J. Indian bot. Soc, 93; p. 177-189.

- Javot, H. & Maurel, C. (2002). The role of aquaporins in root water uptake. Ann. Bot, 90; p. 301–313. doi: 10.1093/aob/mcf199.
- Jaykumar, P. & Mishra, A. (2021). Plant aquaporins alleviate drought tolerance in plants by modulating cellular biochemistry, root-architecture, and photosynthesis. Physiologia Plantarum, 172; p. 2.
- Kaldenhoff, R. & Fischer, M. (2006). Functional Aquaporin Diversity in Plants. Biochim. Biophys. Acta, 1758; p. 1134–1141.
- Luther, H. & Sieff, E. (1994). De Rebus Bromeliacearum I. Selbyana, 15; p. 9-93.
- Luther, H. & Sieff, E. (1997). De Rebus Bromeliacearum II. Selbyana, 18; p.103-140.
- Luther, H. & Sieff, E. (2001). De Rebus Bromeliacearum III. Selbyana, 22; p. 34-67.
- Karim, M., Zhang, Y., Zhao, R., Chen, X., Zhang, F., Zou, C. (2012). Alleviation of drought stress in winter wheat by late foliar application of zinc, boron, and manganese. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 175; p. 142–151. https://doi.org/10.1002/jpln.201100141.
- Kaya, C., Tuna, L., Higgs, D. (2006). Effect of silicon and plant growth and mineral nutrition of maize grown under water-stress conditions. Journal of Plant Nutrition, 29; p. 1469– 1480. https://doi.org/10.1080/01904160600837238.
- Façanha, A., Canellas, L., Dobbss, L. (2019). Nutrição Mineral. Kerbauy, Gilberto B.Fisiologia Vegetal -Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 3; p. 33-49.
- Kishor, P. & Kavi, N. (2014). Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue? Plant, cell & Environment, 37; p. 300-311.
- Kishor, P., Sangam, S., Amrutha, R., Laxmi, P., Naidu, K., Rao, K., Rao, S., Reddy, K.,
  Theriappan P., Sreenivasulu, N. (2005). Regulation of proline biosynthesis,
  degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and
  abiotic stress tolerance. Current Science, 88; p. 424–438.

- Knight, H. & Knight, M. (2001). Abiotic stress signalling pathways: specificity and crosstalk. Trends Plant Sci, 6; p. 262–267.
- Knudson, L. (1946). A new nutrient solution for germination for orchid seed. American Orchid Society Bulletin, 15; p. 214–217.
- Kolattukudy, P., Kronman, K., Poulose, A. (1975). Determination of structure and composition of suberin from the roots of carrot, parsnip, rutabaga, turnip, red beet, and sweet potato by combined gas-liquid chromatography and mass spectrometry Plant Physiol, 55; p. 567-573. 10.1104/pp.55.3.567.
- Kotula, L., Ranathunge, K., Schreiber, L., Steudle, E. (2009). Functional and chemical comparison of apoplastic barriers to radial oxygen loss in roots of rice (Oryza sativa L.) grown in aerated or deoxygenated solution. Journal of Experimental Botany, 60; p. 2155–2167.
- Kreszies, T., Shellakkutti, N., Osthoff, A., Yu, P., Baldauf, J., ZeislerDiehl, V., Ranathunge, K., Hochholdinger, F., Schreiber, L. (2019). Osmotic stress enhances suberization of apoplastic barriers in barley seminal roots: analysis of chemical, transcriptomic and physiological responses. New Phytologist, 221; p. 180–194.
- Krishnamurthy, P., Ranathunge, K., Franke, R., Prakash, H., Schreiber, L., Mathew, M. (2009). The role of root apoplastic transport barriers in salt tolerance of rice (Oryza sativa L.). Plant, 230; p. 119–134.
- Krishnamurthy, P., Ranathunge, K., Nayak, S., Schreiber, L., Mathew, M. (2011). Root apoplastic barriers block Na+ transport to shoots in rice (Oryza sativa L.). Journal of Experimental Botany, 62; p. 4215–4228.
- Laloi, C., Appel, K., Danon, A. (2004). Reactive oxygen signalling: The latest news. Curr. Opin. Plant Biol, 7; p.323–328. doi: 10.1016/j.pbi.2004.03.005.
- Lambers, H. & Oliveira, R. (2019). Nutrição Mineral. In: Plant Physiological Ecology. Springer, 3; p. 173-186. https://doi.org/10.1007/978-3-030-29639.

