

CAMILA PEREIRA DE CARVALHO

**Tolerância ao frio e de-aclimatação em plantas
de *Nidularium minutum* Mez (Bromeliaceae)**

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da
Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de
DOUTORA em BIODIVERSIDADE
VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de
Concentração de Plantas Vasculares em Análises
Ambientais.

SÃO PAULO

2017

CAMILA PEREIRA DE CARVALHO

**Tolerância ao frio e de-aclimatação em plantas
de *Nidularium minutum* Mez (Bromeliaceae)**

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da
Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de
DOUTORA em BIODIVERSIDADE
VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de
Concentração de Plantas Vasculares em Análises
Ambientais.

ORIENTADORA: DRA. CATARINA CARVALHO NIEVOLA

CO-ORIENTADORA: DRA. MÁRCIA REGINA BRAGA

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Carvalho, Camila Pereira de
C331t Tolerância ao frio e de-aclimatação em plantas de *Nidularium minutum* Mez
(Bromeliaceae) / Camila Pereira de Carvalho -- São Paulo, 2017.
87p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio
Ambiente, 2017
Bibliografia.

1. Respostas rápidas. 2. Óxido nítrico. 3. Carboidratos solúveis. I. Título

CDU: 582.564

Aos meus pais e irmão, pelo
carinho e apoio.

Ao Gustavo, pelo incentivo,
amor e companheirismo.

Dedico.

*“Não importa quão estreito o portão
Quão repleta de castigo a sentença,
Eu sou o senhor de meu destino
Eu sou o capitão de minha alma.”*

Invictus – William Ernest Henley

*“Loucura? Sonho? Tudo é loucura ou sonho no começo.
Nada do que o homem fez no mundo teve início
de outra maneira, mas tantos sonhos se realizaram
que não temos o direito de duvidar de nenhum.”*

Monteiro Lobato

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Botânica de São Paulo e o programa de pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente pelo suporte e infraestrutura fornecidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de doutorado concedida.

À FAPESP pelo financiamento do projeto coordenado pela Dra. Catarina Carvalho Nievola (processo 2013/25047-0).

À minha orientadora, Dra. Catarina Carvalho Nievola, por todo carinho, confiança, paciência e incentivo ao longo desses quatro anos do desenvolvimento deste projeto.

À minha co-orientadora, Márcia Regina Braga, pelo apoio ao longo das análises de carboidratos, por estar sempre disponível a me receber e esclarecer minhas dúvidas.

Ao Prof. Edson Rodrigues, do Instituto de Biociências da Universidade de Taubaté, que abriu a porta do Laboratório de Bioquímica desta universidade e compartilhou comigo seu conhecimento sobre enzimas e técnicas de padronização, que foram essenciais para a execução deste projeto.

Ao Edinho e Mariana, agradeço o acolhimento e a paciência comigo durante as padronizações das enzimas antioxidantes. Vocês sempre foram solícitos e esclareceram todas as minhas dúvidas. Em especial a Mariana, minha eterna amiga e companheira de trabalho, compartilhando comigo a vida de pós-graduanda.

À Kelly Ramos, técnica do Laboratório de Bioquímica da Universidade de Taubaté, pelo auxílio durante a padronização das análises.

Ao Pedro Bige Wasinger, técnico do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica, agradeço por toda a paciência e ajuda nas análises realizadas no Laboratório de Fisiologia.

À Dra. Marília Gaspar, do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica, pelo uso do espectrofotômetro.

À Michele, pelo grande auxílio com o HPLC.

Ao Dr. Emerson Alves da Silva e ao Rodrigo Sanchez, pelo uso do aparelho de fluorescência e discussões dos resultados.

À Dra. Silvia Souza, pelo auxílio com as análises das enzimas antioxidantes.

À Dra. Luciana Hertz, juntamente com o Vitor, pelo uso do liofilizador.

À Dra. Marina Crestana Guardia, do Núcleo de Pesquisa em Sementes do Instituto de Botânica, pelo uso do espectrofotômetro.

À Dra. Helenice Mercier, do Laboratório de Fisiologia Vegetal do Instituto de Biociências da USP, juntamente com Paulo Miotto, pelo uso do espectrofluorímetro para as análises de óxido nítrico.

À Maria Elizabeth Abreu, Antônio Azeredo Coutinho Neto e Ana Maria Rodrigues, por todo apoio e amizade durante as análises no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Instituto de Biociências da USP.

Ao Dr. Ladaslav Sodek da Universidade Estadual de Campinas, cujos ensinamentos durante a disciplina de Enzimologia Vegetal foram importantes para as análises realizadas neste trabalho.

