

Paula Natália Pereira

**Divisão espacial da atividade das enzimas PEPC e NR e sua
regulação por citocininas em folhas de *Guzmania monostachia*
induzidas ao CAM**

**Spatial division of PEPC and NR enzymes activity and its
regulation by cytokinins in CAM induced leaves of *Guzmania*
*monostachia***

São Paulo,

2012

Paula Natália Pereira

**Divisão espacial da atividade das enzimas PEPC e da NR e
sua regulação por citocininas em folhas de *Guzmania*
monostachia induzidas ao CAM**

**Spatial division of PEPC and NR enzymes activity and its
regulation by cytokinins in CAM induced leaves of *Guzmania*
*monostachia***

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

Orientadora: Profa. Dra. Helenice Mercier

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

São Paulo,

2012

Ficha Catalográfica

Pereira, Paula Natália.

Divisão espacial da atividade das enzimas PEPC e NR e sua regulação por citocininas em folhas de *Guzmania monostachia* induzidas ao CAM

Número de páginas: 66 p.

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

1. Metabolismo ácido crassuláceo 2. Fosfoenolpiruvato carboxilase 3. Nitrato redutase 4. Citocininas

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr (a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dra. Helenice Mercier
(Orientadora)

“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser... mas graças a Deus, não somos o que éramos.”

Marthin Luther King

À minha mãe, pelo amor e
carinho.

Ao Digo, pelo companheirismo
e amor em todos os momentos.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos...

À minha mãe Sonia e ao meu pai José Valter “in memória”, pelo amor incondicional, por acreditarem em mim e no meu trabalho e por me darem o suporte quando criança para me tornar a pessoa que sou hoje.

À Profa Dra. Helenice Mercier pela orientação, conselhos, oportunidades oferecidas desde o início deste trabalho e pelo exemplo de inteligência e competência.

Ao Prof. Dr. Luciano Freschi pela amizade, conselhos, apoio, discussões de cunho científico e pelo exemplo de profissionalismo, dedicação e inteligência.

Ao Prof. Dr. Eduardo Purgatto pela ajuda em diversas análises durante a realização desta pesquisa, pelas palavras incentivadoras em todos os momentos, pela amizade e confiança cultivadas durante esse período.

Ao Prof. Dr. Gilberto Barbante Kerbauy pelos ensinamentos teóricos e práticos, pela ajuda na solução de diversas dúvidas e pela amizade construída nos últimos anos.

Ao Prof. Dr. Marcos Silveria Buckeridge pela colaboração na dosagem de amido, bem como permitir a realização das análises em seu laboratório de pesquisa.

Às Profas. Dra. Catarina Nievola e Dra. Vivian Tamaki pela ajuda e dedicação no cultivo *in vitro* e em casa de vegetação das bromélias e pela disposição em esclarecer eventuais dúvidas que surgiram ao longo desta pesquisa.

À Profa. Dra. Marília Gaspar por disponibilizar o aparelho CG-MS do Instituto de Botânica para uso durante este trabalho.

Ao Rodrigo pelo amor, amizade, carinho, por estar ao meu lado nos momentos mais importantes da minha vida, pela compreensão e paciência nas situações mais difíceis e ajuda em diversos experimentos.

Ao mestrando Paulo Marcelo Rayner Oliveira pela ajuda em inúmeros experimentos, pelas noites em claro no laboratório e, sobretudo, pela amizade, paciência e por tornar o ambiente de trabalho agradável e divertido.

À Dra. Auri pelos ensinamentos, amizade, palavras incentivadoras, prontidão em ajudar em todos os momentos, dentro e fora do laboratório e pelo exemplo de dedicação e inteligência.

Aos amigos Aline Tiemi, Ilton, Dioceni, Bruno G. e Paulo pela ajuda nos experimentos, amizade e pelos ensinamentos durante todos esses anos.

Aos colegas do laboratório, Lucas, Aline B., Lia, Leonardo, Rafael, Alessandra, Cássia, Michel, Alejandra, Nielda, Rosana e Bruno pela amizade e discussões de cunho científico.

Aos alunos do laboratório do LAFIECO, Bruna, Adriana Grandis, Maraba e Débora, pela paciência e disponibilidade em me ensinar a metodologia para dosagem de amido endógeno.

Aos amigos João Paulo, Ludmila, Vanessa Oliveira, Bárbara, e Danilo Centeno do Instituto de Botânica, pela ajuda nas análises de ácidos orgânicos por cromatografia gasosa e pela amizade construída durante o período dos experimentos.

Aos técnicos Maxuel, Alex, Cíntia, Rita, Willian, Rodrigo, Paula e em especial à Ana Maria, pela amizade, disponibilidade em ajudar e pelo apoio em todos os momentos deste projeto.

Ao técnico Rosário, do laboratório de algas, por disponibilizar o uso de alguns equipamentos durante a realização deste trabalho.

À Susy pela disponibilidade em ajudar.

À técnica Sandra e à estagiária Marília pela dedicação em cuidar das bromélias mantidas no Instituto de Botânica (IBt).

Ao meu irmão, Milton, minha irmã, Flávia, minha cunhada Camila e em especial, meu sobrinho, Arthur, pelas alegrias compartilhadas e ensinamentos adquiridos durante todos esses anos de convívio.

À minha prima Thaís Natália Almeida e aos meus tios Cecília e João pelo apoio, amizade, compreensão, carinho e sábias palavras nesses últimos anos.

À Angela, Jairo, Kelly, Filipe e Lucas pelas palavras incentivadoras, conselhos e ajuda em diversos momentos da minha vida.

Aos secretários do Departamento de Botânica, Norberto, Carlos e Cristina, pelo atendimento e ajuda com as dúvidas acadêmicas.

A todos os funcionários do IBUSP que permitiram, direta ou indiretamente, a realização desta pesquisa.

A todos aqueles aqui não mencionados, mas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

ÍNDICE GERAL

I. Introdução.....	1
1. O hábito epifítico das bromélias.....	1
2. A folha como principal órgão das bromélias.....	2
3. O metabolismo ácido das crassuláceas (CAM).....	3
4. O CAM e o hábito epifítico.....	6
5. O CAM e as citocininas.....	7
6. Redutase do nitrato e citocininas.....	9
II. Objetivos.....	11
III. Material e métodos.....	12
1. Material vegetal.....	12
2. Indução ao CAM em plantas inteiras.....	13
3. Indução ao CAM em folhas destacadas.....	13
4. Determinação do conteúdo relativo de água.....	15
5. Acidez titulável.....	15
6. Quantificação de ácidos orgânicos.....	16
7. Quantificação dos teores endógenos de amido.....	16
8. Determinação da atividade da MDH.....	18
9. Determinação da atividade da PEPC.....	19
10. Determinação da atividade da NR.....	20
11. Determinação da atividade da GS.....	21
12. Quantificação dos teores endógenos de citocininas.....	22
13. Aplicação de citocininas-livres (Z e iP).....	23
14. Análise estatística.....	23
IV. Resultados.....	24
1. Efeito da adubação de plantas de <i>G. monostachia</i> sobre a transição C ₃ -CAM.....	24
2. Avaliação do status hídrico em folhas de <i>G. monostachia</i>	25
3. Parâmetros para verificar a expressão do CAM.....	26
3.1. Variação no teor de acidez titulável.....	26
3.2. Quantificação de malato e citrato.....	27
3.3. Quantificação do conteúdo endógeno de amido.....	29
3.4. Atividade <i>in vitro</i> da enzima MDH.....	30
4. Mudanças diurnas na atividade das enzimas PEPC, NR e GS.....	31

4.1. Atividade <i>in vitro</i> da enzima PEPC.....	31
4.2. Atividade <i>in vivo</i> da enzima NR.....	32
4.3. Atividade <i>in vitro</i> da enzima GS.....	33
5. Conteúdo endógeno de citocininas e aplicação de citocininas-livres.....	34
5.2. Quantificação de citocininas-livres.....	34
5.2. Aplicação de citocininas-livres (Z e iP).....	35
V. Discussão.....	37
VI. Principais contribuições.....	48
VII. Conclusões.....	50
VIII. Resumo.....	53
IX. Abstract.....	55
X. Anexo.....	57
XI. Referências bibliográficas.....	58

I. INTRODUÇÃO

1) O hábito epifítico das bromélias

O habitat onde se localizam as bromélias epífitas compreende um ambiente altamente dinâmico, o qual está sujeito às variações temporais e espaciais da intensidade luminosa, disponibilidade de nutrientes e água. Dentre esses fatores abióticos, períodos de escassez de água esporádicos ou sazonais são, talvez, um dos maiores desafios para as epífitas (ZOTZ & THOMAS, 1999). As epífitas, sobretudo as bromélias, carecem de um sistema radicular absorptivo eficiente, sendo dependentes das folhas e da precipitação para o seu abastecimento de água (BENZING, 1990). Portanto, bromélias epífitas devem empregar um conjunto de adaptações para enfrentar um abastecimento de água muito variável, típico de habitats epifíticos (ZOTZ & HIETZ, 2001).

Cerca da metade de todos os membros da família Bromeliaceae é epífita e o sucesso dessa família no ambiente aéreo está frequentemente associado com o desenvolvimento de estratégias de interceptação, absorção e armazenamento d'água de forma eficiente (BENZING, 2000).

No tanque formado pela sobreposição das bases foliares, a água precipitada acumula-se dentro dessa cisterna, permitindo que seja utilizada durante os períodos de seca (SCHIMIDT & ZOTZ, 2001). Os fatores atmosféricos como o vento, a neblina e a chuva transportam minerais sólidos até as cisternas, contribuindo para a riqueza nutricional do tanque (LEME, 1993). A planta hospedeira também tem um importante papel no fornecimento de nutrientes para as bromélias, além de ser um substrato para sua fixação. Durante os momentos de chuva, os íons e aminoácidos presentes nos troncos e folhas da planta hospedeira são levados pela água da chuva até o interior das cisternas, onde são acumulados (BENZING, 1973). Os detritos vegetais depositados no

tanque, como material foliar e camadas superficiais de troncos e galhos do hospedeiro, formam um tipo de solo orgânico (húmus) que também tem grande valor nutricional para as bromélias (BENZING, 1973; LEME, 1993). Além disso, a presença de tricomas na epiderme foliar garante uma forma eficiente de absorção da água e nutrientes na maioria das bromélias epifíticas (BENZING *et al.*, 1978). Também é comum entre as bromélias a presença de suculência foliar, a qual aumenta, significativamente, a capacidade de armazenamento da água no interior dos tecidos foliares (BENZING, 2000).

2) A folha como principal órgão das bromélias

A folha é o principal órgão do corpo vegetativo dos membros da família Bromeliaceae, tendo tanto a função de absorção quanto de assimilação dos nutrientes (BENZING, 2000). A folha de uma bromélia tanque pode ser dividida em pelo menos três regiões principais: a porção basal, a qual forma o tanque e, portanto, geralmente está em contato com a água e nutrientes (BENZING, 1990) e as porções mediana e apical que estão mais expostas à luz do que a porção basal (POPP *et al.*, 2003).

São raros os trabalhos que mostram a existência de diferenças morfológicas, anatômicas ou fisiológicas entre diferentes regiões de uma mesma folha em bromélias. SAKAI & SANDFORD (1980), ao estudarem os tricomas presentes nas superfícies foliares de *Ananas comosus* (Bromeliaceae), observaram que os tricomas presentes no ápice eram não funcionais, diferentemente dos tricomas basais.

POPP *et al.* (2003) verificaram que existem grandes diferenças entre as porções da base e do ápice foliar quando quantificaram alguns tipos de açúcares nos tecidos foliares de *Ananas comosus* cv. Spanish Red. Em geral, a porção do ápice foliar apresentou maior acúmulo de açúcares nos tecidos. Além disso, esses autores também

relataram o transporte desses carboidratos durante o período noturno em direção às partes jovens da planta, gemas e meristemas (POPP *et al.*, 2003).

Apesar de poucos trabalhos mostrarem diferenças anatômicas- fisiológicas entre as porções foliares, nenhum deles propôs qualquer hipótese sobre essas regiões exercerem diferentes funções.

De modo interessante, TAKAHASHI & MERCIER (2011) observaram para *Vriesea gigantea*, uma bromélia epífita com tanque, que a atividade da nitrato redutase (NR) variou nas diferentes porções foliares, sendo que, no período iluminado, a atividade da NR chegou a ser o triplo na porção basal, quando comparada à porção apical. O contrário foi observado para a enzima GS, que no período iluminado, apresentou maior atividade na porção foliar apical, comparativamente à basal. Portanto, há fortes indícios de que exista, realmente, uma divisão funcional entre as diferentes regiões das folhas de bromélias.

3) O Metabolismo Ácido das Crassuláceas (CAM)

O metabolismo CAM é expresso em aproximadamente 300 gêneros de 24 famílias (CEUSTERS *et al.*, 2011) e em 50% a 60% das espécies epífitas das famílias Bromeliaceae e Orchidaceae (LARCHER, 2006). O CAM pode ser dividido em 4 fases (OSMOND, 1978; LÜTTGE, 2004; SILVEIRA *et al.*, 2010). A fase I é caracterizada pela abertura dos estômatos durante a noite, entrada de CO₂ atmosférico, fixação do CO₂ pela enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) no citossol e formação de ácidos orgânicos que são estocados no vacúolo. A fase II consiste na transição da diminuição da atividade da enzima PEPC para o aumento na atividade da enzima ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (RUBISCO), a qual realiza a carboxilação diurna, possibilitando a produção de carboidratos. A fase III consiste no efluxo dos

ácidos orgânicos do vacúolo, subsequente descarboxilação e redução da taxa de transpiração e fechamento estomático. A Fase IV consiste na diminuição do estoque de ácidos orgânicos, descarboxilação e aumento da condutância estomática. Devido à fixação noturna do CO₂ atmosférico, plantas CAM apresentam maior eficiência no uso da água, comparado ao tipo fotossintético C₃ (HERRERA, 2009). A relação de transpiração é 3-10 vezes menor nas plantas CAM do que nas plantas C₃, conforme mostrado por KLUGE & TING (1978). É conhecido que esse metabolismo fotossintético ajuda na adaptação dos vegetais a ambientes áridos, já que, comparado ao ciclo de Calvin (C₃), diminui a transpiração em relação à capacidade de assimilação do CO₂ (KERBAUY *et al.*, 2012). Além disso, também protege o aparato fotossintético quando há baixa disponibilidade de água no ambiente e alta irradiância (LÜTTGE, 2004).

Apesar das vantagens, o CAM apresenta algumas desvantagens relacionadas à produtividade de biomassa e à fotorrespiração. A produtividade de biomassa, dada em massa seca, de plantas CAM é geralmente menor do que das plantas C₃ (BLACK & CLANTON, 1973). O gasto energético necessário para cada molécula de CO₂ assimilada também é geralmente mais elevado em plantas CAM, quando comparado às plantas C₃. A estequiometria estimada de ATP: NADPH: CO₂ de plantas C₃ é de 3: 2: 1, enquanto para plantas do tipo CAM é de 4,8: 3,2: 1 (WINTER, 1996). Com relação à fotorrespiração, inicialmente achava-se que as plantas CAM não tinham esse processo. Contudo, recentemente foi descoberto que o efeito da concentração do CO₂ poderia ser contrabalançado pela alta concentração do O₂ produzido pelo ciclo de Calvin no final do período claro (fases III e IV) (LÜTTGE, 2011).

O principal ácido orgânico acumulado nas espécies CAM é o ácido málico (CUSHMAN & BORLAND, 2002). Contudo em um trabalho realizado com *Tillandsia*

pohliana, verificou-se um acúmulo noturno, principalmente, de citrato (FRESCHI *et al.* 2010b). Esse acúmulo é potencialmente mais eficiente do que de malato, uma vez que a descarboxilação de um mol de citrato produz três moles de CO₂ (contudo, esse ácido orgânico não é a forma de acúmulo de novo de CO₂), enquanto a do malato produz apenas um mol de CO₂, por mol de piruvato formado. Dessa forma, a estocagem de citrato pode funcionar como um mecanismo suplementar para minimizar a fotorrespiração e a fotoinibição nas plantas CAM expostas às condições ambientais desfavoráveis (LÜTTGE, 1988, 2006; FRANCO *et al.* 1992).

Muitas plantas podem apresentar ambos os tipos de metabolismos fotossintéticos, C₃ ou CAM, alternando-os conforme variações nas condições ambientais ou fases do desenvolvimento (SLESLAK *et al.* 2003). A transição entre os tipos de assimilação de CO₂ pode ser induzida por estresse hídrico (FRESCHI *et al.*, 2010a), aumento da intensidade luminosa que atinge as folhas (MAXWELL *et al.* 1994; HASLAM *et al.* 2003; SLESLAK *et al.* 2003) ou por variações termoperiódicas (NIEVOLA *et al.* 2005). A mudança de C₃ para o CAM pode acontecer independentemente entre diferentes regiões da planta. Por exemplo, folhas opostas de um mesmo nó de *Clusia rosea* (Clusiaceae) foram submetidas a condições diferentes de umidade relativa do ar, constatando-se que o CAM foi induzido apenas nas folhas expostas ao ar seco (SCHMITT *et al.* 1998).