- Lea, P. (1993). Nitrogen metabolism. In: LEA, P.J., LEEGOOD, R.C. Plant biochemistry and molecular biology Chichester: John Wiley and Sons, 7; p.155-180.
- Lee, B., Jin, Y., Avice, J., Cliquet, J., Ourry, A., Kim, T. (2009). Increased proline loading to phloem and its effects on nitrogen uptake and assimilation in water-stressed white clover (Trifolium repens). New Phytologist, 182; p. 654–663.
- Leigh, R. & Wyn, J. (1984). A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell. New Phytologist., 97; p. 1–13.
- Leme, E. & MARIGO, L. (1993). Bromélias na natureza, Rio de Janeiro, Marigo comunicação visual; p. 183.
- Leroy, C., Gril, E., Ouali, L.S., Coste, S., Gérard, B., Maillard, P., Mercier, H., Stahl, C.
  (2019). Water and nutrient uptake capacity of leaf-absorbing trichomes vs. roots in epiphytic tank bromeliads. Environmental and Experimental Botany, 163; p. 112–123.
- Li, W., Xu, G., Ali, A., Yu, I. (2017). Plant HAK/KUP/KT K<sup>+</sup> transporters: function and regulation. Semim. Cell Dev. Biol. 74; p. 133-141.
- Li, Y., Kronzucker, H., Shi, W. (2016). Microprofiling of nitrogen patches in paddy soil:
  analysis of spatiotemporal nutrient heterogeneity at the microscale. Scientific Reports,
  6.
- Li, Y., Gao, Y., Ding, L., Shen, Q., Guo, S. (2009a). Ammonium enhances the tolerance of rice seedlings (Oryza sativa L.) to drought condition. Agric. Water Manag, 96; p. 1746–1750. doi: 10.1016/j.agwat.2009.07.008.
- Liu, X., Wang, J., Sun, L. (2018). Structure of the hyperosmolality-gated calcium-permeable channel OSCA1.2. Nat Commun. 9: 5060.
- Luan, S., Kudla, J., Rodriguez, C., Yalovsky, S., Gruissem, W. (2002). Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants. Plant Cell [Suppl], 14; p.389–400.

- Lulai, E. & Corsini, D.N. (1998). Crop Differential deposition of suberin phenolic and aliphatic domains and their roles in resistance to infection during potato tuber (Solanum tuberosum L.) wound-healing Physiol. Mol. Plant Pathol, 53, p. 209-222. 10.1006/pmpp.1998.0179.
- Lupoi, J., Singh, S., Parthasarathi, R., Simmons, B., Henry, R. (2015). Recent innovations in analytical methods for the qualitative and quantitative assessment of lignin Renew. Sustain. Energy Rev, 49; p. 871-906. 10.1016/j.rser.2015.04.091.
- Lüttge, U., Stimmel, K., Smith, J., Griffiths, H. (1986). Comparative ecophysiology of CAM and C3 bromeliads. II. Field measurements of gas exchange of CAM bromeliads in the humid tropic Plant, Cell and Environment, 9; p. 377-383.
- Lüttge, U. (2004). Ecophysiology of Crassulacean acid metabolism (CAM) Annals of Botany, 93; p. 629-652.
- Lüttge, K., Stimmel, J., Smith, H. (1986). Griffiths Ecofisiologia comparativa de bromélias CAM e C<sub>3</sub>. II. Medições de campo das trocas gasosas de bromélias CAM nos trópicos úmidos. Plant Cell Environ, 9; p. 377–383.
- Lux, A., Sottníková, A., Opatrná, J., Greger, M. (2004). Differences in structure of adventitious roots in Salix clones with contrasting characteristics of cadmium accumulation and sensitivity. Physiologia Plantarum, 120; p. 537–545.
- Maggio, A., Miyazaki, S., Veronese, P., Fujita, T., Ibeas, J., Damsz, B., Narasimhan M., Hasegawa, P., Joly, R., Bressan, R. (2002). Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? Plant J., 31; p.699–712.
- Maghsoudi, K., Emam, Y., Ashraf, M., Arvin, M. (2019). Alleviation of field water stress in wheat cultivars by using silicon and salicylic acid applied separately or in combination. Crop & Pasture Science, 70.
- Malavolta, E., Vitti, G., Oliveira, S. (1997). Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Piracicaba: POTAFOS, 2; p. 319.