À Poliana Cardoso-Gustavson, pelo auxílio nas análises de microscópicas de NO.

Aos pesquisadores e funcionários do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais, em especial ao Ivomar Medina pela ajuda durante as coletas em Paranapiacaba e no laboratório, Sr. Hugo pelo apoio no campo experimental e a D. Lúcia pelo auxílio no laboratório.

Ao Jorge Young Marx, agradeço pela amizade e auxílio durante as atividades de laboratório e também durante o deslocamento entre os diversos laboratórios do Instituto. Sua ajuda foi de imensa importância para a execução deste projeto, principalmente nesta etapa final.

Aos amigos do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais, Daniela, Victória, Fernanda, Pamela, Danilo, William, Sabrina, Priscila, Luana, Joice, Adriana e Luciana. À Victória e a Daniela por me receberem em sua casa e juntamente com a Fernanda, por toda amizade e carinho. À Priscila, que dividimos juntas as angústias e as alegrias das análises enzimáticas e com isso cresceu uma bela amizade. Ao William, pelas ideias criativas que me ajudaram muito no laboratório.

À Pamela e ao Danilo, pela amizade e por todo auxílio durante as coletas bioquímicas desse trabalho, sem vocês tudo isso não seria possível. Muito obrigada!

Aos funcionários da Biblioteca do Instituto de Botânica, pela atenção e bom atendimento.

Ao alojamento do Instituto de Botânica, em nome da funcionária responsável Dinorah Evangelista, por apoiar os alojados e sempre estar disposta a nos ouvir. Agradeço a todos os colegas de alojamento, em especial a Camila, Jennifer, Talita, Gisela, Thiago, Carin, Higor, Verinha e Andréa (Kanis). Vocês foram meus companheiros durante a minha estadia em São Paulo, me acolheram e tornaram tudo mais fácil. Agradeço pelos desabafos, pelas conversas, pelo carinho, por vocês terem feito parte de tudo isso!

Em especial, à Vera e à Kanis, eternas quarto 4, vocês me apoiaram em todos os momentos, acredito que sem a amizade de vocês seria muito mais difícil estar longe de casa.

À Marta, Dô e Thiago, por sempre me acolherem em sua casa com os braços abertos, com todo carinho e amor. A ajuda de vocês foi essencial para a realização do meu doutorado. Não tenho palavras para agradecer!

Às minhas amigas Julia e Mariana, por sempre me incentivarem a lutar pelos meus sonhos, pelos momentos de descontração e risadas. Vocês são muito especiais!

Aos meus pais, avós e irmão por me apoiarem e me ampararem nos momentos difíceis, pela paciência, pela compreensão dos meus períodos de ausência. Amo muito vocês!

À Benê e meus sobrinhos lindos, pelos momentos de descontração, renovando minhas energias para continuar a seguir em frente.

Ao meu querido Gustavo, pelo amor e carinho dedicados, pela enorme paciência, por ouvir meus desabafos, por compreender o meu sonho e me ajudar a conquistá-lo.

Registro minhas desculpas aos nomes que não tenha mencionado, mas agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

Análises climáticas indicam que maiores amplitudes térmicas, associadas a eventos de frio súbito, podem aumentar em regiões tropicais, mesmo em um cenário de aquecimento global. *Nidularium minutum* Mez é uma bromélia tropical que habita uma região com grande amplitude térmica (2-30 °C) e com temperaturas mínimas atingindo 1,6 °C. Estudos prévios mostram que esta bromélia é capaz de tolerar a exposição a baixa temperatura por seis meses, apresentando redução do crescimento, ajustes bioquímicos e alterações anatômicas sem ocorrência de danos aos tecidos vegetais. Além disso, foi verificado uma retomada do crescimento quando essas plantas foram transferidas para temperaturas maiores, processo conhecido como de-aclimação, indicando a plasticidade dessa espécie às alterações térmicas. No caso de ocorrência de frio súbito, as respostas das plantas devem ser rápidas e eficientes para garantir a sua sobrevivência e aclimação, mas apesar de importantes, essas alterações são pouco conhecidas para plantas tropicais. O objetivo desse trabalho foi verificar se as respostas fisiológicas e bioquímicas encontradas nas primeiras horas de resfriamento (10 °C) em *Nidularium minutum* estariam envolvidas na tolerância ao frio dessa espécie, avaliando quais alterações adquiridas durante a aclimação à baixa temperatura poderiam ser revertidas com a de-aclimação a 25 °C. Primeiramente, as plantas foram cultivadas por cinco meses a 25 °C e depois foram transferidas para câmaras de crescimento a 10 °C por 72 h. Na etapa de de-aclimação, após 72 h de exposição ao frio, um lote foi transferido para 25 °C e outro foi mantido a 10 °C por 168 h. Foi verificado um aumento nos níveis da enzima nitrato redutase (NR) após 72 h de frio, o que foi associado com os altos níveis de óxido nítrico (NO) encontrados. Uma redução nos níveis das enzimas antioxidantes e o aumento da peroxidação lipídica (LPO) ocorreram durante este período, sugerindo uma condição de estresse oxidativo. Ainda nas primeiras horas de resfriamento, foi verificado para essa bromélia um acúmulo de carboidratos solúveis, em especial sacarose. A partir de 72 h de exposição ao frio, as respostas de estresses encontradas se tornaram menos intensas, sugerindo que a partir desse momento esta planta estaria aclimatada ao frio. Quando as plantas foram transferidas para 25 °C, a atividade da NR diminuiu e, conseqüentemente, a concentração de NO, levando a redução nos níveis da maioria dos parâmetros de estresse