Um excelente modelo de estudo para esse tipo de transição metabólica é a utilização de folhas de *Guzmania monostachia*, uma bromélia epífita que pode alternar, em diferentes condições ambientais, entre os metabolismos C₃ e CAM. Ao contrário, a espécie *M. crystallinum* depois de convertida ao CAM não retorna mais à condição C₃ (MAXWELL *et al.* 1994; CUSHMAN & BORLAND, 2002).

Resultados obtidos em nosso laboratório mostraram diferenças significativas quanto à acidez, atividade da PEPC e da enzima malato desidrogenase (MDH) nas porções basal, mediana e apical das folhas de *Guzmania monostachia*. As maiores atividades das enzimas PEPC e MDH e de acidez foram observadas na porção apical, seguida da porção mediana das folhas dessa espécie quando submetidas ao estresse hídrico por falta d'água (FRESCHI *et al.* 2010a).

4) O CAM e o hábito epifítico

Epífitas são plantas que passam a maior parte ou toda a sua vida apoiadas em hospedeiros (BENZING, 1990). O substrato aéreo pode impor um estresse ambiental à sobrevivência desses indivíduos (BENZING *et al.*, 1978), os quais apresentam inúmeras adaptações morfológicas ou anatômicas que facilitam a ocorrência desses em ambientes epifíticos. O sucesso para a sobrevivência nesse ambiente está associado principalmente com mecanismos de balanço hídrico, nutrição e eficiente sistema reprodutivo (BENZING, 1990). Algumas das adaptações das plantas epífitas incluem eficiência no uso da água, metabolismo CAM, taxa de crescimento reduzida e eficiência no uso dos nutrientes (BENZING, 1990; DODSON, 2003; YODER *et al.*, 2010).

As espécies epífitas necessitam ajustar constantemente os mecanismos de balanço hídrico em todos os tecidos, por meio de respostas fotossintéticas e estomáticas apropriadas, para evitar injúrias irreversíveis decorrentes da deficiência hídrica. A resistência à seca observada na maioria das plantas epífitas é conferida em parte pela fotossíntese CAM, a qual promove uma maior eficiência no uso da água (BENZING & OTT, 1981).

Silveira *et al.* (2009) observaram uma significativa correlação entre a fotossíntese CAM e o hábito epifítico na família Orchidaceae. Por meio de análises de

$\delta^{13}\text{C}$ foi verificada a ocorrência de orquídeas CAM epífitas principalmente em regiões com baixa altitude (0- 500 metros) e baixo índice de pluviosidade (SILVEIRA *et al.* 2009; KERBAUY *et al.*, 2012).

5) O CAM e as citocininas

As citocininas constituem uma importante classe de hormônios vegetais, uma vez que regulam diversos aspectos do crescimento e desenvolvimento, incluindo divisão celular, dominância apical, formação dos cloroplastos, senescência de tecidos e órgãos, mobilização de nutrientes e atividade enzimática (MOK & MOK, 2001; SAKAKIBARA, 2006). Adicionalmente, as citocininas antagonizam muitos processos fisiológicos desencadeados pelo estresse hídrico ou salino, especialmente aqueles mediados pelo ácido abscísico (ABA), (POSPISILOVA *et al.*, 2000). Exemplos de eventos fisiológicos influenciados pelo antagonismo entre as citocininas e o ABA incluem o fechamento estomático, a abscisão de frutos e a senescência foliar (NAQVI, 1995). Além disso, a aplicação de citocininas reduz os efeitos negativos do estresse hídrico sobre o conteúdo de clorofilas e carotenóides, além de estimular a recuperação da fotossíntese líquida após a reidratação dos tecidos vegetais (POSPISILOVA *et al.*, 2000; VOMACKA & POSPISILOVA, 2003). Sabe-se, ainda, que plantas expostas às condições de baixa disponibilidade hídrica geralmente apresentam reduções consideráveis no conteúdo endógeno de citocininas (POSPISILOVA *et al.*, 2000).

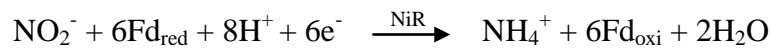
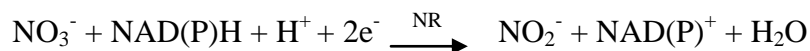
As respostas aos estresses ambientais (seca e estresse salino) são geralmente associadas com a redução na expressão de genes que codificam a enzima isopentenil transferase (IPT) e com a superexpressão de genes que codificam a enzima citocinina desidrogenase (CKX), responsável pela degradação de citocininas, o que resulta na diminuição no conteúdo de citocininas (HA *et al.*, 2012).

Alguns estudos já foram realizados para caracterizar a sinalização hormonal e molecular envolvida na transição ontogenética de um tipo de fotossíntese para o outro, principalmente em *Mesembryanthemum crystallinum* (Aizoaceae). No caso dessa espécie, a transição C₃-CAM é irreversível (CUSHMAN & BORLAND, 2002). Citocininas parecem atuar negativamente na indução do CAM, uma vez que a aplicação desse hormônio diminuiu a expressão do gene *Ppc1*, que codifica a enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) em *M. crystallinum* (PETERS *et al.* 1997). Já em relação ao ABA, é bem descrita a participação desse hormônio na indução ao CAM em *M. crystallinum* e *Kalanchoë blossfeldiana*, resultando na ativação do mesmo gene, o *Ppc1*, uma isoforma da PEPC específica do CAM (DAI *et al.* 1994; TAYBI *et al.* 1995; TAYBI & CUSHMAN 1999). Nesse processo, o Ca²⁺ está envolvido na sinalização (TAYBI & CUSHMAN, 1999), sendo ele um dos mensageiros secundários que participa da transdução do sinal do ABA (ARASIMOWICZ & FLORYZAK-WIECZOREK, 2007).

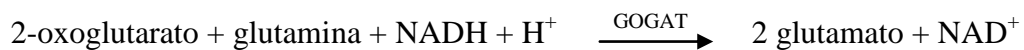
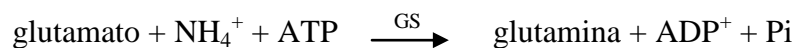
No entanto, a participação das citocininas como promotoras da indução do CAM também já foi relatada por alguns autores (SCHMITT & PIEPENBROCK, 1992; THOMAS *et al.*, 1992). THOMAS *et al.* (1992) constataram que a aplicação de 6-benziladenina (BA), zeatina (Z) ou isopenteniladenina (iP) no sistema radicular de plantas de *M. crystallinum* resultou em aumento dos teores da proteína da PEPC equivalente ao observado nas plantas induzidas ao CAM em resposta ao estresse salino. De modo similar, foi verificado que a adição de BA ao meio de crescimento de plantas dessa mesma espécie também resultou em aumento da atividade da enzima PEPC, assim como no acúmulo noturno de malato (DAI *et al.*, 1994).

6) Redutase do nitrato e citocininas

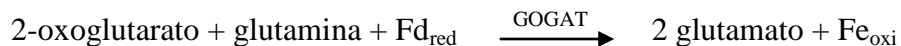
O nitrogênio presente no NO_3^- pode ser assimilado em aminoácidos pelas plantas apenas quando esse composto nitrogenado é reduzido a amônio. Isso ocorre, principalmente, nas folhas ou raízes e esse processo requer 8 elétrons (SODEK, 2004). A redução ocorre em duas etapas, cada uma envolvendo enzimas específicas, como a NR e a nitrito redutase (NiR):



O amônio (NH_4^+), por sua vez, pode ser incorporado em aminoácidos pela ação combinada da glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT). A GS é uma importante enzima do metabolismo do nitrogênio. Ela tem grande afinidade pela molécula de amônio e está presente em todos os tecidos vegetais (MIFLIN & HABASH, 2002).



ou



De modo surpreendente, a maior atividade da NR encontrada nas folhas da bromélia CAM constitutiva *Tillandsia pohliana* ocorreu durante o período de escuro; já na presença de luz, houve uma forte queda na atividade dessa enzima, indicando que nessa bromélia a atividade preferencial da NR ocorre durante a ausência de luz (NIEVOLA *et al.* 2001).

Foi observado para plantas de abacaxizeiro cultivadas *in vitro*, que a atividade da enzima NR foi menor nas folhas e significativamente maior nas raízes no período escuro, quando o tipo de fotossíntese passou de C₃ para CAM, por meio da indução termoperiódica (FRESCI *et al.*, 2009). Análises diurnas dos teores endógenos de citocininas mostraram que suas concentrações aumentaram coincidentemente com o acúmulo de transcritos da NR, precedendo o aumento da atividade dessa enzima nas raízes à noite (FRESCI *et al.* 2009).

Todavia, não está claro o quanto o uso de citocininas exógenas refletiria o papel fisiológico dessa classe hormonal na regulação da NR, já que em poucos estudos de indução dessa enzima foram quantificados os teores endógenos desse hormônio (SAMUELSON *et al.*, 1995). Em um dos poucos trabalhos a respeito, as citocininas endógenas foram quantificadas em suspensão de células de *Chenopodium rubrum* (PETERS *et al.*, 1995). Esses autores evidenciaram uma relação positiva entre os teores endógenos de citocininas e a atividade da NR ao longo do ciclo diurno, demonstrando que a zeatina ribosídica (ZR) foi o tipo mais relacionado à indução da atividade da NR em comparação às outras citocininas analisadas (iP, iPR, Z, (diH)Z, [9R](diH)Z).

II. OBJETIVOS

1. Objetivo geral

O presente trabalho teve por objetivo principal investigar uma possível regulação da atividade das enzimas PEPC e NR por citocininas em folhas destacadas da bromélia epífita com tanque, *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae) induzidas ao CAM.

2. Estratégias experimentais

1)- Verificar a dinâmica temporal da perda de água em diferentes porções (base e ápice) de folhas destacadas de *G. monostachia* quando mantidas em solução de polietilenoglicol 6000 (PEG) na concentração de 30%.

2)- Analisar o grau de expressão do CAM nas porções foliares basal e apical de *G. monostachia*, por meio da análise do teor de acidez titulável, atividade da enzima malato desidrogenase (MDH), quantificação de ácidos orgânicos (malato e citrato) e quantificação de amido, quando as folhas destacadas foram submetidas à deficiência hídrica por sete dias.

3)- Caracterizar o ciclo diurno da atividade da enzima NR nas porções foliares basal e apical de *Guzmania monostachia*, submetidas à deficiência hídrica por sete dias.

4)- Analisar o ciclo diurno da GS na porções foliares basal e apical de *Guzmania monostachia* submetidas à deficiência hídrica por sete dias.

5)-Caracterizar o ciclo diurno da atividade da enzima PEPC nas porções foliares basal e apical de *Guzmania monostachia* submetidas à deficiência hídrica por sete dias.

6)- Quantificar os teores endógenos de citocininas nas porções foliares basal e apical de *G. monostachia*, quando as plantas foram submetidas à deficiência hídrica por sete dias.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1) Material vegetal

Nos experimentos foram utilizadas plantas de *Guzmania monostachia* (L.) Rusby ex Mez jovem-adultas (2,5 anos) crescidas inicialmente em sala de cultivo *in vitro* em meio de cultura que continha os macronutrientes da formulação de “Knudson” (KNUDSON, 1946) e os micronutrientes da formulação de “Murashige e Skoog” (MURASHIGE & SKOOG, 1962), além de carbonato de cálcio, na concentração de $0,5\text{g.L}^{-1}$, como agente tamponante do meio de cultura (EL-D *et al.*, 1979) (**Anexo-Tabela 2**). As plantas foram mantidas nesse meio de crescimento, sendo que foram realizadas trocas periódicas do meio de cultura a cada 6 meses para evitar o esgotamento dos nutrientes do mesmo, permitindo um crescimento adequado das plantas até atingirem a altura de 2 a 5 cm. Posteriormente, essas plantas foram transferidas para o cultivo em casa de vegetação situada no fitotério do Departamento de Botânica do IBUSP. Para as análises bioquímicas foram utilizadas as folhas pertencentes ao oitavo, nono, décimo, décimo primeiro e décimo segundo nós das plantas jovem-adultas. Essas foram divididas em três porções e as regiões apical e basal das folhas foram utilizadas (**Figura 1**).

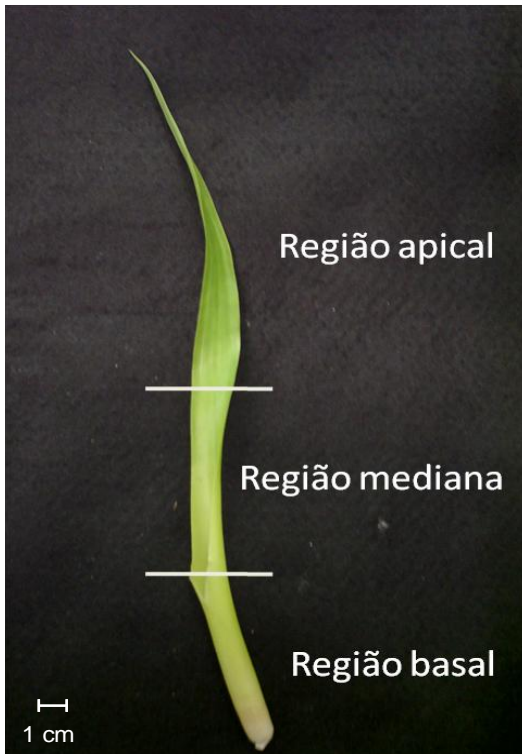


Figura 1: Folha de *G. monostachia* subdividida em três porções: basal, mediana e apical. Os experimentos foram conduzidos com as regiões basal e apical.

2) Indução ao CAM em plantas inteiras

Para induzir ao CAM, 12 plantas jovens de *G. monostachia* foram mantidas em câmara de crescimento durante 28 dias com fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Nesse experimento, 6 plantas foram mantidas sem adubação foliar e as demais foram adubadas semanalmente com adubo comercial “SuperGreen” (Nitrogênio 6%, P_2O_5 6% e K_2O 6%). Após esse período experimental foram retiradas as porções foliares apicais do oitavo ao décimo segundo nós para análises de acidez titulável.

3) Indução ao CAM em folhas destacadas

Para induzir ao CAM, folhas destacadas de plantas adultas foram submetidas ao déficit hídrico utilizando-se 30% de PEG 6000 ($\Psi\pi = -1,83 \text{ MPa}$) por sete dias. Nesse

período, as folhas foram mantidas em frascos do tipo borel contendo um volume de 10 mL de PEG 30% dissolvido em água (300 g de PEG para 1L de água) ou somente água destilada, onde as bases foliares ficaram submersas (**Figura 2**). Uma pequena parte da região basal das folhas ficou submersa durante o experimento, tendo sido, portanto, descartada para as análises bioquímicas. Os boréis, contendo as folhas destacadas, foram mantidos em câmara de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar de 60-70% e fotoperíodo de 12 horas, com intensidade luminosa de $200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

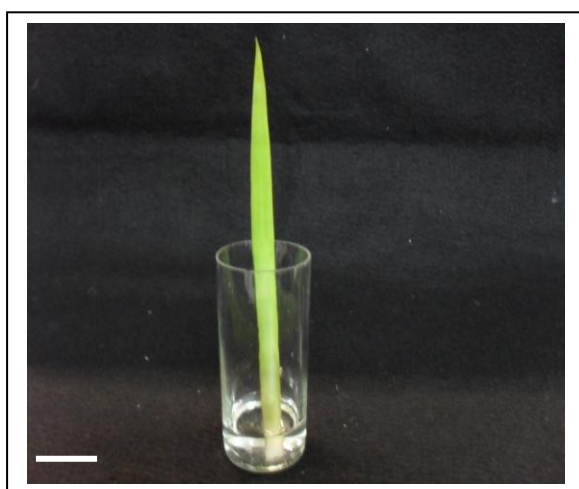


Figura 2: Folha de *Guzmania monostachia* mantida em borel com 10 mL de PEG 30% ou água. Barra= 3cm

Nos experimentos com folhas isoladas, as mesmas foram divididas em três porções após o período experimental, sendo que apenas duas porções foram utilizadas nos experimentos: a basal (correspondente a um tecido com pouca clorofila) e a apical (porção verde da lâmina foliar). A porção mediana foi sempre descartada.

Após uma semana de deficiência hídrica, foram feitas análises a fim de verificar a indução ao CAM, como acidez titulável, quantificação de ácidos orgânicos, quantificação de amido e atividades das enzimas PEPC e da MDH. Além dessas,

análises da atividade das enzimas do metabolismo do nitrogênio (GS e NR) e quantificação de citocininas endógenas foram realizadas.

4) Determinação do conteúdo relativo de água

Para as diferentes porções das folhas destacadas foram determinadas as massas fresca, seca e a túrgida em discos com área foliar de 1cm². Esses discos foram pesados imediatamente após a coleta para determinar a massa fresca (MF), em seguida, esses mesmos segmentos foram colocados em uma placa de Petri com água durante 24 horas. Após esse período os segmentos das diferentes porções foliares foram pesados (secando-os previamente com papel filtro assim retirando o excesso d'água) para a determinação da massa túrgida (MT). Finalmente os segmentos foram mantidos durante 72 horas em uma estufa a 60°C e posteriormente pesados para determinação da massa seca (MS).