- Manishankar, P., Wang, N., Koster, P., Alatar, A.A., Kudla, J. (2018). Calcium signaling during salt stress and in the regulation of ion homeostasis. J. Exp. Bot., 69; p. 4215– 4226. https://doi.org/10.1093/jxb/ery201.
- Marschner, H. (2011). Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, London.
- Marschner, P. (2011). Mineral nutrition of higher plants. 3. ed. London, U.K.: Academic Press, 672.
- Martin, C. E. & Schmitt, A. K. (1989). Unusual water relations in the CAM atmospheric epiphyte Tillandsia usneoides L (Bromeliaceae) Botanical Gazette 150; p. 1-8.
- Martinelli, G., Vieira, C. M, Gonzalez, M., Leitman, P., Piratininga, A., Costa, F. A., Forzza,
  R. C. (2008). "Bromeliaceae Da Mata Atlântica Brasileira: Lista De Espécies,
  Distribuição e Conservação." Rodriguésia, 59; p. 209–258.
- Martinez, C., Martinez, V., Rubio, F. (2015). High-affinity K+ uptake in pepper plants.
  Journal of Experimental Botany. Larcher W. (2006). Ecofisiologia Vegetal. Ed. Rima. 56; p. 1553-1562.
- Massad, T.J., Dyer, L.A., Vega, C.G. (2012). Cost of defense and a test of the carbon-nutrient balance and growth-differentation balance hypotheses for two co-occurring classes of plant defense. PLoS One., 7: e7554.
- Matiz, A., Mioto, P.T., Mayorga, A.Y., Freschi, L., Mercier, H. (2013). Cam photosynthesis in Bromeliads and Agaves: What can we learn from these plants? INTECH. C., 4; p. 91 – 134.
- Matysik, J., Alia, B.B., Mohanty, P. (2002). Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. Current Science, 82; p. 525–532.
- Maurel, C., Boursiac, Y., Luu, D.-T., Santoni, V., Shahzad, Z., Verdoucq, L. (2015). Aquaporins in plants Physiol. Rev., 95; p. 1321-1358. 10.1152/physrev.00008.2015.
- Maurel, C., Verdoucq, L., Luu, D.-T., Santoni, V. (2008). Plant Aquaporins: Membrane Channels with Multiple Integrated Functions. Annu. Rev. Plant. Biol., 59; p. 595–624.

- McAinsh, M.R. & Hetherington, A.M. (1998). Encoding specificity in Ca<sup>2+</sup> signaling systems. Trends Plant Sci, 3; p. 32–36.
- Mercier, H., Rodrigues, M.A., Andrade, S.C.do S., Coutinho, L.L., Gobara, B.N.K., Matiz, A., et al. (2019). Perfil foliar transcricional da bromélia C <sub>3</sub>-CAM *Guzmania monostachia*. PLoS ONE, 14(10).
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V.B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., Van, B.F. (2011). ROS signaling: the new wave? Trends Plant Sci, 16 (6); p. 300-309. 10.1016/j.tplants.2011.03.007.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. Trends in Plant Science, 9; p. 490–498.
- Montillet, J. L, Chamnongpol, S., Rustérucci, C., Dat, J., Van de Cotte, B., Agnel, J-P.,
  Battesti, C., Inzé, D., Breusegem, F.V., Triantaphylidès, C. (2005). Fatty Acid
  Hydroperoxides and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the Execution of Hypersensitive Cell Death in Tobacco
  Leaves, Plant Physiology, 138; p. 1516–1526. https://doi.org/10.1104/pp.105.059907.
- Morgan, J.M. (2003). Osmoregulation and water stress in higher plants. Annual Review of Plant Physiology, 35; p. 299-319.
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. Plant, Cell and Environment, 25(2); p. 239-250.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue culture. Physiologia Plantarum, 15; p. 473–479.
- Natarajan, S.K., Zhu, W.D., Liang, X.W., Zhang, L., Demers, A.J., Zimmerman, M.C., Simpson, M.A., Becker, D.F. (2012) Proline dehydrogenase is essential for proline protection against hydrogen peroxide-induced cell death. Free Radical Biology and Medicine, 53; p. 1181–1191.
- Nawrath, C., Schreiber, L., Franke, R.B., Geldner, N., Reina-Pinto, J.J., Kunst, L. (2013). Apoplastic diffusion barriers in Arabidopsis Arab. Book, 11; e0167, 10.1199/tab.0167.
- Nievola, C. C., Kraus, J. E., Freschi, L., Souza, B. M., Mercier, H. (2005). Temperature determines the occurrence of CAM or C3 photosynthesis in pineapple plantlets grown in vitro. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant, 41; p. 832-387.
- Oosterhuis, D. M., Loka, D. A., Kawakami, E. M., Pettigrew, W. T. (2014). The physiology of potassium in crop production. Advances in Agronomy, 126; p. 203–233.
- Osmond, C. (1978). Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context Annual Review Plant Physiology, 29; p. 379-414.
- Osmond, C.B. & J.A.M. Holtum. (1981). 7 Crassulacean Acid Metabolism, Editor(s): M.D. Hatch, N.K. Boardman, Photosynthesis, Academic Press; p. 283-328.
- Ota, K. (1988). Stimulation of CAM photosynthesis in Kalanchoë blossfeldiana by transferring to nitrogen-deficient conditions. Plant Physiol, 87; p. 454–457.
- Pandy, P. K., Srisvastava, R., Rajpoot, A., Rani, A.K., Pandey, R.S. (2016). Dubey Water deficit and aluminum interactive effects on generation of reactive oxygen species and responses of antioxidative enzymes in the seedlings of two rice cultivars differing in stress tolerance Environ. Sci. Pollut. Control Ser., 23; p. 1516-1528.
- Parida, A.K., Dagaonkar, V.S., Phalak, M., Umalkar, G.V., Aurangabadkar, L.P. (2007). Alterations in photosynthetic pigments, protein and osmotic components in cotton genotypes subjected to short-term drought stress followed by recovery. Plant Biotechnol. Rep. 1; 37–48.
- Pereira, N. P., Gaspar, M., Smith, A. C. J., Mercier, H. (2018). Ammonium intensifies CAM photosynthesis and counteracts drought effects by increasing malate transport and antioxidant capacity in Guzmania monostachia. Journal of Experimental Botany, 69, No. 8; p. 1993–2003.
- Pereira, P.N., Smith, J.A.C., Mercier, H. (2017). Nitrate enhancement of CAM activity in two Kalanchoë species is associated with increased vacuolar proton transport capacity. Physiol Plant, 160; p. 361–372.