ao frio logo nas primeiras 24 h de cultivo a 25 °C. Os carboidratos solúveis também rapidamente diminuíram com a de-aclimatação, sugerindo a recuperação de *N. minutum* após a exposição ao frio. Esses resultados mostraram que a variação nos níveis de NO e o acúmulo de carboidratos seriam importantes respostas de aclimatação ao frio e a de-aclimatação nesta bromélia. Considerando as previsões futuras de aumento da amplitude térmica e eventos de frio súbito, este trabalho pode colaborar no entendimento dos mecanismos de ajustes rápidos existentes para que essas espécies sobrevivam e mantenham a homeostase frente às mudanças térmicas.

Palavras-chave: amplitude térmica, baixa temperatura, carboidratos solúveis, enzimas antioxidantes, óxido nítrico, resfriamento, respostas rápidas.

ABSTRACT

Climate model simulations indicate that large thermal amplitude associated with abrupt cold events may increase in tropical regions, even in a warming scenario. *Nidularium minutum* Mez is a tropical bromeliad that occurs in a region with a high thermal amplitude range from 2 to 30 °C and minimum temperatures reaching 1.6 °C. Previous studies showed that cold tolerance for this bromeliad during six months at 10 °C resulted in reduction of growth, biochemical adjustments and anatomical changes without occurrence of tissues damages. Growth has ceased when *N. minutum* plants were transferred to a higher temperature, a process named de-acclimation, which indicate the plasticity of this species to thermal changes. In abrupt cold events, plant responses should be fast and efficient to ensure their survival and acclimation, however these changes are still unknown for tropical plants. The aim of this study was to verify whether physiological and biochemical responses of *N. minutum* found in the first hours of chilling (10 °C) would be involved in the cold tolerance of this species. Another aim was to analyze which changes during low temperature acclimation could be reversed in de-acclimation at 25 °C. Hence, plants were grown for five months at 25 °C and were transferred to growth chambers adjusted to 10 °C for 72 h. For the de-acclimation phase, after 72 h of cold exposure a subset was transferred to 25 °C while another group remained at 10 °C for 168 h. An increase in nitrate reductase (NR) enzyme activity was observed after 72 h of cold, which was associated with high levels of nitric oxide (NO). Reduction in antioxidant enzymes levels and increased lipid peroxidation (LPO) occurred during this period, suggesting an oxidative stress condition. Also in the first hours of chilling, an accumulation of soluble carbohydrates, especially sucrose, was verified in this bromeliad. After 72 h of cold exposure, the stress responses found were less intense, suggesting a cold acclimation from that stage. When plants were transferred to 25 °C, NR and NO levels decreased, leading to a fast reduction in the intensity of most cold stress parameters. Soluble sugars also fast decreased in de-acclimation phase, suggesting a recovery of cold stress. These results showed that variations in NO levels and in sugars accumulation would be related to cold acclimation and de-acclimation of this bromeliad. Considering the future projections to large thermal amplitude and abrupt cold events, this

work can contribute to understanding the rapid adjustment mechanisms involved in the survival of this species face in thermal changes.