Com os resultados, foi determinado o conteúdo relativo de água (CRA) por meio da seguinte equação:

$$\text{CRA(\%)} = (\text{MF} - \text{MS} / \text{MT} - \text{MS}) \times 100$$

5) Acidez titulável

Para a quantificação da acidez titulável, amostras de 0,5 g de massa fresca da base e do ápice das folhas foram maceradas em nitrogênio líquido, homogeneizadas com 20 ml de água ultrafiltrada (Milli-Q) fervida e incubadas por 15 minutos em banho-maria a 100°C. Após a filtragem, a solução foi analisada quanto à acidez por meio de titulação com 20 mM de NaOH até o pH 11 (FRESCHI *et al.* 2010a). As medidas foram feitas em triplicatas e os resultados foram expressos em micromoles de H⁺ por grama de massa seca (μmol H⁺ g⁻¹ MS).

6) Quantificação de ácidos orgânicos

Amostras das porções basal e apical de folhas, com aproximadamente, 0,5 g de massa fresca foram maceradas em nitrogênio líquido e transferidas para tubos do tipo “Eppendorf®” de 2 mL. Após a transferência de todo o material vegetal macerado, foi adicionado 1 mL de água ultrapurificada. Posteriormente, os microtubos (2 mL) foram agitados em vórtex e centrifugados em centrífuga de bancada a 4°C e 13.000 rpm durante 10 minutos. Após a separação das fases, o sobrenadante foi retirado e filtrado em filtros de 0,22 µm (Millex GV-Milipore), e posteriormente, guardado em vials. Os ácidos orgânicos no sobrenadante foram analisados por HPLC (cromatografia líquida de alta resolução)-DAD (Diode Array Detector), de acordo com o método utilizado por AMORÓS *et al.* (2003).

Uma alíquota de 50 µL do sobrenadante foi injetada no HPLC (Hewlett-Packard, série 1100, Waldbrom, Germany) equipada com uma coluna C-610H Supelcogel (30 cm X 7,8 mm) aquecida a 30°C e um detector de UV-V (210 nm, para análise de ácidos orgânicos). O sistema de eluição consistiu de 0,1% H₃PO₄, correndo isocraticamente a um fluxo de 0,5mL/min. Curvas de calibração externa foram utilizadas para determinar a concentração de ácidos orgânicos individuais na amostra. As curvas de padrões utilizadas foram as de ácido málico e ácido cítrico. Os resultados foram expressos em miligrama de malato por grama de massa seca ou miligrama de citrato por grama de massa seca. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, sendo os resultados expressos em microgramas de malato ou citrato por grama de massa seca (µg g⁻¹ MS).

7) Quantificação dos teores endógenos de amido

A metodologia empregada para a quantificação de amido foi baseada em AMARAL *et al.* (2007). Inicialmente, foi coletado 0,5 g de material fresco de cada

porção foliar (basal e apical) proveniente de uma mistura contendo fragmentos de diferentes folhas. Esse material foi macerado em almofariz com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Esse pó foi transferido para um tubo do tipo “Eppendorf®” e mantido em um liofilizador até que o material estivesse completamente desidratado. Finalizado esse período, coletou-se uma amostra de 0,01 g de massa seca de cada porção para extrair os carboidratos solúveis. O material foi transferido para tubos do tipo “Eppendorf®”, aos quais foram acrescentados 1,5ml de etanol 80%, em banho-maria a 80°C por 20 minutos. Terminado esse período, os tubos foram retirados do banho e centrifugados em uma ultracentrífuga de bancada por 10 minutos. Após as sucessivas extrações com etanol 80% (seis extrações), o precipitado foi mantido durante 24 horas em uma estufa a 45°C, até estar totalmente seco. Após esse procedimento, foi adicionado ao precipitado seco de cada amostra 500µl da enzima alfa-amilase termoestável de *Bacillus licheniformis* (cód. E-anaam, Megazyme, Irlanda) na concentração de 120U/ml, diluída em tampão MOPS 10 mM, pH 6,5. Todos os tubos do tipo “Eppendorf®” foram agitados em vórtex e incubados em banho a 75°C por 30 minutos. Terminado esse tempo, foram adicionados mais 500µl da enzima alfa-amilase termoestável, diluída em tampão MOPS 10 mM. Todos os tubos foram agitados em vórtex e incubados a 75°C por mais 30 minutos.

Finalizada essas duas incubações, os tubos foram retirados do banho. Acrescentaram-se em cada amostra 500µl da enzima amiloglucosidase (EC 3.2.1.3) de *Aspergillus niger* (cód. E-amgpu, Megazyme, Irlanda) na concentração de 30U/ml, em tampão acetato de sódio 100mM pH 4,5. Os tubos foram agitados em vórtex e incubados em banho-maria a 50°C por 30 minutos. Após esse período, foram adicionados novamente 500µl da enzima amiloglucosidase diluída em tampão acetato de sódio 100mM. Todos os tubos foram agitados em vórtex e incubados a 50°C por 30

minutos. A reação foi parada com a adição de 100µl de ácido perclórico 0,8M. As amostras foram agitadas cuidadosamente e centrifugadas em ultracentrífuga de bancada a 10000 rpm por 4 minutos na temperatura ambiente.

Numa placa de imunotitulação (“ELISA”) foi preparada uma curva padrão de glicose em triplicata com as seguintes concentrações: 0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 12,0 µg de glicose/µl. Alíquotas de 20µl das amostras centrifugadas da porção foliar basal e alíquotas de 10 µl das amostras centrifugadas da porção foliar apical foram dispostas em hexaplicata. Em seguida, foram acrescentadas em cada depressão da placa 250µl do reagente glicose PAP liquiform 1 (“Labtest”), contendo as enzimas glucose-oxidase e peroxidase, além de 4-aminoantipirina e fenol. Neste sistema, a glucose-oxidase catalisa a oxidação da glicose. O peróxido de hidrogênio formado na reação reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento formando a antipirilquinonimina vermelha, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose na amostra (AMARAL *et al.*, 2007). A placa foi incubada em banho a 30°C por 15 minutos. Finalizado esse tempo, a placa foi lida em espectrofotômetro para placas do tipo “ELISA” a 492nm. As medidas foram feitas em triplicatas e o conteúdo de amido foi expresso em microgramas de hexose por grama de massa seca ($\mu\text{g hexose g}^{-1}\text{ MS}$).

8) Determinação da atividade da MDH

A determinação da atividade da MDH foi realizada com base no método *in vitro* descrito por FRESCHI *et al.*, (2010a). Nesse ensaio, amostras das porções basal e apical de folhas (1g MF) foram coletadas a cada 3 horas durante um ciclo diuturno. Elas foram maceradas em nitrogênio líquido e, em seguida imersas em 5 mL do tampão de extração (pH 8), composto por 200 mM de Tris-HCl, 10 mM de MgCl₂, 5 mM de DTT, 1 mM de

EDTA, 0,5% (m/v) BSA e 10% (v/v) de glicerol. As amostras foram submetidas a uma centrifugação de 15.000 rpm por 2 minutos a 4°C (Sorvall® Instruments - rotor SM-24). O sobrenadante resultante foi coletado e, em seguida, passado por uma coluna SEPHADEX PD10/G-25. O extrato coletado foi utilizado para verificar a atividade enzimática. A atividade da MDH foi ensaiada no sentido da redução do oxaloacetato (OAA) em 2 mL de um meio de reação contendo 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM MgCl₂, 0,2 mM NADH e 2 mM OAA. A reação foi iniciada pela adição de 400 µL de extrato vegetal. A atividade foi baseada no consumo de NADH quantificado em espectrofotômetro (340 nm) no momento inicial da reação e após 4 minutos.

9) Determinação da atividade da PEPC

A determinação da atividade da PEPC foi realizada pelo método *in vitro* conforme descrito por NIEVOLA *et al.* (2005) e adaptado para bromélia *Guzmania monostachia* (FRESCHI *et al.*, 2010a). Para tanto, amostras das porções basal e apical de folhas (1g MF) foram coletadas a cada 3 horas durante um ciclo diurno, sendo maceradas em nitrogênio líquido. Em seguida, foram adicionados 5 mL do tampão de extração (pH 8), composto por 200 mM de Tris-HCl, 10 mM de MgCl₂, 5 mM de ditioneitol (DTT), 1 mM de EDTA, 0,5% (m/v) albumina bovina (BSA) e 10% (v/v) de glicerol. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 15.000 rpm por 2 minutos a 4°C (Sorvall® Instruments - rotor SM-24). O sobrenadante resultante foi coletado e, em seguida, passado por uma coluna SEPHADEX PD10/G-25. O extrato coletado foi utilizado para verificar a atividade enzimática. A atividade da PEPC foi ensaiada a 30°C em 2 mL de um meio de reação contendo 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaHCO₃, 20 mM NADH e 3 mM fosfoenolpiruvato (PEP). A reação foi iniciada pela adição de 200 µL do extrato. A atividade enzimática

foi baseada no consumo de NADH quantificado em espectrofotômetro (340 nm) no momento inicial da reação e após 4 minutos.

10) Determinação da atividade da NR

A análise da atividade *in vivo* da NR foi baseada no método descrito por JAWORSKI (1974) adaptado para bromélias (TAKAHASHI & MERCIER, 2011). Duas horas antes do início do período iluminado da câmara de crescimento, foi acrescentado nitrato de potássio (6,094 mM) aos boréis contendo o PEG (deficiência hídrica) e também nos que continham água (controle), visando à disponibilização do substrato à enzima NR. A cada 3 horas do ciclo diuturno, porções foliares basal e apical foram fragmentadas para a obtenção de 1g de massa fresca de cada uma delas. Foram adicionados em cada tubo 6 mL da solução de incubação previamente desaerada, contendo tampão fosfato (KH_2PO_4 0,1 M, pH 7,5; NaOH 0,1M), KNO_3 (50 mM) e n-propanol (3%, previamente aquecido). A amostra foi infiltrada a vácuo por 3 vezes de 1 minuto e alíquotas de 1 mL foram coletadas em seguida para determinar o nitrito no tempo zero. O restante foi mantido em banho-maria à temperatura de 30°C por 1 hora. Ao final da incubação, alíquotas de 1 mL foram coletadas para a determinação do nitrito no tempo de 60 minutos. O experimento foi realizado em triplicata.

O método empregado para medir o nitrito formado foi o descrito por HAGEMAN & REED (1980). Alíquotas de 1 mL da solução-problema foram adicionadas de 0,3 mL da solução de sulfanilamida (1% em HCl) seguido de 0,3 mL da solução de n-naftil-etileno-diamino (0,02%). As frações ficaram em repouso por mais 30 minutos, no escuro e em temperatura ambiente. Ao final desse período, foi realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. A atividade da NR

foi expressa em μmoles de nitrito produzido por hora por grama de massa seca ($\mu\text{moles} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MS}$)

11) Determinação da atividade da GS

A análise da atividade *in vitro* da GS foi baseada no método descrito por TAKAHASHI & MERCIER, 2011. Duas horas antes do início do período iluminado da câmara de crescimento, foi acrescentado nitrato de potássio (6,094 mM) aos boréis contendo o PEG 30% e também nos que continham água. A cada 3 horas do ciclo diurno, porções foliares basal e apical foram fragmentadas para a obtenção de 0,5 g de massa fresca de cada uma delas. Elas foram maceradas em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Esse foi, então, transferido para tubos de centrifugação, previamente resfriados, aos quais foram acrescentados 4,5ml de uma solução composta por tampão imidazol 0,05M, pH 7,9 e ditioneitol (DTT) 5mM. Essas amostras foram submetidas a uma centrifugação de 11.000 rpm a 4°C por 20 minutos. O volume total da reação enzimática foi 0,5ml e continha: 0,1mM de tampão imidazol pH 7,5, 49mM de hidroxilamina, 40mM de MgCl_2 , 192mM de glutamato e 50mM de ATP. A reação foi iniciada com a adição de 150 μl do extrato enzimático, sendo que a incubação ocorreu a 30°C e foi interrompida após 60 minutos com a adição de 1 ml da solução de parada de reação (“stop mix”), contendo: 0,37M de cloreto férrico, 0,67M de HCl e 0,20M de ácido tricloroacético. Em cada início de reação (adição do extrato), bem como término (adição do cloreto férrico), os tubos foram submetidos à agitação vigorosa em vórtex.

Foram também preparados tubos correspondentes ao tempo zero, ou seja, nesses a adição da solução de parada de reação ocorreu em seguida à deposição do extrato, interrompendo, assim, a reação. O valor de absorvância do tempo zero foi descontado do valor da absorvância obtido para aqueles tubos que permaneceram 60 minutos sob

incubação. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 540 nm. A curva padrão foi obtida com soluções de diferentes concentrações de γ -glutamil-hidroxamato (de 0 a 2mM). Todas as medidas foram realizadas em triplicatas e expressas em μmoles de γ -glutamil-hidroxamato produzido por minuto por grama de massa seca ($\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ MS).

12) Quantificação dos teores endógenos de citocininas

Amostras de diferentes porções foliares (basal e apical) com cerca de 0,5 g de massa fresca, foram maceradas com nitrogênio líquido e homogeneizadas com 5 mL de metanol 80% resfriado, adicionado de 146 μM butilhidroxitolueno (BHT). O experimento foi realizado utilizando material coletado em um ciclo diurno. A cada amostra foram adicionados 100 μL de Z radioativa (25 Ci mmol^{-1} de [^3H]Z), visando quantificar as perdas ocorridas durante o processo de purificação. As amostras permaneceram sob agitação durante 60 h a 4°C, sendo em seguida filtradas através de membranas de nitrocelulose de 0,45 e de 0,22 μm de porosidade e por uma coluna Sep-Pack C18. O filtrado foi concentrado por evaporação a vácuo e submetido ao fracionamento em HPLC. As frações correspondentes ao tempo de retenção dos padrões hormonais foram coletadas e destinadas à quantificação dos teores de zeatina (Z), zeatina ribosídica ([9R]Z), isopenteniladenina (iP) e isopenteniladenina ribosídica ([9R]iP) por imunoenensaio (ELISA) conforme descrito por FRESCHI *et al.*, (2010c). Para tanto, as frações separadas por HPLC correspondentes a essas citocininas foram secas em liofilizador e, em seguida ressuspensas em 400 μL de água ultrafiltrada. Alíquotas das frações correspondentes a Z e [9R]Z foram analisadas com anticorpos policlonais contra [9R]Z. As frações correspondente ao iP e [9R]iP foram analisadas com anticorpos policlonais contra [9R]iP. Os teores de cada hormônio foram medidos

quatro vezes em cada amostra e os resultados foram corrigidos segundo a recuperação do padrão radioativo [³H]Z em cintilômetro. O conteúdo de citocininas foi expresso como pmol de hormônio por grama de massa seca (pmol g⁻¹ MS).

13) Aplicação de citocininas-livres (Z e iP)

Foi adicionado 1µM das citocininas-livres, zeatina (Z) ou isopenteniladenina (iP), nos boréis contendo folhas destacadas mantidas em PEG 30% ou água por 6 horas. Após esse período foram coletadas amostras das porções foliares basal e apical para verificar as atividades das enzimas NR e PEPC, respectivamente.

14) Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância multifatorial (ANOVA) e a comparação de médias foi realizada por meio do teste T-student (p<0,05) (GOMES, 1984).

IV. RESULTADOS

1) Efeito da adubação de plantas de *G. monostachia* sobre a transição C₃-CAM

Em um dos experimentos preliminares realizado neste trabalho, 14 plantas de *G. monostachia* foram mantidas em câmara de crescimento durante 28 dias, com intensidade luminosa de $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e regadas 3 vezes por semana. Esse fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (FFFA) foi considerado por nós como sendo um fator estressante, já que normalmente cultivamos as bromélias em $200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Metade dessas plantas foram adubadas semanalmente com solução nutritiva comercial “Supergreen” (NPK 6:6:6) durante todo o período do experimento. Nessas condições, as plantas apresentaram uma redução no teor de acidez titulável na porção apical da folha (maior expressão do CAM) ao longo dos dias, enquanto as plantas-controle (não adubadas) apresentaram um aumento no acúmulo noturno de ácidos nessa mesma porção foliar (**Figura 3**).

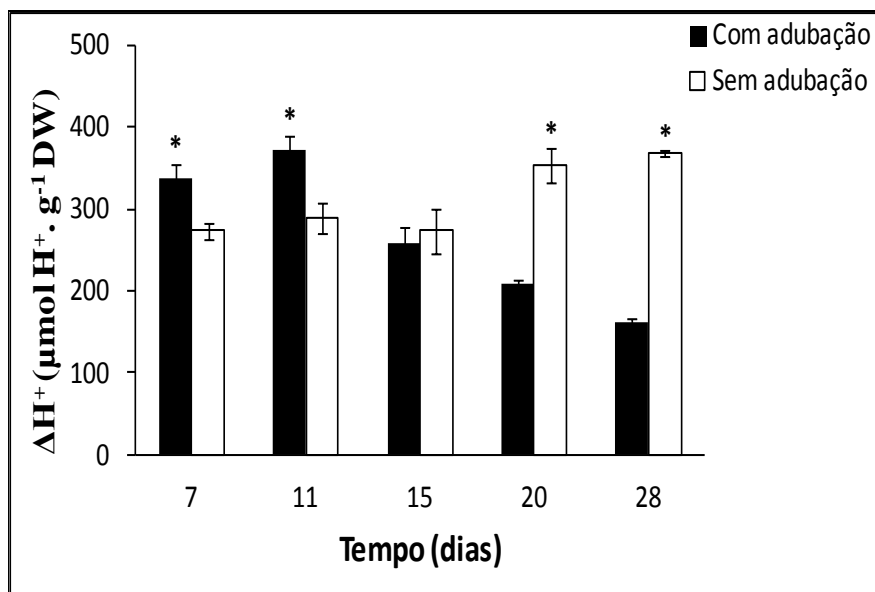


Figura 3: Acúmulo noturno de acidez no ápice das folhas destacadas de plantas de *Guzmania monostachia* adubadas ou não com fertilizante comercial “SuperGreen” mantidas em câmara de crescimento a $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 28 dias. Os asteriscos indicam que houve diferença significativa entre o tratamento e o controle para cada tempo de coleta, segundo o teste T de Student em nível de 5% de significância.