- Pinheiro, C. & Chaves, M.M. (2011). Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? J Exp Bot., 62; p. 869-882.
- Pottosin, I., Velarde-Buendía, A.M., Bose, J., Fuglsang, A.T., Shabala, S. (2014). Polyamines depolarize the membrane and initiate a cross-talk between plasma membrane Ca<sup>2+</sup> and H<sup>+</sup> pumps. Biophysical Journal, 106; p. 586a.
- Ragel, P., Rodenas, R., García-Martín, E., Andrés, Z., Villalta, I., Nieves-Cordones, M., Rivero, R.M., Martínez, V., Pardo, J.M., Quintero, F.J., Rubio, F. (2015). CIPK23 regulates HAK5-mediated high-affinity K+ uptake in Arabidopsis roots. Plant Physiol, 169; p. 2863–2873. https://doi.org/10.1104/pp.15.01401.
- Ranathunge, K.,, Kim, Y.X., Wassmann, F., Kreszies, T., Zeisler, V., Schreiber, L. (2017).
  The composite water and solute transport of barley (Hordeum vulgare) roots: effect of suberized barriers Ann. Bot., 119; p. 629-643. roi = 10.1093/aob/mcw252.
- Ranathunge, K., Kotula, L., Steudle, E., Lafitte, R. (2004). Water permeability and reflection coefficient of the outer part of young rice roots are differently affected by closure of water channels (aquaporins) or blockage of apoplastic pores. Journal of Experimental Botany, 55; p. 433–447.
- Ranathunge, K., Lin, J., Steudle, E., Schreiber, L. (2011a). Stagnant deoxygenated growth enhances root suberization and lignifications, but differentially affects water and NaCl permeabilities in rice (Oryza sativa L.) roots. Plant, Cell & Environment, 34; p. 1223– 1240.

Ranson, S. L. & Thomas, M. (1960). Crassulacean Acid Metabolism Annual Review Plant.

- Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E. (1936). Biologia Vegetal. Coordenação da tradução Jane Elizabeth Kraus; revisão técnica Jane Elizabeth Kraus, Neuza Maria de Castro; tradução Ana Cláudia de Macêdo Vieira...et al. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- Rhodes, D., Verslues, P.E., Sharp, R.E. (1999). Role of Amino Acids in Abiotic Stress Resistance. In Plant Amino Acids. Biochemistry and Biotechnology; Singh, B.K., Ed.;

Marcel Deker, Inc.: New York, NY, USA; Basel, Switzerland; Hong Kong, China; p. 319–356.