Keywords: antioxidant enzymes, chilling, low temperature, nitric oxide, rapid responses, soluble carbohydrates, thermal changes.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
1. Efeito da baixa temperatura nas plantas tropicais	1
2. Respostas rápidas de exposição ao frio em plantas	3
2.1. Óxido nítrico & nitrato redutase	4
2.2. Sistema antioxidante e danos de membrana	6
2.3. Medidas de fluorescência da clorofila <i>a</i> e pigmentos fotossintéticos	8
3. Papel dos carboidratos no estabelecimento da tolerância ao frio	9
4. Hipóteses e Objetivos	11
4.1. Objetivo geral	11
4.1.1. Objetivos específicos	11
5. Metodologia utilizada	12
5.1. Exposição ao frio	12
5.2. De-aclimatação	12
6. Referências Bibliográficas	14
CAPÍTULO 1: Variations in nitric oxide content, NR activity and levels of antioxidant enzymes during cold tolerance in the tropical bromeliad <i>N. minutum</i> Mez	21
ABSTRACT	22
1. INTRODUCTION	23
2. MATERIAL AND METHODS	25
2.1. Plant material and growth conditions	25
2.2. Nitrate reductase activity	27
2.3. NO emission	27
2.4. NO imaging	27
2.5. Nitrate and ammonium determination	28
2.6. Lipid peroxidation (LPO)	28
2.7. Antioxidant activity	28
2.8. Pigment determination	29
2.9. Chlorophyll <i>a</i> fluorescence measurements	30
2.10. Data analysis	30
3. RESULTS	30
4. DISCUSSION	35

5. REFERENCES	40
CAPÍTULO 2: Changes in sugar content are involved in the early responses of the bromeliad <i>Nidularium minutum</i> Mez to cold	48
ABSTRACT	49
1. INTRODUCTION	50
2. MATERIAL AND METHODS	51
2.1. Plant material and thermal treatments	51
2.2. Extraction and analyses of soluble sugars	52
2.3. Data analysis	52
3. RESULTS	53
4. DISCUSSION	54
5. REFERENCES	58
CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
1. Perspectivas futuras	65
2. Referências Bibliográficas	65
ANEXO A – Padronização das condições para análises bioquímicas	68

INTRODUÇÃO GERAL

1. Efeito da baixa temperatura nas plantas tropicais

Em condições naturais, as plantas estão frequentemente expostas ao estresse ambiental. Segundo Iba (2002), o estresse mais comum ao qual a planta está sujeita é o estresse térmico, sendo que alterações de temperatura ocorrem entre as estações do ano e também durante o ciclo de 24 horas do dia, sendo verificada, em geral, baixa temperatura noturna e alta temperatura no período diurno (Ruelland & Zachowski 2010). Mesmo ao longo de um único dia, o frio súbito pode ocorrer quando nuvens escondem o calor do sol. A temperatura ótima de crescimento varia entre as espécies e influencia sua distribuição, que é determinada pela extensão da zona térmica na qual cada espécie pode sobreviver (Iba 2002). Quando comparada aos outros tipos de estresse, verifica-se que em poucos minutos os vegetais podem apresentar sintomas relacionados a alterações de temperatura, enquanto o estresse nutricional, por exemplo, induz sintomas meses após sua instalação (Larcher 2006).

Considerando que as plantas são seres sésseis, devem possuir adaptações que possibilitem os ajustes às variações térmicas de modo rápido de acordo com o ambiente que ocupam, notadamente em relação às flutuações da temperatura (Atkinson & Urwin 2012). A exposição ao frio é um dos principais estresses ambientais que influenciam o crescimento e desenvolvimento das plantas (Janská *et al.* 2010). O termo frio ou resfriamento está relacionado com a exposição das plantas a temperaturas baixas, porém acima de 0 °C (Puyaubert & Baudouin 2014).

Aproximadamente 57% das áreas de terra do mundo são afetadas pelo estresse do frio (Cramer *et al.* 2011), e estas regiões podem se expandir devido a alterações na circulação atmosférica causadas pelo aumento dos gases de efeito estufa (Petoukhov & Semenov 2010), o que pode levar a extinção de várias espécies. As plantas de clima temperado costumam ser tolerantes às baixas temperaturas, com alta sobrevivência durante a exposição a variações térmicas entre 0 e 5 °C, enquanto as plantas de clima tropical podem sofrer injúrias em temperaturas menores do que 10 °C (Rao 2004). Entretanto, períodos de frio súbito podem ocorrer em regiões tropicais (Marengo *et al.* 1997, Mailler & Lott 2015, Müller *et al.* 2015), e essas mudanças bruscas são particularmente prejudiciais em espécies com longo tempo de vida ou seres sésseis (Alley *et al.* 2003), como é o caso dos vegetais. Análises de modelos de simulação climática

mostram que esses eventos de frio ocorrerão com mais frequência no século 21 do que ocorreram no século passado, persistindo nos continentes mesmo sob cenários de aquecimento global, estando a América do Sul entre os locais predominantemente afetados (Kodra *et al.* 2011).