2) Avaliação do status hídrico em folhas de *G. monostachia*

Folhas isoladas foram mantidas durante 7 dias em boréis contendo PEG 30% ou água (controle). A **Figura 4** mostra os conteúdos relativos de água (expressos em porcentagem) nas porções foliares basal e apical de *G. monostachia* acompanhados durante o período que essas foram mantidas em PEG 30% ou água. Pode-se notar que o conteúdo relativo de água nas porções basal e apical das folhas mantidas em PEG 30% (**Figura 4A**) apresentou uma redução significativa a partir do primeiro dia, indicando que o uso do PEG foi eficiente para a indução do déficit hídrico nessas folhas. No ápice foliar foi observada uma redução no status hídrico de 35% no primeiro dia de exposição ao PEG 30%, enquanto na porção basal essa redução foi de 31%. De modo interessante, o conteúdo relativo de água, no sétimo dia, mostrou uma redução de aproximadamente 41% na porção basal e 46% no ápice, quando as folhas de *G. monostachia* foram

submetidas à deficiência hídrica. Dessa forma, as duas regiões das folhas mantidas em PEG 30% apresentaram reduções significativas no conteúdo relativo de água quando comparadas às folhas-controle.

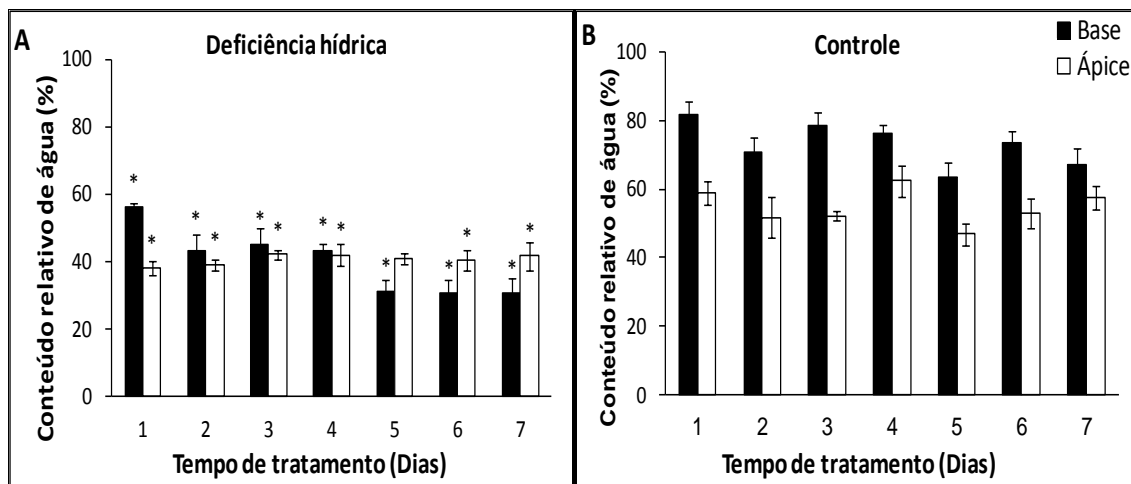


Figura 4: Conteúdo relativo de água nas porções foliares basal e apical de *Guzmania monostachia* mantidas em PEG 30% (A) ou em água (B) durante 7 dias em câmara de crescimento. Os asteriscos indicam que houve diferença significativa entre o tratamento e o controle para cada tempo de coleta, segundo o teste T de Student em nível de 5% de significância.

3) Parâmetros para verificar a expressão do CAM

3.1) Variação no teor de acidez titulável

A **Figura 5** mostra a variação no teor de acidez titulável (diferença entre o acúmulo de ácidos orgânicos durante o final do período escuro e final do período iluminado). Foi observado um aumento significativo no acúmulo noturno de ácidos nas porções apical e basal de folhas mantidas em PEG 30%, comparadas às mesmas porções foliares mantidas em água. O aumento noturno de ácidos nas porções apical e basal das folhas submetidas à deficiência hídrica foi, aproximadamente, quatro vezes maior que na porção apical e basal das folhas-controle.

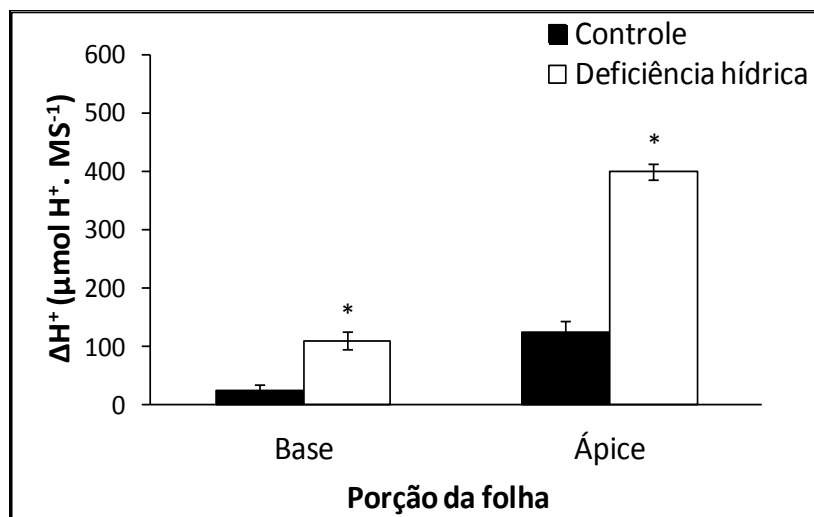


Figura 5: Acúmulo noturno de acidez nas porções foliares basal e apical de *Guzmania monostachia* mantidas em PEG 30% (A) ou em água (B) durante 7 dias em câmara de crescimento. Os asteriscos indicam que houve diferença significativa entre o tratamento e o controle para cada uma das porções foliares, segundo o teste T de Student em nível de 5% de significância.

3.2) Quantificação de malato e citrato

De acordo com a **Figura 6**, os principais ácidos orgânicos acumulados nas porções apical e basal de folhas de *Guzmania monostachia* são malato e em menor quantidade, o citrato. Esses ácidos acumularam-se, preferencialmente, na porção apical de folhas sob déficit hídrico, durante o período noturno. Na porção basal das folhas sob deficiência hídrica o conteúdo de malato apresentou pequenas variações ao longo de ciclo diuturno (**Figura 6A**), enquanto os níveis de citrato apresentaram maiores oscilações durante o período noturno (**Figura 6C**).

Não se observou o acúmulo noturno de ácidos orgânicos na porção foliar apical quando as folhas foram mantidas em água (**Figuras 6B e 6D**). O conteúdo de malato na porção foliar basal não apresentou grandes variações ao longo do ciclo diuturno (**Figura 6B**). Todavia, o conteúdo de citrato apresentou um pequeno aumento ao longo do período noturno na porção foliar basal das folhas-controle (**Figura 6D**).

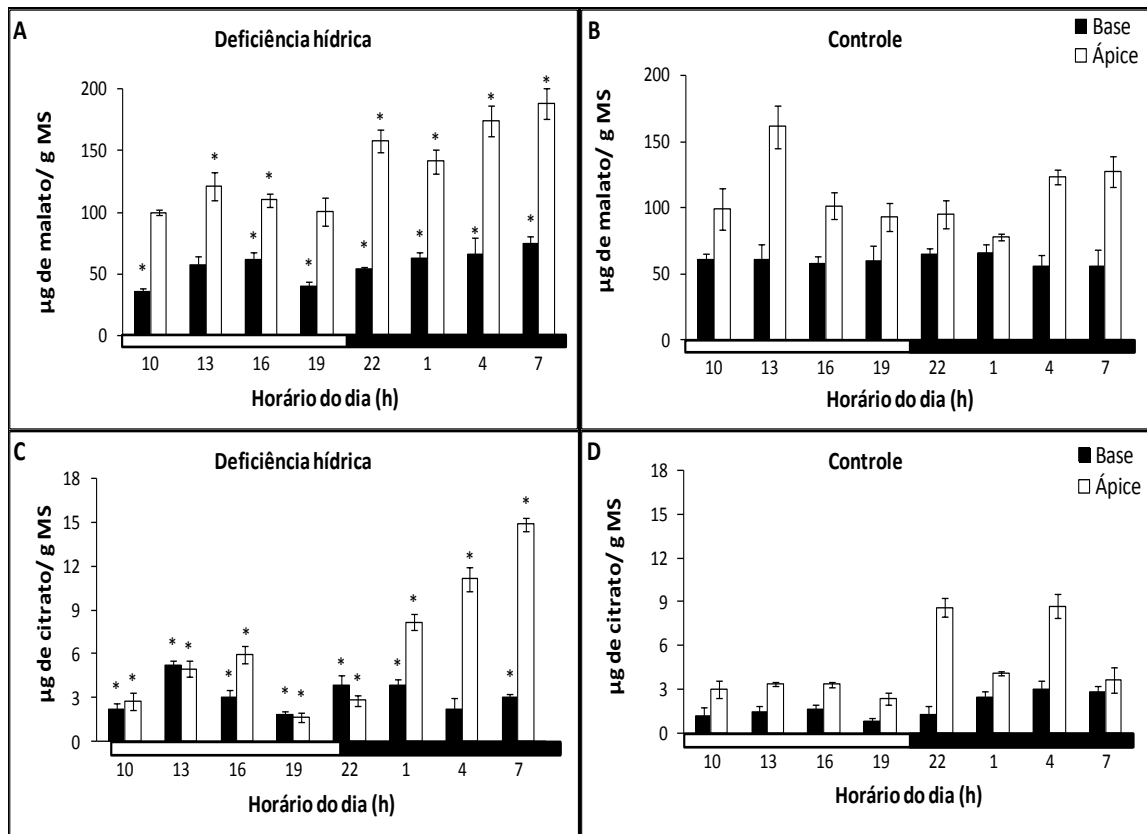


Figura 6: Quantificação de malato e citrato ao longo de 24 horas, nas porções foliares basal e apical de *Guzmania monostachia* mantidas em PEG 30% (A e C) ou em água (B e D) durante 7 dias em câmara de crescimento. Os asteriscos indicam que houve diferença significativa entre o tratamento e o controle para cada tempo de coleta, segundo o teste T de Student em nível de 5% de significância.

3.3) Quantificação do conteúdo endógeno de amido

Como pode ser observado na **Figura 7**, o conteúdo de amido foi sempre maior na porção apical das folhas mantidas em PEG 30% ou água. Verificou-se um acúmulo diurno de amido na porção foliar apical, ocorrendo uma redução no conteúdo desse carboidrato durante o período noturno (**Figura 7A**). A somatória do conteúdo de amido na porção apical das folhas mantidas em PEG 30% mostrou que o acúmulo desse polissacarídeo durante o período iluminado correspondeu a, aproximadamente, 60% do total estocado durante o ciclo diurno. Na porção basal dessas mesmas folhas houve

pequenas variações nos níveis endógenos de amido ao longo do ciclo diuturno e não foi observado o acúmulo desse polissacarídeo durante o período iluminado.

Pôde-se observar, ainda, uma redução no conteúdo de amido na porção foliar apical, ao longo do período noturno e um aumento ao longo do período diurno (**Figura 7B**). Todavia, a diminuição durante o período escuro foi menor do que a observada no ápice das folhas sob déficit hídrico. Na porção basal das folhas-controle, o conteúdo de amido apresentou pequenas oscilações com um aumento às 22 horas do ciclo diuturno.

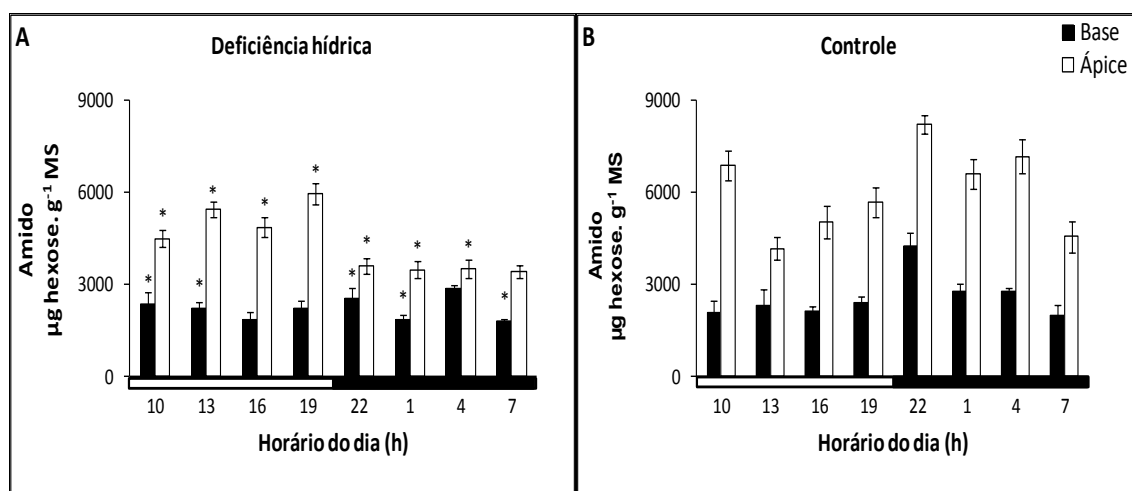


Figura 7: Quantificação de amido endógeno nas porções foliares basal e apical de *Guzmania monostachia* mantidas em PEG 30% (A) ou em água (B) durante 7 dias em câmara de crescimento. Os asteriscos indicam que houve diferença significativa entre o tratamento e o controle para cada tempo de coleta, segundo o teste T de Student em nível de 5% de significância.

3.4) Atividade *in vitro* da enzima MDH

Outro parâmetro utilizado para verificar a expressão do CAM foi a atividade *in vitro* da enzima MDH realizada em um ciclo diuturno. Como mostra a **Figura 8**, a atividade da MDH foi sempre maior na porção apical das folhas sob deficiência hídrica ou folhas-controle. A **Figura 8A** mostra um pico de atividade da MDH às 22 horas

(início do período noturno) nas porções foliares basal e apical. Contudo, a atividade dessa enzima na porção apical foi, aproximadamente, 2 vezes maior que na porção basal. Nas folhas-controle, o pico de atividade da MDH também foi verificado às 22 horas para ambas as porções foliares (**Figura 8B**).

Apesar do padrão de atividade da MDH ter se mantido nas folhas-controle ou sob déficit hídrico, a atividade dessa enzima foi sempre, cerca de 1,5 vezes maior no ápice das folhas sob deficiência hídrica quando comparado com a mesma região das folhas-controle. A atividade da MDH na porção basal das folhas sob déficit hídrico foi de 1,4 a 6 vezes maior do que nas folhas mantidas em água.

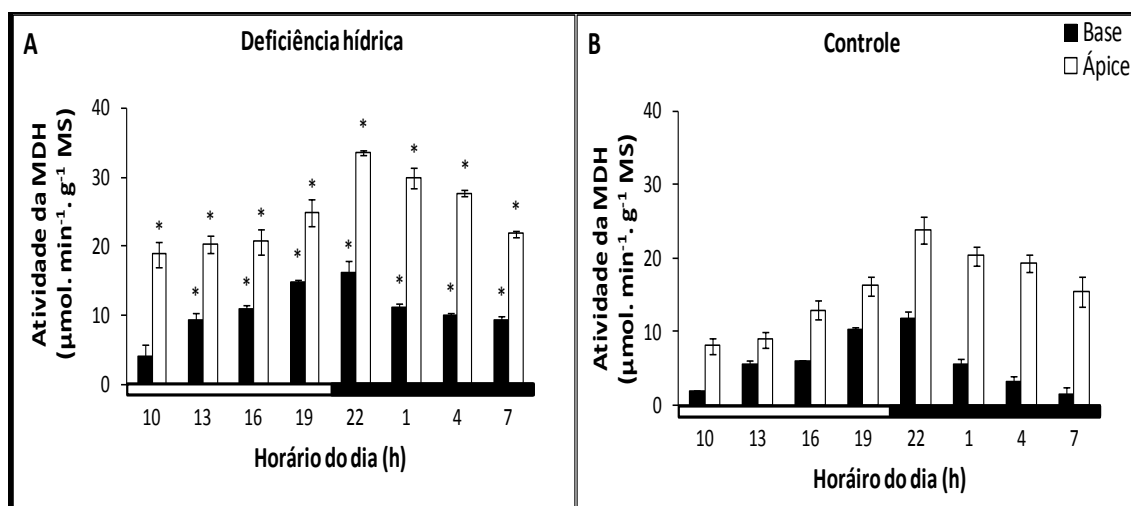


Figura 8: Atividade da enzima malato desidrogenase (MDH) em um ciclo diuturno, nas porções foliares basal e apical de *Guzmania monostachia* mantidas em PEG 30% (A) ou em água (B) durante 7 dias em câmara de crescimento. Os asteriscos indicam que houve diferença significativa entre o tratamento e o controle nos diferentes horários de coleta, segundo o teste T de Student em nível de 5% de significância.