- Roberts, A. G. & Oparka, K. J. (2003). Plasmodesmata and the control of symplastic transport. Plants, Cell & Environment, 26; p. 103-124.
- Rodrigues, M. A., Freschi, L., Pereira, P. N., Mercier, H. (2014). Interactions between nutrients and crassulacean acid metabolism. In: Lüttge U et al. (eds.) Progress in botany. Springer-Verlag, Berlin; p. 167–186.
- Rodrigues, M.L., Chaves, M.M., Wendler, R., David, M.M., Quick, W.P., Leegood, R. C., Stitt, M., Pereira, J.S. (1993). Osmotic Adjustment in Water Stressed Grapevine Leaves in Relation to Carbon Assimilation. Australian Journal of Plant Physiology, 20; p. 309-321.
- Römheld, V. & Kikby, E. A. (2010). Research on potassium in agriculture: needs and prospects. Plant and Soil, Dordrecht, 335; p. 155-158.
- Rubio, F., Fon, M., Ródenas, R., Nieves, C. M., Alemán, F., Rivero, R. M., Martínez, V. (2014). A low K+ signal is required for functional highaffinity K+ uptake through HAK5 transporters. Physiologia Plantarum, 152; p. 558–570.
- Rubio, F., Aleman, F., Nieves-Cordones, M., Martinez, V. (2010). Studies on Arabidopsis athak5, atakt1 double mutants disclose the range of concentrations at which AtHAK5, AtAKT1 and unknown systems mediate K uptake. Physiol. Plant. 139, 220–228. doi: 10.1111/j.1399-3054.2010.01354.x.
- Sade, N. & Moshelion, M. (2017). "Plant aquaporins and abiotic stress," in Plant Aquaporins, eds F. Chaumont and S. D. Tyerman (Berlin: Springer); p. 185–206.
- Saneoka, H., Moghaieb, R., Premachandra, G.S., Fujita, K. (2004). Nitrogen nutrition and water stress effects on cell membrane stability and leaf water relations in Agrostis palustris Huds. Environmental and Experimental Botany, 52; p. 131-138.

- Santa-Cruz, A., Martinez, R. M. M., Perez, A. F., Romero, A. R., Bolarin, M. C. (2002). The rootstock effect on the tomato salinity response depends on the shoot genotype. Plant Science, 162; p. 825-831.
- Santa-maria, G.E., Danna, C.H., Czibener, C. (2000). High-affinity Potassium Transport in Barley Roots. Ammonium-Sensitive and –Insensitive Pathways. Plant Physiology, 123; p. 297-306.
- Saradhi, P.P., Alia, Arora S., Prasad K.V. (1995). Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV induced peroxidation. Biochemical and Biophysical Research Communications, 209; p. 1–5.
- Sardans, J., Penuelas, J., Coll, M., Vayreda, J., Rivas-Ubach, A. (2012). Stoichiometry of potassium is largely determined by water availability and growth in Catalonian forests. Functional Ecology, 26; p. 1077–1089.
- Sardans, J. & Penuelas, J. (2015). Potassium: a neglected nutrient in global change. Global Ecology and Biogeography, 24; p. 261–275.
- Scoffoni, C., Mckown, A. D., Rawls, M., Sack, L. (2011a). Dynamics of leaf hydraulic conductance with water status: quantification and analysis of species differences under steady state. J. Exp. Bot, 63; p. 643–658.
- Scrase-Field, S. A. & Knight, M.R. (2003). Calcium: just a chemical switch? Curr Opin Plant Biol, 6; p. 500–506.
- Shabala, S. & Pottosin, I.I. (2010) Potassium and Potassium-Permeable Channels in Plant Salt
   Tolerance. In: Demidchik V., Maathuis F. (eds) Ion Channels and Plant Stress
   Responses. Signaling and Communication in Plants. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Shabala, S. & Pottosin, I. (2014). Regulation of potassium transport in plants under hostile conditions: implications for abiotic and biotic stress tolerance. Physiol. Plant, 151; p. 257–279.
- Shabbir, R. N., Waraich, E. A., Ali, H., Nawaz, F., Ashraf, M. Y., Ahmad, R., et al. (2016). Supplemental exogenous NPK application alters biochemical processes to improve

yield and drought tolerance in wheat (Triticum aestivum L.). Environmental Science and Pollution Research, 23; p. 2651–2662.

- Shah, T., Khan, A. Z., Numan, M., Ahmad, W., Zahoor, M., Ullah, M., et al. (2017). Nutrient uptake and yield of wheat varieties as influenced by foliar potassium under drought conditions. Agronomic Research in Moldova, 2; p. 5–20.
- Siddiqi, M.Y., Glass, A.D.M., Ruth, T.J., et al. (1990). Studies of the uptake of nitrate in barley. I. Kinetics of <sup>13</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> influx. Plant Physiology, Lancaster, 93; p. 1426-1432.
- Sies, H. C. & Berndt, D.P. (2017). Jones Oxidative stress Annu. Rev. Biochem., 86; p. 715-748.
- Silva, V. M., Tavanti, R., Gratão, P. L., Alcock, T. D., Reis, A. R. (2020). Selenate and selenite affect photosynthetic pigments and ROS scavenging through distinct mechanisms in cowpea (Vigna unguiculata (L.) walp) plants Ecotoxicol. Environ. Saf., 201.
- Siripornadulsil, S., Traina, S., Verma, D.P., Sayre, R.T. (2002) Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. The Plant Cell, 14; p. 2837–2847.
- Sleslak, I., Karpinska, B., Surówka, E., Miszalski, Z., Karpinski, S. (2003). Redox changes in the chloroplast and hydrogen peroxide are essential for regulation of C3- CAM transition and photooxidative stress responses in the facultative CAM plant Mesembryanthemum crystallinum L. Plant Cell Physiol, 44; p. 573-581.
- Smirnoff, N. & Cumbes, Q.J., (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. Phytochemistry, 28; p. 1057–1060.
- Smith, J. A. C., Griffiths, H., Bassett, M., Griffiths N. M. (1985). Day-night changes in the leaf water relations of epiphytic bromeliads in the rain forests of Trinidad Oecologia, 67; p. 475-485.
- Smith, L. B & Downs, R. J. (1974). Pitcairnioideae (Bromeliaceae) Flora Neotropica Monograph 14, 1–662.

- Smith, L. B. & Downs, R. J. (1977). Tillandsioideae (Bromeliaceae) Flora Neotropica Monograph, 14; p. 663–1492.
- Smith L. B. & Downs R. J. (1979). Bromelioideae (Bromeliaceae) Flora Neotropica Monograph 14, 1493–2142.
- Souza, E. R., Freire, M. B. G. dos S., Cunha, K. P. V. da, Nascimento, C. W. A. do, Ruiz, H. A., Lins, C. M. T. (2012). Biomass, anatomical change sand osmotic potential in Atriplex numulária L indl. cultivated in sodic saline soil under water stress. Environmental and Experimental Botany, 82; p. 20-27.
- Spalding, E.P., Hirsch, R.E., Lewis, D.R., Qi, Z., Sussman, M.R., Lewis, B.D. (1999).
  Potassium uptake supporting plant growth in the absence of AKT1 channel activity.
  Journal of General Physiology, 113; p. 909-918.
- Spoel, S.H. & Dong, X. (2008). Making sense of hormone crosstalk during plant immune response. Cell Host Microbe, 3; p. 348–351.
- Steudle, E. (1994b). Water transport across roots. Plant and Soil, 167; p. 79–90.
- Steudle, E., JAC, S., Griffiths H. (1993). Pressure probe techniques: basic principles and applications to studies of water and solute relations at the cell, tissue and organ level Water Deficits: Plant Responses from Cell to Community. Oxford. Bios Scientific Publishers. p. 5-36.
- Steudle, E. (2000). Water uptake by roots: an integration of views. Plant Soil, 226; p. 45-56.
- Steudle, E. & Peterson, C. (1998). How does water get through roots? J. Exp. Bot., 49; p. 775-788.
- Swarbrick, P., Schulze-Lefert, P., Scholes, J.D. (2006). Metabolic consequences of susceptibility and resistance in barley leaves challenged with powdery mildew. Plant Cell Environ, 29; p. 1061–1076.
- Szabados, L., & Savouré, A. (2010). Prolina: um aminoácido multifuncional Trends Plant Sci, 15; p. 89 97.

- Szczerba, M.W., Britto, D.T, Ali, S.A., Balkos, K.D., Kronzucker, H.J. (2008) NH4+stimulated and –inhibited components of K+ transport in rice (Oriza sativa L.). Journal of Experimental Botany, 59; p. 3415-3423.
- Taey, D.K.A., AlAzawi, S., Husien, M. (2010). Effect of Spraying Acetyl Salicylic Acid on the Plant Tolerance for Salt Stress & Survival Percentage after Transplanting of Orange (Citrus sinensis). Babylon Journal University - Pure and Applied science, 18(4); p. 1513-1520.
- Takahashi, C., Ceccantini, G., Mercier, H. (2007). Differential capacity of nitrogen assimilation between apical and basal leaf portions of a tank epiphytic bromeliad. Braz J Plant Physiol, 19; p. 119–126.
- Takahashi, S., Seki, M., Ishida, J., Satou, M., Sakurai, T., Narusaka, M., Kamiya, A.,
  Nakajima, M., Enju, A., Akiyama, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2004)
  Monitoring the expression profiles of genes induced by hyperosmotic, high salinity,
  and oxidative stress and abscisic acid treatment in Arabidopsis cell culture using a
  full-length cDNA microarray. Plant Mol Biol, 56; p. 29-55.
- Tamura, A. (2000). Evaluation of freezing tolerance of whole plants in komatsuna (Brassica campestris L.) and spinach (Spinacia oleraceae L.). J. Jap. Soc. Hort. Sci., 69; p. 332–338.
- Tuncturk, R. & Tuncturk, M. (2006). Effects of different phosphorus levels on the yield and quality components of cumin (Cuminum cyminum L.). Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 2; p. 336-340.
- Tang, R.J., Zhao, F.G., Yang, Y., Wang, C., Li, K., Kleist, T.J., Lemaux, P.G., Luan, S., (2020). A calcium signalling network activates vacuolar K+ remobilization to enable plant adaptation to low-K environments. Nat. Plants, 6. p. 384–393. https://doi.org/ 10.1038/s41477-020-0621-7.
- Tattersall, E., Grimplet, J., Deluc, L., Wheatley, M., Vincent, D., Osborne, C., Ergul, A., Lomen, E., Blank, R., Schlauch, K., Cushman, J. (2007). Cramer GR: Transcript abundance profiles reveal larger and more complex responses of grapevine to chilling