4) Mudanças diurnas na atividade das enzimas PEPC, NR e GS

4.1) Atividade *in vitro* da enzima PEPC

A atividade *in vitro* da enzima PEPC foi sempre maior na porção apical das folhas, seja sob deficiência hídrica ou no controle. Pôde-se observar um pico de atividade da PEPC às 22 horas na porção apical das folhas mantidas sob déficit hídrico (Figura 9A). Para as folhas-controle, observou-se uma tendência de aumento da atividade da PEPC na região apical a partir do final do período iluminado até o início do escuro (Figura 9B).

A atividade da PEPC no ápice das folhas sob déficit hídrico foi cerca de 1,1 a 2,5 vezes maior do que a observada na mesma porção das folhas-controle. A atividade total dessa enzima durante o período noturno, na porção apical das folhas mantidas sob deficiência hídrica foi 39% maior que a atividade verificada na mesma porção das folhas mantidas em água durante esse período.

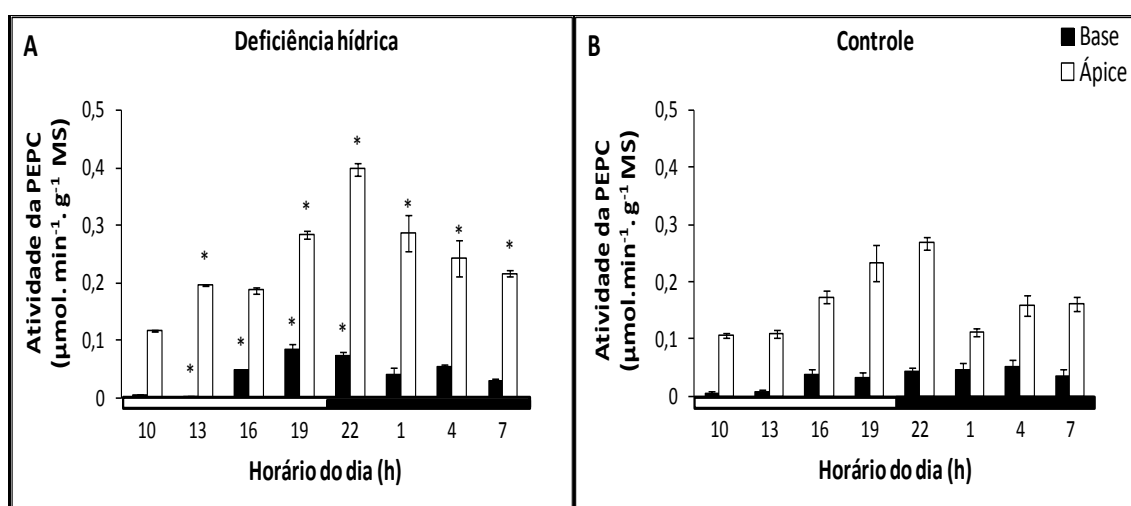


Figura 9: Atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) em um ciclo diurno, nas porções foliares basal e apical de *Guzmania monostachia* mantidas em PEG 30% (A) ou em água (B) durante 7 dias em câmara de crescimento. Os asteriscos

indicam que houve diferença significativa entre o tratamento e o controle nos diferentes tempos de coleta, segundo o teste T de Student em nível de 5% de significância.

4.2) Atividade *in vivo* da enzima NR

A **Figura 10** mostra a atividade *in vivo* da enzima NR. Por meio dela pôde-se notar que essa atividade está predominantemente associada com a porção basal das folhas de *G. monostachia*. A maior atividade dessa enzima nas folhas submetidas ao déficit hídrico ocorreu durante o período noturno, principalmente das 22 às 04 horas, com uma diminuição durante o período claro do ciclo diuturno (**Figura 10A**). Nas folhas-controle, o pico de atividade da NR foi observado a 01 hora, sendo que a atividade dessa enzima foi, em geral, elevada durante todo o período noturno, apresentando uma diminuição mais acentuada no início do período claro (**Figura 10B**).

Apesar da atividade da enzima NR prevalecer na porção foliar basal do tratamento e do controle, essa atividade foi sempre maior nas bases das folhas mantidas em água, quando comparada à mesma região das folhas sob deficiência hídrica, mostrando que a escassez de água causou uma restrição à atividade da NR.

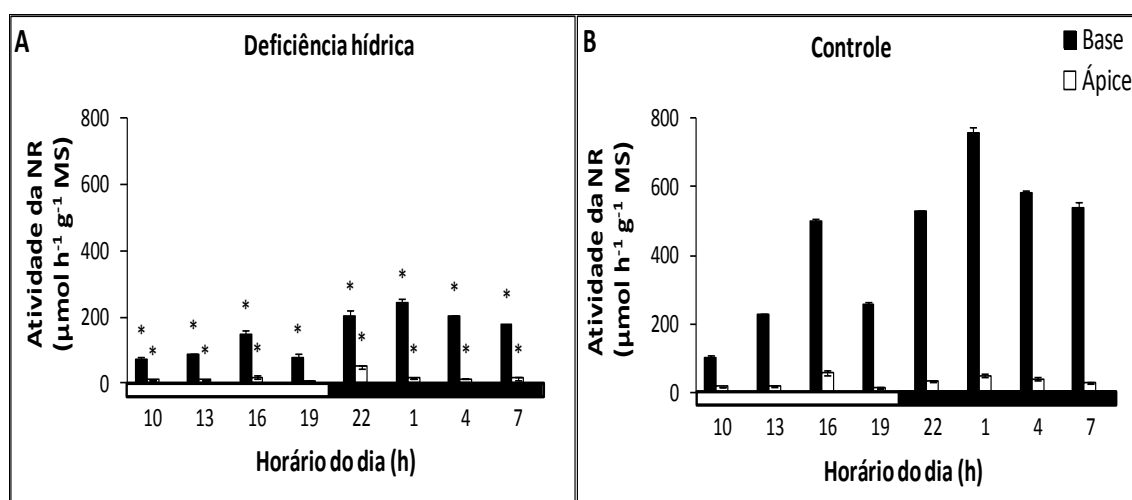


Figura 10: Atividade da enzima nitrato redutase (NR) em um ciclo diuturno, nas porções foliares basal e apical de *Guzmania monostachia* mantidas em PEG 30% (A) ou em água (B) durante 7 dias em câmara de crescimento. Os asteriscos indicam que houve

diferença significativa entre o tratamento e o controle em diferentes horários de coleta, segundo o teste T de Student em nível de 5% de significância.

4.3) Atividade *in vitro* da enzima GS

A atividade *in vitro* da enzima GS não mostrou diferenças marcantes entre as porções foliares basal e apical do tratamento e do controle (**Figura 11**). Entretanto, pôde-se observar um aumento na atividade da GS na porção apical das folhas sob tratamento durante o período diurno (as 13 e 16 horas). Na porção foliar basal a atividade dessa enzima, de modo geral, apresentou pequenas variações ao longo do ciclo diuturno (**Figura 11A**).

Quando mantidas em água, detectou-se um aumento na atividade dessa enzima ao longo do período noturno e início do período claro nas porções foliares basal e apical (**Figura 11B**). Comparativamente, percebeu-se que sob deficiência hídrica houve uma considerável redução da atividade da GS para ambas as porções foliares.

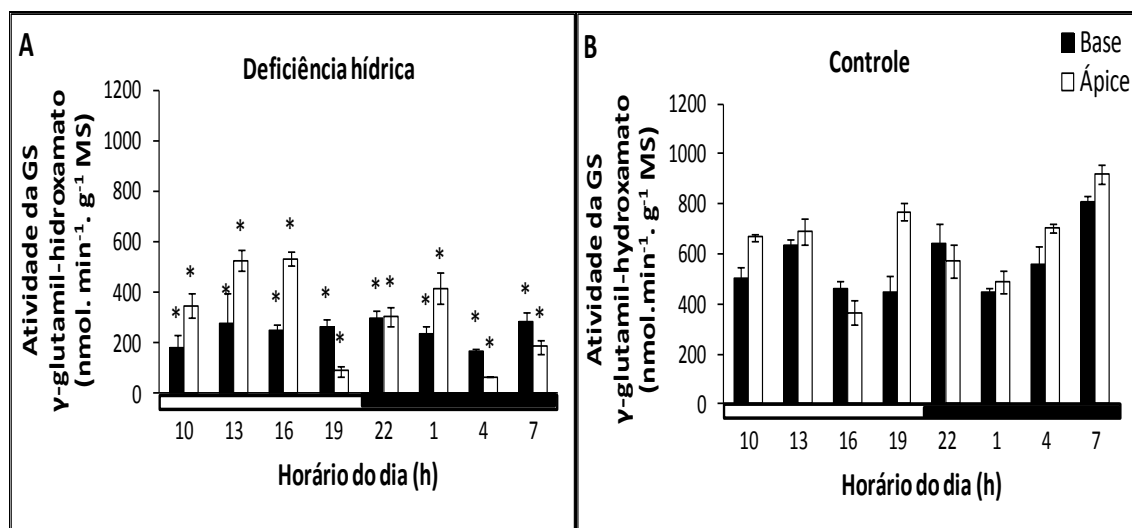


Figura 11: Atividade da enzima Glutamina sintetase (GS) em um ciclo diuturno, nas porções foliares basal e apical de *Guzmania monostachia* mantidas em PEG 30% (A) ou em água (B) durante 7 dias em câmara de crescimento. Os asteriscos indicam que houve diferença significativa entre o tratamento e o controle em diferentes horários de coleta, segundo o teste T de Student em nível de 5% de significância.

5) Conteúdo endógeno de citocininas e aplicação de citocininas-livres

5.1) Quantificação de citocininas-livres

Nesta pesquisa foram realizadas quantificações das citocininas (CKs) em suas formas livres, Z e iP, e conjugadas, ZR e iPR. Todavia, apenas as formas livres apresentaram picos de concentração correlacionados com os níveis da atividade das enzimas PEPC e NR, sendo, portanto, as formas mostradas neste trabalho.

Como pode ser observado por meio da **Figura 12**, sob deficiência hídrica houve um aumento nos teores das citocininas livres (Z+iP) durante o período diurno nas duas porções foliares. Destaca-se que no tratamento com PEG 30% os níveis de Z+iP da porção apical caíram drasticamente das 13 à 1 hora (**Figura 12A**). Já na porção basal, as concentrações dessas citocininas aumentaram das 16 às 22 horas nas folhas mantidas em água (**Figura 12B**).

Os picos de concentração ocorreram às 13 horas (ápice e base) e 19 horas (base) para as folhas sob deficiência hídrica (**Figura 12A**) e às 10 horas (ápice e base) e às 22 horas (base) para as folhas-controle (**Figura 12B**).

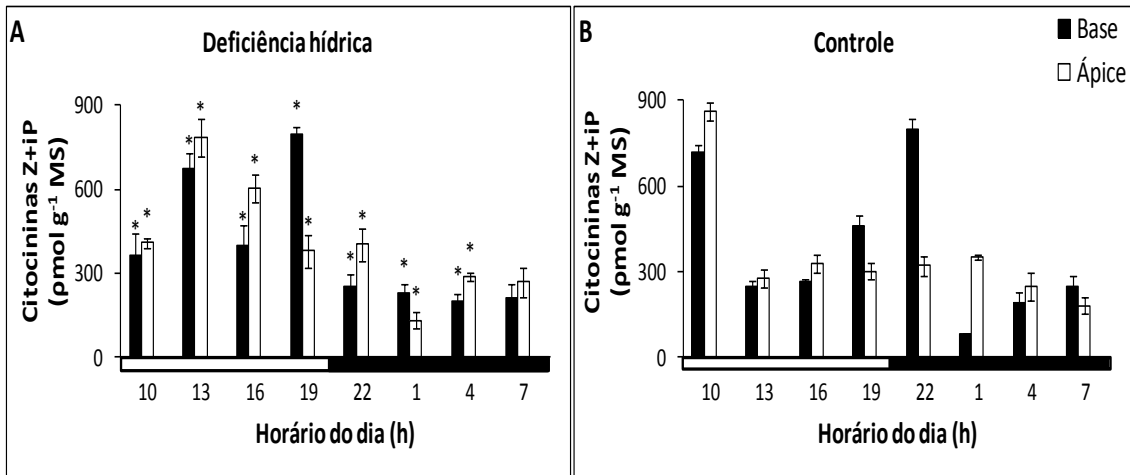


Figura 12: Quantificação das citocininas-livres endógenas, zeatina (Z) e isopenteniladenina (iP), nas porções foliares basal e apical de *Guzmania monostachia* mantidas em PEG 30% (A) ou em água (B) durante 7 dias em câmara de crescimento. Os asteriscos indicam que houve diferença significativa entre o tratamento e o controle em diferentes horários de coleta, segundo o teste T de Student em nível de 5% de significância.

5.2) Aplicação de citocininas-livres (Z e iP)

Com base na **Tabela 1**, pôde-se analisar os resultados da aplicação de citocininas-livres (Z ou iP) em folhas de *G. monostachia* mantidas em água ou em PEG 30%, 6 horas antes das análises das atividades das enzimas PEPC e NR, no ápice e na base, respectivamente. Os resultados mostraram que a aplicação das citocininas-livres nas folhas mantidas em PEG 30% diminuiu significativamente a atividade da enzima PEPC na porção apical, enquanto o ápice das folhas mantidas em água não apresentou redução significativa na atividade dessa enzima. Por outro lado, a aplicação das citocininas-livres promoveu um aumento significativo na atividade da enzima NR na porção basal das folhas mantidas em água ou PEG.

De modo interessante, a citocinina Z foi a forma que mais contribuiu para a diminuição da atividade da enzima PEPC na porção apical das folhas mantidas em PEG

30% e no aumento da atividade da NR na base das folhas-controle (água) ou sob deficiência hídrica (PEG 30%).

Tabela 1: Efeitos da aplicação de zeatina (Z) ou isopenteniladenina (iP) na atividade das enzimas PEPC e NR nas porções apical e basal, respectivamente, de folhas de *G. monostachia*. Z ou iP foram adicionadas aos boréis contendo PEG 30% ou água, em uma concentração final de 1 μ M. Análises das atividades das enzimas foram feitas 6 horas após a adição dessas citocininas. Os asteriscos indicam que houve diferença significativa entre os tratamentos e os controles (PEG ou água), segundo o teste T de Student em nível de 5% de significância. Média \pm desvio padrão.

ÁPICE		BASE	
Tratamento	Atividade da PEPC	Tratamento	Atividade da NR
PEG	0,60 \pm 0,05	PEG	100 \pm 5,42
PEG+Z	0,24 \pm 0,05*	PEG+Z	139 \pm 20,50*
PEG+iP	0,45 \pm 0,02*	PEG+iP	112 \pm 7,28*
Água	0,11 \pm 0,04	Água	185 \pm 14,97
Água+Z	0,08 \pm 0,02	Água+Z	230 \pm 16,40*
Água+iP	0,09 \pm 0,03	Água+iP	210 \pm 21,10*

V. DISCUSSÃO

O CAM é um tipo de fotossíntese caracterizada pela assimilação noturna do CO₂ por meio da enzima citossólica PEPC. (LÜTTGE, 2004; HERRERA, 2009). Esse metabolismo é comum em plantas de regiões áridas e semiáridas, bem como de regiões tropical e subtropical sujeitas à escassez periódica d'água (SMITH & WINTER, 1996; BORLAND *et al.*, 2009; CEUSTERS *et al.*, 2011). O CAM pode operar de quatro modos: *CAM obrigatório*, com acúmulo noturno de ácidos orgânicos e fixação do CO₂ durante esse período; *C₃-CAM facultativo*, com a fixação do CO₂ característica do metabolismo C₃ (RUBISCO) sob condições ambientais favoráveis ou com o comportamento CAM em condições ambientais desfavoráveis; “*CAM-cycling*”, com a fixação diurna do CO₂ (não ocorre a abertura dos estômatos durante a noite) e acúmulo noturno desse gás e de ácidos orgânicos e, finalmente o “*CAM-idling*” caracterizado por um pequeno acúmulo noturno de ácidos orgânicos e pelo fechamento dos estômatos durante todo o ciclo diurno. Nesse último modo de operar o CAM, as espécies utilizam o CO₂ proveniente da respiração e da fotorrespiração, que é reciclado para a síntese de moléculas orgânicas e para a manutenção do aparato fotossintético (CUSHMAN, 2001; LÜTTGE, 2004; WINTER *et al.*, 2008; HERRERA, 2009; FRESCHI *et al.*, 2010a; BORLAND *et al.*, 2011).

Nas espécies facultativas, o CAM pode ser induzido por fatores ambientais como seca (BORLAND & GRIFFITHS, 1990; HERRERA *et al.*, 1991; FRESCHI *et al.*, 2010a), salinidade (SCHMITT & PIEPENBROCK, 1992), elevada fluência de fótons fotossinteticamente ativos (MAXWELL, 2002) e deficiência nutricional (OTA, 1988; WINTER & HOLTUM, 2011). A indução do CAM por fatores ambientais é geralmente rápida e reversível. Entretanto, um dos principais modelos de estudo de indução do CAM por estresse salino é a espécie *Mesembryanthemum crystallinum*. Essa

espécie, uma vez induzida ao CAM não retorna ao metabolismo C₃ sob condições de salinidade normais (SCHMITT & PIEPENBROCK, 1992; CUSHMAN & BORLAND, 2002). Outro excelente modelo de estudo do metabolismo CAM, que tem merecido muita atenção, é a bromélia epífita com tanque *Guzmania monostachia*. Estudos mostram que essa espécie tem a capacidade de expressar o CAM e a fotossíntese C₃, simultaneamente, mas em diferentes porções foliares, sob déficit hídrico. *G. monostachia* exibe o potencial de reversão do CAM à via C₃, sob condições de disponibilidade d'água normais (FRESCI *et al.*, 2010a).

Além do déficit hídrico, a deficiência nutricional parece ter uma grande influência na expressão do CAM. WINTER & HOLTUM (2011) observaram que quando plantas jovens de *Calandrinia polyandra* (Montiaceae) foram adubadas com KNO₃, a fixação de carbono ocorreu durante o período claro. Contudo, quando ocorreu a suspensão da adubação foi verificada a fixação noturna do CO₂ por essas plantas. Para *Guzmania monostachia*, foram realizados experimentos preliminares nos quais as plantas foram mantidas durante 28 dias sob intensidade luminosa de 300 μmol m⁻² s⁻¹, considerada estressante para essa espécie, associada ou não à deficiência nutricional. Foi observado que as plantas não adubadas apresentaram um aumento na acidez titulável na porção foliar apical após 15 dias de cultivo sem adubação. Baseado nesses resultados pôde-se formular a hipótese de que a disponibilidade de nutrientes reprimiu a indução do CAM nos ápices foliares de *G. monostachia* e que somente o estresse luminoso não foi suficiente para tal indução. A importância da deficiência nutricional na regulação da expressão do CAM foi proposta inicialmente por SANTOS & SALEMA (1991), que relataram que a adubação mais significativa de *Kalanchoë lateritia* (Crassulaceae) sob diferentes níveis de nutrição nitrogenada (N, N/5 e N/10) ocasionou uma queda significativa na atividade da enzima PEPC.

A partir da obtenção desses resultados, as plantas utilizadas nesta pesquisa passaram a ter a adubação suspensa com um interstício de, no mínimo, um mês antes da retirada das folhas, evitando assim a inibição da expressão do CAM.

Estudos realizados com *G. monostachia* mostraram que a exposição dessa espécie durante um período de 3 meses sob elevada intensidade de fótons fotossinteticamente ativos ($600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) levou à indução do CAM (MAXWELL, 2002). Outro trabalho realizado com essa mesma bromélia demonstrou que quando plantas adultas foram mantidas sob deficiência hídrica durante 7 dias houve o acúmulo noturno de acidez e maior atividade das enzimas PEPC e MDH, quando comparadas às plantas hidratadas (FRESCHI *et al.*, 2010a). Além disso, foi observado que após a suspensão da rega a condutância estomática dessas plantas mudou do padrão característico do metabolismo C_3 para um estado no qual os estômatos ficaram fechados durante todo o ciclo diurno, caracterizando o tipo “CAM-idling” (HERRERA, 2009; HERRERA *et al.*, 2010; FRESCHI *et al.*, 2010a). Essa espécie se mostrou ainda mais interessante que *M. crystallinum*, pois foi possível a reversão da fotossíntese CAM, nessas plantas sob déficit hídrico, para o metabolismo C_3 após 7 dias de rega (FRESCHI *et al.*, 2010a). Além disso, também foi observado que a expressão do CAM não ocorreu de forma igual ao longo das folhas de *G. monostachia*. A porção foliar apical apresentou maior expressão, enquanto a porção basal apresentou um metabolismo fotossintético mais próximo do tipo C_3 (FRESCHI *et al.*, 2010a). Além dos diferentes tipos fotossintéticos, as porções foliares mostraram diferenças anatômicas e funcionais. A porção basal apresentou maior densidade de tricomas e maior espessura do mesofilo e do hidrênquima, enquanto na porção apical foi verificada a maior densidade de estômatos e menor proporção de tecido armazenador d'água. É possível que a porção basal esteja associada, principalmente, à absorção de nutrientes, ao passo que a porção

foliar apical parece estar relacionada, principalmente, com a assimilação desses nutrientes e com a fotossíntese (FRESCHI *et al.*, 2010a).

Os resultados por nós obtidos confirmaram que existe uma maior expressão do CAM na porção apical de folhas destacadas de *G. monostachia* sob deficiência hídrica, quando comparada à porção basal dessas folhas. Observou-se, ainda, um maior acúmulo noturno de acidez, principalmente ácido málico e cítrico, um elevado consumo noturno de amido, além da maior atividade *in vitro* da enzima MDH no ápice das folhas mantidas em PEG 30%. Todos esses parâmetros são fortes indícios da maior expressão do CAM nessa porção das folhas sob déficit hídrico.

Nesta pesquisa também foi observada a efetividade da promoção da deficiência hídrica pela manutenção das folhas destacadas de *G. monostachia* em PEG 30%. Verificou-se uma redução no conteúdo relativo de água na porção foliar apical (cerca de 35%) muito próxima à diminuição observada na porção basal (cerca de 31%) das folhas mantidas em PEG 30%. Dessa forma, acredita-se que a deficiência hídrica provocada pela manutenção das folhas por 7 dias em solução de PEG 30% foi o estímulo para a indução da expressão do CAM na porção apical das folhas de *G. monostachia*. Esses resultados mostram que apesar das duas regiões da folha terem apresentado reduções similares do teor relativo de água quando mantidas em PEG 30%, a expressão do CAM ocorreu de forma diferencial nessas porções foliares.

FRESCHI *et al.* (2010a) e MIOTO (2012) verificaram, de modo contrário, para *G. monostachia*, que a redução do teor de água foi significativamente maior na porção basal das folhas sob déficit hídrico, quando comparada ao ápice foliar. Apesar desse comportamento diferente, nossos resultados corroboraram a hipótese inicial proposta por FRESCHI *et al.* (2010a) no sentido de que foi confirmado que a redução no teor de

água em *G. monostachia* ocorreu já nas primeiras 24 horas de exposição das folhas ao PEG 30%.

Outra característica interessante verificada em *G. monostachia* foi o consumo noturno e o acúmulo diurno de amido, principalmente na região apical das folhas sob deficiência hídrica. Foi observado no ápice das folhas tratadas um maior consumo noturno de amido, provavelmente, devido ao uso desse carboidrato para gerar energia para o processo de respiração celular, além de fornecer esqueletos carbônicos para a síntese e acúmulo de ácidos orgânicos durante a noite nas folhas induzidas ao CAM. POPP *et al.* (2003) e TAKAHASHI & MERCIER (2011) também detectaram o maior conteúdo de amido, principalmente nas porções foliares mediana e apical. Em geral, nas bromélias é observada uma redução significativa do conteúdo de amido na folha durante o período noturno. Em plantas C₃ essa redução pode ser atribuída à translocação de sacarose e à quantidade de hexoses consumida durante a respiração. Em plantas CAM, a utilização do fosfoenolpiruvato (PEP) proveniente da quebra do amido, para a síntese e acúmulo de malato é um fator adicional para a redução noturna do conteúdo amiláceo (POPP *et al.*, 2003).

Além das análises que confirmaram a indução do CAM em folhas de *G. monostachia* mantidas sob deficiência hídrica, este trabalho mostra resultados inéditos sobre a variação da atividade da PEPC ao longo do ciclo diurno para essa bromélia. Foi verificada a existência de um pico de atividade da PEPC durante o início do período noturno para a porção apical das folhas submetidas ao déficit hídrico. Inicialmente, esperávamos que não houvesse pico de atividade dessa enzima e que fosse observada durante todo o ciclo diurno uma atividade semelhante nos vários horários de coleta noturna. Já a atividade reduzida dessa enzima no início do dia seria resultante da inibição do malato que estaria sendo descarboxilado no citossol. Para identificarmos se

no ensaio *in vitro* da PEPC poderia ter havido a influência negativa do malato (que também foi extraído), foi utilizada uma coluna SEPHADEX PD10/G-25 que retém íons, como o malato⁻², de modo a verificar a atividade da PEPC em sua ausência.

Apesar da existência de muitos trabalhos de indução do metabolismo CAM com várias espécies de plantas, poucos verificaram a atividade da PEPC, uma importante enzima do metabolismo CAM (BOHNERT & CUSHMAN, 2000; MAXWELL, 2002; WINTER *et al.*, 2008; KORNAS *et al.*, 2009, CEUSTERS *et al.*, 2011). Destacamos, ainda, que nenhum deles verificou a variação da atividade total da PEPC ao longo do ciclo diurno. Nossos resultados foram muito interessantes nesse sentido, pois este é um dos únicos trabalhos a mostrar uma variação na atividade *in vitro* da PEPC ao longo do ciclo diurno.

Em uma recente pesquisa realizada por YUAN *et al.* (2012), foi verificado em folhas de *Camellia oleifera* (Theaceae) a ocorrência de variação nos níveis de transcritos e de proteína PEPC em um ciclo diurno. Esses autores mostraram os maiores níveis de RNA mensageiro (RNAm) e de proteína durante o período noturno, quando essas folhas foram induzidas ao CAM por infecção com o fungo *Exobasidium vexans*. Com base nesses dados e nos nossos resultados obtidos para *G. monostachia*, é possível sugerir que a PEPC apresente diferentes níveis de controle, como o transcricional, traducional e pós-traducional ao longo do ciclo diurno.

Outro aspecto interessante desta pesquisa foi encontrar uma atividade preferencialmente noturna de uma enzima do metabolismo do nitrogênio, a NR. Esse foi um dado muito interessante e contrário aos relatos da maioria dos trabalhos que mostra a enzima NR com atividade durante o período claro. Já é bem conhecido que a luz desempenha um papel estimulador da atividade dessa enzima (LILLO, 2008).

Em abacaxizeiro, foi observada a maior atividade da NR nas folhas (durante o período escuro) e raízes (durante o período iluminado) sempre durante o período claro. Todavia, outro trabalho realizado com a bromélia atmosférica CAM constitutiva, *Tillandsia pohliana* (Bromeliaceae), mostrou o pico de atividade dessa enzima na ausência de luz (NIEVOLA & MERCIER, 2001; FRESCHI *et al.*, 2010b). Outra característica dessa tilandsia atmosférica consistiu no maior acúmulo de citrato durante o período noturno, em vez de malato. Uma possível hipótese para a atividade noturna da NR em *T. pohliana* seria que o acúmulo de citrato geraria maior poder redutor (NADH), comparativamente ao malato, durante o período noturno, que seria utilizado pela NR para a redução do nitrato a nitrito (FRESCHI *et al.*, 2010b). Foi sugerida por esses autores uma ligação entre o metabolismo do nitrogênio e a via CAM nessa bromélia atmosférica, que levaria a uma melhora no desempenho fisiológico da mesma sob condições ambientais desfavoráveis.

Para *G. monostachia*, a separação espacial entre o acúmulo de ácido málico e cítrico (no ápice) e a atividade da NR (na base), nos impossibilitou de estabelecer a mesma relação observada para *T. pohliana*. Assim, o interessante resultado da atividade noturna da NR em *G. monostachia* ainda merecerá outras análises afim de esclarecer qual seria a importância dessa redução noturna do NO_3^- .

Nesta pesquisa também foi verificada a atividade de outra enzima do metabolismo do nitrogênio, a GS, em folhas de *G. monostachia* mantidas em PEG 30% ou água. A maior atividade dessa enzima ocorreu, principalmente, na porção apical das folhas mantidas em água, na maior parte do ciclo diuturno. Apesar da reduzida atividade da GS nas folhas sob deficiência hídrica, também foi verificado um aumento da atividade dessa enzima durante o período diurno no ápice dessas folhas. Dessa forma, diferente da NR, cuja atividade noturna está predominantemente na porção basal, a

enzima GS parece ter uma maior atividade no ápice foliar, na maior parte do ciclo diurno.

Nossos resultados corroboram os dados obtidos para outra bromélia epífita com tanque, *Vriesea gigantea*, na qual foi observada a maior atividade da GS na porção foliar apical ao longo do ciclo diurno (TAKAHASHI & MERCIER, 2011). A maior atividade dessa enzima na porção foliar apical parece estar associada com a função fotossintética nessa porção da folha, uma vez que maiores quantidades de estômatos, amido e clorofila total também foram observados nessa porção foliar (TAKAHASHI & MERCIER, 2011). Essas observações foram similares às obtidas para a bromélia *Vriesea sanguinolenta* (Bromeliaceae) que também parece apresentar essa diferença funcional entre as porções foliares basal e apical (ZOTZ *et al.*, 2002). Com base nesses resultados, o amônio parece ser assimilado em aminoácidos, preferencialmente, na porção foliar apical da folha, onde se observa a maior atividade da enzima GS (TAKAHASHI & MERCIER, 2011).

A redução da atividade de duas importantes enzimas do metabolismo do nitrogênio analisadas neste trabalho, NR e GS, nas folhas de *G. monostachia* sob deficiência hídrica foi bastante significativa quando comparada com as encontradas nas folhas-controle. FERREIRA *et al.* (2002) relataram que as atividades das enzimas NR e GS diminuíram rapidamente sob deficiência hídrica em folhas de milho. A atividade superior dessas enzimas em condições de recuperação do déficit hídrico pode ter sido favorecida por um fluxo mais intenso de nitrato e amônio, em decorrência de um provável aumento no fluxo transpiratório ocorrido após cessar o estresse hídrico, uma vez que a atividade dessas enzimas depende do fluxo desses substratos da raiz para as folhas e estes, por sua vez, do fluxo transpiratório (FERREIRA *et al.*, 2002).

Nossos resultados permitiram verificar a separação espacial da atividade das enzimas PEPC e NR. A primeira apresentou maior atividade na porção apical ao longo do ciclo diurno, enquanto a segunda apresentou maior atividade na porção foliar basal. A separação espacial dessas enzimas não foi acompanhada pela separação temporal de suas atividades, uma vez que ambas tiveram maiores atividades durante o período noturno. Assim, a questão que nós nos fazíamos inicialmente era como as citocininas regulariam as atividades da PEPC e da NR, caso elas tivessem a mesma distribuição ao longo do comprimento da folha. De modo interessante, vimos que há uma nítida separação espacial entre elas.

Nas folhas de *Guzmania monostachia* mantidas em PEG 30% parece ocorrer a regulação negativa da atividade da enzima PEPC pelas formas livres das citocininas endógenas e exógenas. Os resultados para os ápices de folhas sob deficiência hídrica mostraram uma diminuição progressiva no conteúdo endógeno dessas citocininas durante o período diurno até o período noturno, quando houve um aumento na atividade da PEPC. O menor conteúdo endógeno de citocininas (Z+iP) foi observado a 01 hora (período escuro), enquanto o pico de atividade dessa enzima ocorreu às 22 horas (período escuro) do ciclo diurno. As maiores atividades da PEPC à noite podem ser devido à fosforilação dessa enzima pela fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK), que provavelmente teria sua transcrição aumentada à noite, quando o teor endógeno de citocininas decaiu. Além disso, a redução nos níveis de Z+iP, das 13 horas à 01 hora do ciclo diurno, também poderia ter estimulado a expressão de transcritos da PEPC, como o gene *Ppc1*, uma isoforma da PEPC específica ao CAM. A fim de corroborar a hipótese que as formas livres das citocininas regulariam negativamente a atividade da enzima PEPC de *G. monostachia*, foi feita a aplicação de Z e iP em folhas destacadas.

Nitidamente, essas citocininas provocaram uma intensa redução da atividade dessa enzima no ápice de folhas mantidas em PEG, após 6 horas em contato com Z ou iP.

Nossos resultados expressaram apenas os níveis de citocininas-livres (Z+iP), apesar das formas conjugadas (ZR e iPR) terem sido também quantificadas. Isso se deveu ao fato que as formas ribosídicas sofreram forte redução pelo déficit hídrico, sendo praticamente pouco detectadas nessa condição.

Em geral, as citocininas atuam como um sinal negativo, inibindo a expressão do CAM (SCHMITT & PIEPENBROCK, 1992; FRESCHI & MERCIER, 2012). Em plantas jovens de *Ananas comosus*, notou-se uma diminuição no conteúdo endógeno de citocininas durante a indução do CAM por estresse hídrico. Por outro lado, a redução da expressão do CAM foi acompanhada pelo aumento nos níveis endógenos de citocininas nessas plantas (FRESCHI *et al.*, 2010c). A aplicação de benzilaminopurina (BA) em *M. crystallinum* sugeriu que essa citocinina inibiu a expressão do CAM, acelerando a diminuição na abundância dos transcritos da PEPC, além de promover a diminuição da atividade dessa enzima em folhas destacadas dessa espécie (SCHMITT & PIEPENBROCK, 1992).

Além de inibir a expressão do CAM, as citocininas parecem atuar sobre a atividade e a transcrição da enzima NR (RAO, *et al.*, 1984; KAPOOR *et al.*, 1987; GAUDINOVÁ, 1990; FRESCHI *et al.*, 2009). Foi verificado nas folhas de *Guzmania monostachia* sob deficiência hídrica, que a maior atividade da NR na porção foliar basal foi precedida em 6 horas pelo aumento dos níveis das citocininas-livres (Z e iP). Nas folhas mantidas em água a maior atividade da NR na base foi precedida em apenas 3 horas pelo pico de citocininas-livres endógenas. Para *G. monostachia*, os maiores teores endógenos de citocininas detectadas durante o período claro podem ser um indício da ação desse hormônio sobre a transcrição gênica e não sobre a regulação pós-traducional

da NR propriamente dita. Os resultados da aplicação de Z e iP nas folhas destacadas de *G. monostachia* mantidas em água ou PEG 30% mostraram que essas citocininas aumentaram significativamente as atividades da enzima NR nas bases das folhas-controlado ou sob deficiência hídrica.