compared to osmotic and salinity stress. Funct Integr Genomics, 7(4); p. 317-333. 10.1007/s10142-007-0051-x.

- Terrer, C., Jackson, R.B., Prentice, I.C. et al. (2020). Author Correction: Nitrogen and phosphorus constrain the CO<sub>2</sub> fertilization of global plant biomass. Nat. Clim. Chang, 10; p. 696–697. https://doi.org/10.1038/s41558-020-0808-y.
- Tripler, C., Kaushal, S., Likens, G., Walter, M. (2006). Patterns in potassium dynamics in forest ecosystems. Ecology Letters, 9; p. 451–466.
- Tundisi, J. (2003). Água no século XXI: Enfrentando a escassez. São Carlos: RiMa, IIE; p. 247.
- Tyerman, S., Wignes, J., Kaiser, B. (2017). Respostas da raiz hidráulica e aquaporina para N disponibilidade. Plant Aquaporins. Sinalização e comunicação em Plantas. Springer. p. 207-236.
- Tyerman, S., Bohnert. H., Maurel, C., Steudle, E., Smith, J. (1999). Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. Journal of Experimental Botany, 50; p. 1055–1071.
- Upadhyaya, C., Venkatesh, J., Gururani, M., Asnin, L., Sharma, K., Ajappala, H., Park, S. (2011). Transgenic potato overproducing L-ascorbic acid resisted an increase in methylglyoxal under salinity stress via maintaining higher reduced glutathione level and glyoxalase enzyme activity. Biotechnol Lett, 33; p. 2297–2307.
- Usmani, M. M., Nawaz, F., Majeed, S. (2020). Sulfate-mediated drought tolerance in maize involves regulation at physiological and biochemical levels. Scientific Reports, 10; p. 1147. https://doi.org/10.1038/s41598-020-58169-2.
- Vainola, A. (2000) Genetic and physiological aspects of cold hardiness in Rhododendron. Dissertation of masters. Department of Plant Biology Plant Breeding University of Helsinki FINLAND.
- Vale, F. R., Jackson, W. A., Volk, R.J. (1987). Potassium Influx into Maize Root System. Plant Physiology, 84; p. 1416-1420.

- Vieira, E. A., Centeno, D., Freschi, L., Silva, E., Braga, M. (2017). The dual strategy of the bromeliad Pitcairnia burchellii Mez to cope with desiccation. Environmental and Experimental Botany, 143; p. 135-148.
- Von Wirén, N., Gazzarrini, S., Frommer, W.B. (1997). Regulation of mineral nitrogen uptake in plants. Plant and Soil, The Hague, v.196; p. 191-199.
- Wang, M.Y., Siddiqi, M.Y., Glass, A. D. M. (1996). Interactions between K+ and NH4 +: effects on ion uptake by rice roots. Plant, Cell & Environment, 19; p. 1037–1046.
- Wang, X., Gao, F., Bing, J., Sun, W., Feng, X., Ma, X., Zhou, Y., Zhang, G. (2019).
  Overexpression of the Jojoba Aquaporin Gene, ScPIP1, Enhances Drought and Salt Tolerance in Transgenic Arabidopsis. International Journal of Molecular Sciences, 20(1); p. 153. https://doi.org/10.3390/ijms20010153.
- Wang, Y.Y., Hsu, P. K., Tsay, Y. F. (2012). Uptake, allocation and signaling of nitrate. Trends in Plant Science, 17; p. 458–467.
- Wang, Y., He, L., Li, H. D., Xu, J., Wu, W. H. (2010). Potassium channel alpha-subunit AtKC1 negatively regulates AKT1-mediated K(+) uptake in Arabidopsis roots under low-K(+) stress. Cell Res, 20; p. 826–837. doi: 10.1038/cr.2010.74.
- Waraich, E., Muhammad, Y., Saifullah, U. (2011). Role of mineral nutrition in alleviation of drought stress in plants. Article in Australian Journal of Crop Science, 6; p. 764-777.
- Weatherle, Y. P. E. (1950). Studies in the water relations of the cotton plant I: the field measurements of water deficits in leaves. New Phytologist, Cambrigde, 49; p. 81-97.
- Weatherley, P. E. (1950). Studies in the water relations of the cotton plant. New Phytologist, 49; p. 81-97.
- Weih, M., Nordh, N. E., Manzoni, S., Hoeber, S. (2021). Functional traits of individual varieties as determinants of growth and nitrogen use patterns in mixed stands of willow (Salix spp.). Forest Ecology and Management; V. 479.
- West, E. M. J., Smith, J. A. C., Winter, K. (2011). Photosynthesis, reorganized. Science, 332; p. 311–312.