Foi verificado em plantas de abacaxizeiro cultivadas *in vitro* sob condições termoperiódicas (28°C durante o dia e 15°C durante a noite), picos de citocininas (Z, ZR e iP), quase simultâneos, que foram correlacionados com o início do acúmulo de transcritos e a atividade da enzima NR nas raízes e na parte aérea dessas plantas (FRESCHI *et al.*, 2009). Esses resultados sugeriram que as citocininas podem ter atuado como um sinal endógeno positivo sobre a regulação diurna em níveis transcricional e pós-traducional da enzima NR. Nesse mesmo trabalho foi realizada a aplicação de citocininas para corroborar a hipótese de que, principalmente, as citocininas do tipo Z induziu um aumento nos teores de RNAm e de proteínas dessa enzima (FRESCHI *et al.*, 2009). KAPOOR *et al.* (1987) verificaram que a aplicação de 5×10^{-5} M de 6-BA e cinetina em sementes de *Gossypium hirsutum* (Malvaceae) crescidas no escuro estimularam a atividade *in vivo* da enzima NR. Quando esse hormônio foi aplicado junto com nitrato, um efeito aditivo foi observado e a eficiência na indução dessa enzima foi aumentada. Foi sugerido que, provavelmente, ambos (citocininas e nitrato) atuam independentemente um do outro na indução da NR.

VI. PRINCIPAIS CONTRIBUIÇÕES

Este estudo propiciou obter novas informações acerca da transição fotossintética ao longo das folhas isoladas de *G. monostachia*, quando submetidas à deficiência hídrica. Ainda foi possível verificar, pela primeira vez, os principais ácidos orgânicos acumulados nessa espécie, quantificar os níveis de amido, analisar as atividades das principais enzimas do metabolismo CAM e do nitrogênio e dosar os níveis endógenos de citocininas durante o ciclo diuturno.

Outra contribuição que deve ser destacada refere-se ao fato de que todos os experimentos foram realizados durante o ciclo diuturno (com exceção do resultado de acidez titulável), em condições de temperatura, intensidade luminosa e umidade controladas. A maioria dos trabalhos que encontramos na literatura sobre CAM e regulação da atividade de enzimas por hormônios compreende apenas análises em determinados horários ao longo do ciclo dia/noite, geralmente um no início e outro no final do dia. Esse método de coleta das amostras pode desprezar pontos importantes ao longo do ciclo, dificultando a interpretação dos resultados e sua comparação com outros estudos.

Ainda outra característica relevante desta pesquisa foi poder fazer a correlação dos níveis endógenos de citocininas com a atividade de importantes enzimas do metabolismo do carbono e do nitrogênio. Com exceção de alguns poucos trabalhos do nosso próprio grupo de pesquisa, a maioria dos estudos somente observa o efeito de citocininas exógenas tentando relacionar com a atividade de enzimas, como NR e PEPC. Outro inconveniente dessa abordagem é que a aplicação de citocininas pode afetar o equilíbrio metabólico do tecido, não refletindo, necessariamente, a resposta às concentrações endógenas desse hormônio.

Os dados obtidos nessa pesquisa permitiram aprofundar os conhecimentos da inter-relação entre os metabolismos do nitrogênio e do carbono e a regulação desses pelo fitormônio citocinina na bromélia epífita com tanque, *Guzmania monostachia*, quando suas folhas isoladas foram induzidas ao CAM.

VII. CONCLUSÕES

Em conclusão, o conjunto de resultados obtidos no desenvolvimento desta pesquisa indicou que a expressão do CAM no ápice das folhas destacadas da bromélia *G. monostachia* foi possível de ser induzida a partir da manutenção dessas em PEG 30% durante 7 dias.

A separação espacial da atividade das enzimas PEPC e NR ao longo da folha dessa bromélia, mantida em água ou em PEG 30% ficou bastante evidente: a atividade da PEPC foi maior na porção foliar apical, com pico às 22 horas (escuro), enquanto a da NR predominou na base, com maior atividade a 1 hora (escuro) do ciclo diurno (**Figura 13**).

Por outro lado não foi verificada a separação temporal da atividade dessas enzimas. A maior atividade da NR também foi verificada durante o período noturno na base das folhas mantidas em água ou sob deficiência hídrica. Esse resultado sugere que a disponibilidade de esqueletos carbônicos à noite, proveniente do metabolismo CAM, não deve ter sido o fator determinante para o aparecimento do pico de atividade dessa enzima nesse período nas folhas sob déficit hídrico, uma vez que essa característica também foi verificada nas folhas-controle (C₃).

Uma correlação negativa entre a atividade da PEPC, durante o período iluminado na porção apical das folhas sob deficiência hídrica, e os teores endógenos de citocininas foi observada (**Figura 13**). A redução no conteúdo endógeno de Z+iP foi detectada das 16 a 01 hora no ápice das folhas sob deficiência hídrica, enquanto o aumento da atividade da PEPC ocorreu a partir das 13 horas, com um pico às 22 horas.

Por outro lado, uma possível regulação positiva da atividade da NR pelas citocininas endógenas, durante o período diurno na porção basal de folhas induzidas ao CAM foi também evidenciada (**Figura 13**). O pico de atividade da NR (01 hora) na

base das folhas mantidas em água ou em PEG 30% foi antecedido em 3 e 6 horas, respectivamente, pelos maiores teores endógenos de Z+iP nessa porção foliar.

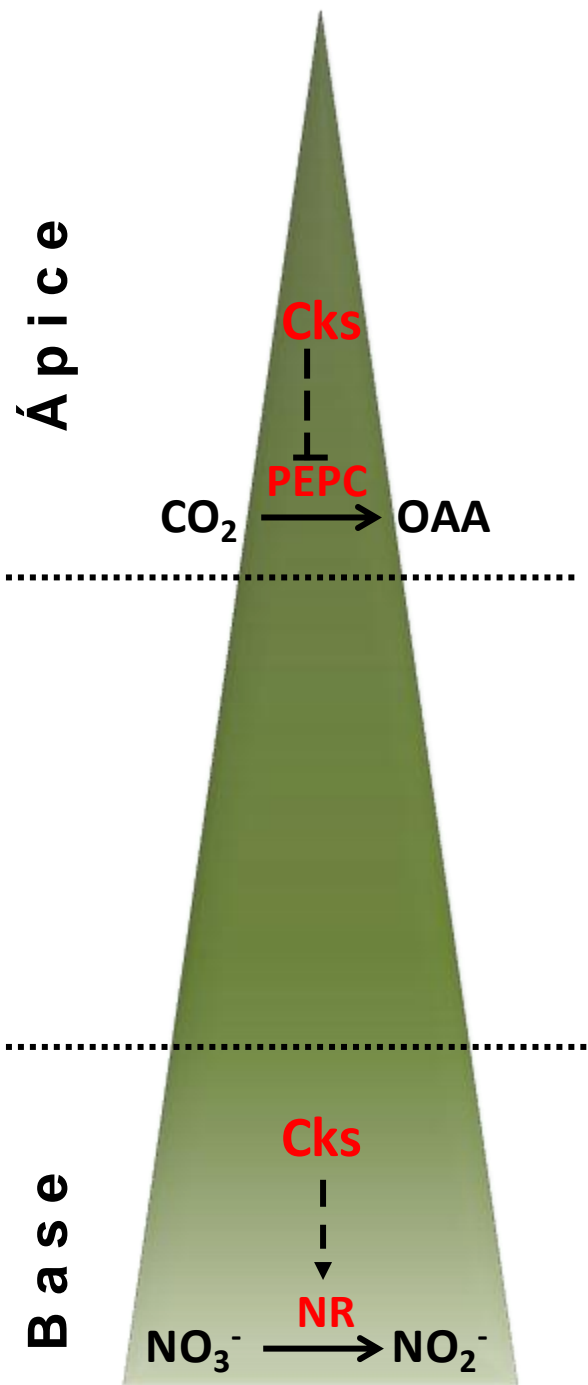


Figura 13: Representação esquemática da folha de *Guzmania monostachia* induzida ao CAM. Os símbolos representam: regulação negativa (—|) e regulação positiva (—→). Cks= citocininas, OAA= oxaloacetato, PEPC= fosfoenolpiruvato carboxilase, NR= nitrato redutase.

VIII. RESUMO

Estudos anteriores realizados no Laboratório de Fisiologia Vegetal do IBUSP com *Guzmania monostachia* demonstraram que quando essas plantas são submetidas ao déficit hídrico ocorre a indução do CAM, com maior expressão desse metabolismo na porção foliar apical. Para outra espécie (*Vriesea gigantea*), foi verificada a maior atividade da enzima nitrato redutase (NR) na porção basal durante o período diurno. Em uma bromélia terrestre (*Ananas comosus*) foi observada a sinalização por citocininas tanto na indução da expressão gênica, quanto na ativação da NR. Outros laboratórios evidenciaram que plantas de *Mesembryanthemum crystallinum* induzidas ao CAM apresentaram uma provável regulação negativa da fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) por citocininas. Em decorrência desses conhecimentos acumulados, surgiram novos questionamentos: haveria variações diurnas da atividade das enzimas PEPC e NR nas diferentes porções das folhas de *G. monostachia* induzidas ao CAM? A maior disponibilidade de esqueletos carbônicos à noite (acúmulo de acidez) influenciaria positivamente a atividade da NR, deslocando seu pico de atividade para o período noturno? As variações dos teores endógenos de citocininas acompanhariam as possíveis mudanças da atividade da PEPC e da NR, indicando, assim, a participação dessa classe hormonal na regulação dessas enzimas? O presente trabalho teve por objetivo principal investigar uma possível regulação da atividade das enzimas PEPC e NR por citocininas em folhas destacadas da bromélia epífita com tanque, *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae) induzidas ao CAM. Foi esperado com esta pesquisa aprofundar os estudos sobre a inter-relação entre o comportamento fotossintético, a capacidade de assimilação de nitrogênio e a possível regulação das atividades da PEPC e da NR por citocininas endógenas.

Análises de acidez titulável, ácidos orgânicos, amido endógeno e da atividade da enzima malato desidrogenase (MDH) foram realizadas, confirmando a indução do CAM nas folhas isoladas de *G. monostachia* mantidas em polietilenoglicol (PEG) a uma concentração de 30%. O uso desse composto foi eficiente na redução do conteúdo relativo de água e na imposição da deficiência hídrica foliar. Além disso, pôde-se verificar a maior expressão do CAM na porção apical das folhas mantidas em PEG 30%, quando comparada à porção basal. Análises da atividade da PEPC e da NR permitiram verificar a separação espacial dessas enzimas. A primeira apresentou maior atividade no ápice foliar, enquanto a segunda mostrou a maior atividade na porção basal. Apesar disso, não foi observada a separação temporal dessas enzimas, uma vez que ambas apresentaram picos de atividade noturna. A maior atividade da NR durante o período escuro (01 hora) foi verificada nas folhas-controle ou sob deficiência hídrica. Esse resultado sugere que outros fatores, diferentes do metabolismo CAM, influenciaram para a ocorrência da maior atividade dessa enzima durante o período noturno. Os resultados obtidos ainda sugerem que as citocininas possivelmente atuaram como um regulador negativo para a atividade da PEPC durante o dia, uma vez que os maiores níveis endógenos desse hormônio foram observados durante esse período, enquanto a maior atividade dessa enzima foi verificada durante a noite, quando os teores de Z+iP decaíram significativamente. A aplicação de Z ou iP resultou também num decréscimo da atividade dessa enzima. Por outro lado, as citocininas atuaram como um provável regulador positivo para a atividade da NR, uma vez que a maior atividade noturna dessa enzima foi antecedida em 3 ou 6 horas pelos maiores níveis endógenos de citocininas na porção basal das folhas mantidas em água ou PEG 30%, respectivamente. A aplicação de citocininas-livres aumentou significativamente a atividade da NR na base das folhas destacadas mantidas em água ou PEG 30%.

IX. ABSTRACT

Prior studies undertaken in the Laboratory of Plant Physiology on IBUSP with *Guzmania monostachia* have shown that during water shortage, CAM induction occurs with greater expression in the apical portion of the leaf. In the case of another species (*Vriesea gigantea*), more intense nitrate reductase (NR) enzyme activity was observed in the basal portion during the daytime. In a certain terrestrial bromeliad (*Ananas comosus*), signaling by cytokinins, both in the induction of gene expression as well as NR activation, was observed. According to other laboratories, the cytokinins seem to play a negative regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) in CAM induced *Mesembryanthemum crystallinum* plants. As a result of accumulated knowledge, new questions have arisen, such as: Are there daily variations in PEPC and NR enzymes activity in the different portions of CAM induced leaves of *G. monostachia*? Would the more pronounced nocturnal availability of carbon skeletons (accumulation of acidity) positively influence NR activity, with consequential displacement of its peak of activity to this period? Would variations in endogenous cytokinins concentration accompany possible changes in PEPC and NR activity, thereby indicating the participation of this hormonal class in their regulation? The main aim in the present study was to investigate the possible regulation of PEPC and NR activity by cytokinins in detached CAM-induced leaves of the epiphyte tank bromeliad *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae). The expectations with this research were to study more deeply the inter-relationship between photosynthetic behavior, the capacity for nitrogen assimilation and the possible regulation of PEPC and NR activity by endogenous cytokinins.

Analyses of titratable acidity, organic acids, endogenous starch and malate dehydrogenase (MDH) enzyme activity confirmed CAM induction in isolated leaves of

G. monostachia kept in polyethylene glycol (PEG) at a concentration of 30%. The use of this compound was efficient in reducing relative water content and imposing leaf water deficiency. Furthermore, compared to the basal portion, greater CAM expression could be observed in the apical portion of leaves kept in PEG 30%. Analyses of PEPC and NR activity allowed detecting their mutual spatial separation, seeing that, in the first greater activity was concentrated in the leaf apex, while in the second this was more pronounced in the basal portion. Even so, no temporal separation could be observed, since peak of activity for both occurred at night. The peak of nocturnal NR activity (1 hour) was observed in control leaves or those undergoing water deficiency, thereby implying that factors, other than CAM metabolism, exerted an influence on the occurrence of more intense activity of this enzyme at this time. Furthermore, there were indications that cytokinins possibly act as a negative regulator of PEPC activity during the daytime, when the highest endogenous levels of this hormone were observed, whereas it was apparent that the most intense activity of this enzyme actually occurred at night, when Z+iP rates decreased significantly. Z or iP application also induced a decrease in the activity of this enzyme. On the other hand, the cytokinins acted as a positive regulator of NR activity, since the nocturnal peak of activity of this enzyme was preceded by 3 or 6 hours by higher endogenous levels of cytokinins in the basal portion of leaves maintained in water or PEG 30%, respectively. The application of free cytokinins induced a significant increase in NR activity in the base of detached leaves kept in water or PEG 30%.

X. ANEXO

1. Composição do meio de cultura baseada na formulação de Knudson (Kn), modificada para bromélias.

Meio de cultura Kn	
Macronutrientes	1L
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,25g
Ca(NO ₃) ₂	0,5g
KH ₂ PO ₄	0,25g
MgSO ₄	0,25g
Sacarose	20g
<i>Phytigel</i>	2g
<i>CaCO₃</i>	0,5g
Micronutrientes MS	5mL
Fe-EDTA	10mL

Solução de micronutrientes de Murashige e Skoog (MS) (1L)	
MnSO ₄ .4H ₂ O	4,46g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,12g
H ₃ BO ₃	1,24g
KI	0,166g
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,05g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,005g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,005g

Solução de Fe-EDTA (1L)	
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	4,13g
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,78g

XI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, L.I.V.; GASPAR, M.; COSTA, P.M.F.; AIDAR, M.P.M.; BUCKERIDGE, M.S. (2007) Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. *Hoehnea*, **34** (4): 425-431.
- AMORÓS, A.; ZAPATA, P.; PRETEL, M.T.; BOTELLA, M.A.; SERRANO, M. (2003) Physico-chemical and physiological changes during fruit development and ripening of five loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl) cultivars. *Food Science and Technology International*, **9** (1): 43-51.
- ARASIMOWICZ, M.; FLORYZAK-WIECZOREK, J. (2007) Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. *Plant Sci.* **172**: 876-887.
- BENZING, D.H. (1973) Mineral nutrition and related phenomena in Bromeliaceae and Orchidaceae. *Quant. Review Biol.* **48**: 277-290.
- BENZING D.H.; SEEMANN J.; RENFROW A. (1978) Foliar epidermis in Tillandsioideae (Bromeliaceae) and its role in habitat selection. *American Journal of Botany*, **65**: 359-365.
- BENZING, D.H.; OTT, D.W. (1981) Vegetative reduction in epiphytic Bromeliaceae and Orchidaceae: its origin and significance. *Biotropica*, **13** (2): 131-140.
- BENZING, D.H. (1990) Vascular epiphytes, general biology and related biota. Ashton, P.S. (ed), *Cambridge, Cambridge University Press*.
- BENZING, D.H. (2000) Bromeliaceae: profile of in adaptative radiation. *Cambridge. Cambridge University*.
- BLACK, J.R.; CLANTON, C. (1973) Photosynthetic carbon fixation in relation to net CO₂ uptake. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **24**: 253- 286.
- BOHNERT, H.J.; CUSHMAN, J.C. (2000) The ice plant cometh: lessons in abiotic stress tolerance. *Journal of Plant Growth Regulation*, **19** (3): 334-346.

- BORLAND, A.M.; GRIFFITHS, H. (1990) The regulation of CAM and respiratory recycling by water supply and light regime in the C3-CAM intermediate *Sedum telephium*. *Functional Ecology*, **4**: 33–39.
- BORLAND, A.M.; GRIFFITHS, H.; HARTWELL, J.; SMITH, J.A.C. (2009) Exploiting the potential of plants with crassulacean acid metabolism for bioenergy production on marginal lands. *Journal of Experimental Botany*, **60**: 2879–2896.
- BORLAND, A.M.; ZAMBRANO, V.A.B.; 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** (3): 619-633.
- CEUSTERS, J.; BORLAND, A.M.; GODTS, C.; LONDERS, E.; CROONENBORGHES, S.; GOETHEM, D.V.; DE PROFT, M.P. (2011) Crassulacean acid metabolism under severe light limitation: a matter of plasticity in the shadows? *Journal of Experimental Botany*, **62** (1): 283-291.
- CUSHMAN, J.C. (2001) Crassulacean acid metabolism. A plastic photosynthetic adaptation to arid environments. *Plant Physiology*, **127** (4): 1439–1448.
- CUSHMAN, J.C.; BORLAND, A.M. (2002) Induction of crassulacean acid metabolism by water limitation. *Plant, Cell and Environment*, **25**: 295–310.
- DAI, Z.; KU, M.S.B.; ZHANG, Z.; EDWARDS, G.E. (1994) Effects of growth regulators on the induction of Crassulacean acid metabolism in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Planta*, **192**: 287-294.
- DODSON, C.H. (2003). Why are there so many orchid species? *Lankesteriana*, **3** (2): 99-103.
- EL-D, A.M.S.A.; SALAMA, A.; WAREING, P.F. (1979) Effects of mineral nutrition on endogenous cytokinins in plants of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *J. Exp. Bot.* **30**: 971-981.
- FERREIRA, V.M.; MAGALHÃES, P.C.; DURÃES, F.O.M.; DE OLIVEIRA, L.E.M.; PURCINO, A.A.C. (2002) Metabolismo do nitrogênio associado à deficiência hídrica e sua recuperação em genótipos de milho. *Ciência Rural*, **32** (1): 13-17.

- FRANCO, A.C.; BALL, E.; LÜTTGE, U. (1992) Differential effects of drought and light levels on accumulation of citric and malic acids during CAM in *Clusia*. *Plant, Cell and Environmental*, **15**: 821-829.
- FRESCHI, L.; NIEVOLA, C.C.; RODRIGUES, M.A.; DOMINGUES, D.S.; VAN SLUYS, M.A.; MERCIER, H. (2009) Thermoperiod affects the diurnal cycle of nitrate reductase expression and activity in pineapple plants by modulating the endogenous levels of cytokinins. *Physiologia Plantarum*, **137**: 201-212.
- FRESCHI, L.; TAKAHASHI, C.A.; CAMBUÍ, C.A.; SEMPREGOM, T.R.; CRUZ, A.B.; MIOTO, P.T.; VERSIEUX, L.M.; CALVENTE, A.; LATANSIO-AIDAR, S.R.; AIDAR, M.P.M.; MERCIER, H. (2010a) Specific leaf areas of the tank bromeliad *Guzmania monostachia* perform distinct functions in response to water shortage. *Journal of Plant Physiology*, **167** (7): 526-533
- FRESCHI, L.; RODRIGUES, M.A.; TINÉ, M.A.S.; MERCIER, H. (2010b) Correlation between citric acid and nitrate metabolisms during CAM cycle in the atmospheric bromeliad *Tillandsia pohliana*. *Journal of Plant Physiology*, **167**: 1577-1583.
- FRESCHI L.; RODRIGUES, M.A.; DOMINGUES, D.S.; PURGATTO, E.; VAN SLUYS, M.A.; MAGALHÃES, J.R.; KAISER, W.M.; MERCIER, H. (2010c) Nitric oxid mediates the hormonal control of crassulacean acid metabolism expression in young pineapple plants. *Plant physiology*, **4**: 1971-1985.
- FRESCHI, L.; MERCIER, H. (2012) Connecting environmental stimuli and crassulacean acid metabolism expression: phytohormones and other signaling molecules. In: Lüttge, U; Beyschlag, W; Büdel, B; Francis, D. (Org.). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag GmbH, *Progress in Botany*, **73**: 231-255.
- GAUDINOVÁ, A. (1990) The effect of cytokinins on nitrate reductase activity. *Biologia Plantarum*, **32** (2): 89-96.
- GOMES, F. P. (1984) A estatística moderna na pesquisa agropecuária. *Ed. POTAFOS*.

- HA, S.; VANKOVA, R.; YAMAGUCHI- SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K; TRAN, L.S.P (2012) Cytokinins: metabolism and function in plant adaptation to environmental stress. *Trends in Plant Science*, **17** (3): 172-179.
- HAGEMANN R.H.; REED A.J. (1980) Nitrate reductase from higher plants. *Methods Enzymol.* **69**: 270–280.
- HASLAM, R.; BORLAND, A.; MAXWELL, K.; GRIFFITHS, H. (2003) Physiological responses of the CAM epiphyte *Tillandsia usneoides* L. (Bromeliaceae) to variations in light and water supply. *Journal of Plant Physiology*, **160**: 627–634.
- HERRERA, A.; DELGADO, J.; PARAGUATEY, I. (1991) Occurrence of Crassulacean acid metabolism in *Talinum triangulare* (Portulacaceae). *Journal of Experimental Botany*, **42** (4): 493- 499.
- HERRERA, A. (2009) Crassulacean acid metabolism and fitness under water deficit stress: if not for carbon gain, what is facultative CAM good for? *Annals of Botany*, **103**: 645- 653.
- HERRERA, A.; MARTIN, C.E.; TEZARA, W.; BALLESTRINI, C.; MEDINA, E. (2010) Induction by drought of crassulacean acid metabolism in the terrestrial bromeliad, *Puya floccosa*. *Photosynthetica*, **48** (3): 383-388.
- JAWORSKI, E. (1974) Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **43** (6): 1274-1279.
- KERBAUY, G.B.; TAKAHASHI, C.A.; LOPEZ, A.M.; MATSUMURA, A.T.; HAMASHI, L.; FELIX, L.M.; PEREIRA, P.N.; FRESCHI, L.; MERCIER, H. (2012) Crassulacean acid metabolism in epiphytic orchids: current knowledge, future perspectives. In: Mohammad Najafpour (org.). Rijeka. *Photosynthesis*, **2**(4): 81-104.
- KLUGE, M; TING, I.P. (1978) Crassulacean acid metabolism. Berlin: *Springer- Verlag*.
- KNUDSON, L. (1946) A new nutrient solution for orchid seed. *Amer. Orch. Soc. Bull.* **15**: 214-217.

- KAPOOR, H.C.; PRAKASH, S.; MADASHI, T.R. (1987) Regulation of *in vivo* nitrate reductase activity in cotton (*Gossypium hirsutum*) leaves in light and dark and the possible regulation by cytokinin. *Indian J. Biochem. Biophys.* **24**: 326-328.
- KORNAS, A.; FUSCHER-SCHLIEBS, E.; LÜTTGE, U.; MISZALSKI, Z. (2009) Adaptation of the CAM plant *Clusia alata* to light stress: metabolic responses. *Journal of Plant Physiology*, **166**: 1914–22.
- LARCHER, W. (2006) *Ecofisiologia Vegetal. Ed. Rima.*
- LEME, E.M.C.; MARIGO, L.C. (1993) Bromélias na natureza. *Marigo Comunicação Visual Ltda.* Rio de Janeiro.
- LILLO, C. (2008) Signaling cascades integrating light-enhanced nitrate metabolism. *Biochemical Journal*, **415**: 11-19.
- LÜTTGE, U. (1988) Day-night changes of citric acid levels in Crassulacean acid metabolism: phenomenon and ecophysiological significance. *Plant, Cell and Environmental*, **11**: 445-451.
- LÜTTGE, U. (2004) Ecophysiology of crassulacean acid metabolism (CAM). *Annals of Botany*, **93**: 629-652.
- LÜTTGE, U. (2006) Photosynthetic flexibility and ecophysiological plasticity: questions and lessons from *Clusia*, the only CAM tree, in the neotropics. *New Phytologist*, **171**: 7-25.
- LÜTTGE, U. (2011) Photorespiration in Phase III of Crassulacean Acid Metabolism: Evolutionary and Ecophysiological Implications. *Progress in Botany*, **72**: 371-384.
- MAXWELL, C.; GRIFFITHS, H.; YOUNG, A.J. (1994) Photosynthetic acclimation to light regime and water stress by the C₃-CAM epiphyte *Guzmania monostachia*: gas-exchange characteristics, photochemical efficiency and the xanthophyll cycle. *Functional Ecology*, **8**: 746-754.
- MAXWELL, K. (2002) Resistance is useful: diurnal patterns of photosynthesis in C₃ and crassulacean acid metabolism epiphytic bromeliads. *Functional Plant Biology*, **29**: 679-687.

- MIFLIN, B.J.; HABASH, D.Z. (2002) The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *J. Exp. Bot.* **53(370)**: 979-987.
- MIOTO, P. (2012) Sinalização da indução do metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) por ácido abscísico e óxido nítrico em *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae).
- MOK, D.W.S.; MOK, M.C. (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **52**: 89-118.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **15**: 473-479.
- NAQVI, S.S.M. (1995) Plant hormones under stressful conditions. *In Handbook of Plant Crop Stress*, M. Pessaraki, ed. New York: Marcel Dekker; p. 645-660.
- NIEVOLA, C.C.; MERCIER, H.; MAJEROWICZ, N. (2001) Levels of nitrogen assimilation in bromeliads with different growth habits. *Journal of Plant Nutrition*, **24(9)**: 1387-1398.
- 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**: 832-387.
- OSMOND, C.B. (1978) Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context. *Annual Review of Plant Physiology* **29**: 379-414.
- OTA, K. (1988) Stimulation of CAM photosynthesis in *Kalanchoë blossfeldiana* by transferring to nitrogen-deficient conditions. *Plant Physiology*, **87**: 454-457.
- PETERS, W.; FUCHTBAUER, B.; BECK, E. (1995) Nitrate reductase activity is endogenously induced by zeatin riboside in habituated suspension cultured *Chenopodium rubrum* cells. *J Plant Physiology*, **147**: 401-407.
- PETERS, W.; BECK, E.; PIEPENBROCK, M.; LENZ, B, SCHIMITT, J.M. (1997) Cytokinin as a negative effector of phosphoenolpyruvate carboxylase induction in *Mesembryanthemum crystallinum*. *J. Plant Physiology*, **151**: 362-367.

- POPP, M.; JANETT, H.P.; LÜTTGE, U.; MEDINA, E. (2003) Metabolite gradients and carbohydrate translocation in rosette leaves of CAM and C₃ bromeliads. *New Phytol.* **157**: 649-656.
- POSPISILOVA, J.; SYNKOVA, H.; RULCOVA, J. (2000) Cytokinins and water stress. *Biologia Plantarum*, **43**: 321-328.
- RAO, L.V.M.; DATTA, N.; HAHADEVAN, M.; GUHA-MUKHERJEE, S.; SOPORY, S.K. (1984) Influence of cytokinin and phytochrome on nitrate reductase activity in etiolated leaves of maize. *Photochemistry*, **23**: 1875–1879.
- SAKAI, W.S.; SANDFORD, W.G. (1980) Ultrastructure of the water-absorbing trichomes of pineapple (*Ananas comosus*, Bromeliaceae). *Ann. Bot.* **46**: 7-11.
- SAKAKIBARA, H. (2006) Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology*, **57**: 431-449.
- SAMUELSON, M.E.; CAMPBELL, W.H.; LARSSON, C.M. (1995) The influence of cytokinins in nitrate regulation of nitrate reductase activity and expression in barley. *Physiol Plant*, **93**: 533-539.
- SANTOS, I.; SALEMA, R. (1991) Nitrogen nutrition and the level of crassulacean acid metabolism in *Kalanchoë lateritia* Engl. *Plant, Cell and Environmental*, **14**: 311-317.
- SCHMITT, J.M.; PIEPENBROCK, M. (1992) Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase and crassulacean acid metabolism induction in *Mesembryanthemum crystallinum* L by cytokinin - Modulation of leaf gene expression by roots. *Plant Physiology*, **99**: 1664-1669.
- SCHMITT, A.K.; LEE, H.S.J.; LÜTTGE, U. (1998) Response of the C₃-CAM tree *Clusia rosea* to light and water stress. *Journal of Experimental Botany*, **39**: 1581-1590.
- SCHMIDT, G.; ZOTZ, G. (2001) Ecophysiological consequences of differences in plant size: in situ carbon gain and water relations of the epiphytic bromeliad, *Vriesea sanguinolenta*. *Plant, Cell and Environment*, **24(1)**: 101-111.

- SILVERA, K.; SANTIAGO, L.S.; CUSHMAN, J.C.; WINTER, K. (2009) Crassulacean acid metabolism and epiphytism linked to adaptive radiations in the Orchidaceae. *Plant Physiology*, **149** (4):1838–1847.
- SILVEIRA, K.; SANTIAGO, L.S.; WINTER, K. (2010) The incidence of crassulacean acid metabolism in the Orchidaceae derived from carbon isotope ratios: a checklist of the flora of Panama and Costa Rica. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **163**: 194-222.
- SLESŁAK, 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**: 573-581.
- SMITH, J.A.C.; WINTER, K. (1996) Taxonomic distribution of crassulacean acid metabolism. In: Winter K, Smith JAC, eds. Crassulacean acid metabolism: biochemistry, ecophysiology and evolution. Berlin, Germany: *Springer-Verlag*, **114**: 427–436.
- SODEK, L. (2004) Metabolismo do Nitrogênio. In: KERBAUY, G.B. (ed.). *Fisiologia Vegetal*, Primeira edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ; p. 94-113.
- TAKAHASHI, C.A.; MERCIER, H. (2011) Nitrogen metabolism in leaves of a tank epiphytic bromeliad: Characterization of a spatial and functional division. *Journal of Plant Physiology*, **168**(11): 1208-1216.
- TAYBI, T.; SOTTA, B.; GEHRIG, H.; GÜCLÜ, S.; KLUGE, M.; BRULFERT, J. (1995) Differential effects of abscisic acid on phosphoenolpyruvate and CAM operation in *Kalanchoe blossfeldiana*. *Bot. Acta*, **198**: 240-246.
- TAYBI, T.; CUSHMAN, J. (1999) Signaling events leading to crassulacean acid metabolism induction in the common ice plant. *Plant Phys.* **121**: 545–555.
- THOMAS, J.C.; MCELWAIN, E.F.; BOHNERT, H.J. (1992) Convergent induction of osmotic stress-responses. Abscisic acid, cytokinin, and the effects of NaCl. *Plant Physiology*, **100**: 416-423.
- VOMACKA, L.; POSPISILOVA, J. (2003) Rehydration of sugar beet plants after water stress: effect of cytokinins. *Biologia Plantarum*, **46**: 57-62.

- WINTER, K.; SMITH, J.A.C. (1996). An introduction to crassulacean acid metabolism. Biochemical principles and ecological diversity. In “Crassulacean acid metabolism. Biochemistry, ecophysiology and evolution”. (Eds K. Winter, JAC Smith). *Springer- Verlag; Berling*, 1-13.
- WINTER, K.; GARCIA, M.; HOLTUM, J.A.M. (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**: 1829–1840.
- WINTER, K.; HOLTUM, J.A.M. (2011) Induction and reversal of crassulacean acid metabolism in *Calandrinia polyandra*: effects of soil moisture and nutrients. *Functional Plant Biology*, **38**: 576-582.
- YODER, J.A.; IMFELD, S.M.; HEYDINGER, D.J.; HART, C.E.; COLLIER, M.H.; GRIBBINS, K.M.; ZETTLER, L.W. (2010) Comparative water balance profiles of Orchidaceae seeds for epiphytic and terrestrial taxa endemic to North America. *Plant Ecology*, **211**, (1): 7-17.
- YUAN, M.; XU, F.; WANG, A.D.; ZHANG, D.W.; ZHANG, Z.W.; CAO, Y.; XU, X.C.; LUO, M.H.; YUAN, S. (2012) A single leaf of *Cammelia oleifera* has two types of carbon assimilation pathway, C₃ and crassulacean acid metabolism. *Tree Physiology*, **32**:2 188-199.
- ZOTZ G.; THOMAS V. (1999) How much water is in the tank? Model calculations for two epiphytic bromeliads. *Annals of Botany*, **83**: 183-192.
- ZOTZ G.; HIETZ P. (2001) The physiological ecology of vascular epiphytes: current knowledge, open questions. *Journal of Experimental Botany*, **52**: 2067-2078.
- ZOTZ, G.; REICHLING, P.; VALLADARES, F. (2002) Assimilation study on the importance of size-related changes in leaf morphology and physiology for carbon gain in an epiphytic bromeliad. *Ann. Bot.* **90**: 437–443.