- Wilkinson, S., Bacon, M., Davies, W. (2007). Nitrate signalling to stomata and growing leaves: interactions with soil drying, ABA, and xylem sap pH in maize. J. Exp. Bot. 58; p. 1705–1716. doi: 10.1093/jxb/erm021.
- Winter, K., Aranda, J., Holtum J. (2005). Carbon isotope composition and water-use efficiency in plants with crassulacean acid metabolism. Functional Plant Biology, 32; p. 381–388.
- Winter, K., Garcia, M., Holtum, J. (2008). On the nature of facultative and constitutive CAM: environmental and developmental control of CAM expression during early growth of Clusia, Kalanchoë and Opuntia. Journal of Experimental Botany, 59; p. 1829–1840.
- Winter, K. & Tenhunen J. (1982). Light-stimulated burst of carbon dioxide uptake following nocturnal acidification in the Crassulacean acid metabolism plant Kalanchoe daigremontiana. Plant Physiology, 70; p. 1718-1722.
- Xu, J., Li, H., Chen, L., Wang, Y., Liu, L., He, L., Wu, W. (2006). A protein kinase, interacting with two Calcineurin B-like proteins, regulates K+ transporter AKT1 in Arabidopsis. Cell 125; p. 1347–1360. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.011.
- Yang, X., Li, Y., Ren, B., Ding, L., Gao, C., Shen, Q. (2012). Drought-induced root aerenchyma formation restricts water uptake in rice seedlings supplied with nitrate. Plant Cell Physiol, 53; p. 495–504. doi: 10.1093/pcp/pcs003.
- Yilancioglu, K., Cokol, M., Pastirmaci, I., Erman, B., Cetiner, S. (2014). Oxidative stress is a mediator for increased lipid accumulation in a newly isolated Dunaliella salina strain. PLoS ONE, 9(3): e91957.
- Yue Bing, Weiya Xue, Lizhong Xiong, Xinqiao Yu, Lijun Luo, Kehui Cui, Deming Jin, Yongzhong Xing, Qifa Zhang. (2006). Base Genética de Resistência à Seca no Estágio Reprodutivo em Arroz: Separação da Tolerância à Seca da Prevenção à Seca. Genética, 172, Ed. 2, (2006); p. 1213–1228.
- Zeier, J. & Schreiber, L. (1998). Comparative investigation of primary and tertiary endodermal cell walls isolated from the roots of five monocotyledoneous species:

chemical composition in relation to fine structure. Planta, 206(1998); p. 349-361; 10.1007/s004250050410.

- Zhao, W., Wang, Y., Zhou, Z., Meng, Y., Chen, B., Oosterhuis, D. M. (2012). Effect of Nitrogen Rates and Flowering Dates on Fiber Quality of Cotton (Gossypium hirsutum L.). Journal of Experimental Agriculture International, 2(2); p. 133-159.
- Zimmermann, H., Hartmann, L., Schreiber, E. (2000). Steudle Chemical composition of apoplastic transport barriers in relation to radial hydraulic conductivity of corn roots (Zea mays L.). Planta, 210; p. 302-311; 10.1007/PL00008138.
- Zörb, C., Senbayram, M., Peiter, E. (2014). Potassium in agriculture status and perspectives. Journal of Plant Physiology, 171; p. 656-669.
- Zotz, G. & Andrade, J. (1998). Relações hídricas de duas bromélias epifíticas co-ocorrentes. Journal Plant Physiol, 152 (1998); p. 545 – 554.
- Zotz, G. & Thomas, V. (1999). How much water is in the tank? Model calculations for two epiphytic bromeliads. Annals of Botany, 83; p. 183–192.
- Zotz, G. & Zotz, A. (2013). A distribuição sistemática de epífitas vasculares uma atualização crítica. J. Linn. Soc, 171(2013); p. 453 481.
- Zotz, G. (2016). Plants on plants: The biology of vascular epiphytes. Springer.