A causa física para esses eventos no Brasil seria a entrada de um anticiclone de núcleo frio do Pacífico oriental para a América do Sul, que seguiria sobre os Andes e ao atingir sua posição mais setentrional no sudeste do Brasil, o clima frio afetaria esta região e poderia chegar até a Amazônia após 24 h (Marengo *et al.* 1997). Durante esses episódios, podem ocorrer variações na amplitude térmica resultante de uma maior diminuição das temperaturas mínimas e um menor aumento das temperaturas máximas diárias (Pancel & Köhl 2016). Essas variações podem chegar até 15 °C em um único dia (Marengo *et al.* 1997).

Estudos realizados no Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais relataram tolerância ao frio em espécies tropicais, membros da família Bromeliaceae (Nievola *et al.* 2005, Pedroso *et al.* 2010, Mollo *et al.* 2011, Carvalho *et al.* 2013). Essa família possui cerca de 60 gêneros e 3.248 espécies (Luther 2010), cujos representantes estão presentes em praticamente todos os ambientes neo-tropicais, estendendo-se do nível do mar à cordilheira dos Andes e desde locais úmidos como a Mata Atlântica até regiões secas como a Caatinga (Nunes 2006). Essa distribuição indica plasticidade na ocupação de uma variedade de ambientes com condições por vezes consideradas estressantes, que incluem temperaturas que variam de 0 a 38 °C, seca, sol intenso, além da escassez de nutrientes (Benzing 2000), revelando a existência de adaptações diversas.

O termo adaptação refere-se a uma resposta genética a mudanças ambientais de longo prazo, sendo que estas alterações ocorridas no genoma são estáveis e permanecem na população por gerações (Huner *et al.* 1998). Contudo, o termo tolerância refere-se à aptidão da planta para enfrentar um ambiente desfavorável (Larcher 2006), e as mudanças realizadas durante essa exposição muitas vezes podem ser revertidas quando o estresse é diminuído.

A Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, no estado de São Paulo, um dos remanescentes de Mata Atlântica, apresenta períodos de frio e uma grande amplitude térmica que pode variar de 2 a 30 °C, com temperaturas médias de 14 °C no inverno e com mínimas registradas de 1,6 °C (Gutjahr & Tavares 2009). Endêmica dessa região, a bromélia *Nidularium minutum* Mez, que apresenta valor ornamental e está classificada como vulnerável na lista publicada no Livro Vermelho das Espécies Vegetais

Ameaçadas de Extinção (Mamede *et al.* 2007), foi relatada como tolerante ao frio quando exposta a 10 °C constantes por seis meses (Carvalho *et al.* 2013). Esta espécie é terrícola e possui a folhagem de coloração verde-clara intensa, com brácteas verdes e as extremidades avermelhadas com flores brancas, características que lhe conferem um potencial ornamental (Tavares & Barros 2009).

Os estudos de tolerância ao frio permitiram verificar que era possível o estabelecimento de uma coleção *in vitro* sob crescimento lento dessa bromélia, visando sua preservação, pois permanecem viáveis por até seis meses sem danos aos tecidos vegetais (Carvalho *et al.* 2013). Não foram detectadas anomalias que impossibilitassem o desenvolvimento dessas plantas, sendo que apenas apresentavam a redução do crescimento, resultado desejável para a formação da coleção *in vitro*. Entretanto, ao serem retiradas dos frascos e transferidas para temperaturas maiores (25 °C), foi verificado que algumas alterações ocorridas durante o cultivo prolongado sob baixas temperaturas poderiam ser revertidas, sugerindo que essas modificações seriam respostas temporárias relacionadas à tolerância ao resfriamento (Carvalho *et al.* 2013). Esta perda das características adquiridas durante a aclimação ao frio, após o aumento da temperatura, é um processo denominado na literatura como de-aclimação (Sasaki *et al.* 2001, Gorsuch *et al.* 2010). Pouco se sabe sobre essas alterações em plantas de clima tropical.

2. Respostas rápidas de exposição ao frio em plantas

Os ajustes fisiológicos e bioquímicos, necessários para garantir a sobrevivência das plantas tropicais frente aos possíveis episódios de frio súbito e aumento na amplitude térmica devem ser rápidos e eficientes, como indicados em estudos que avaliam respostas frente as variações na temperatura (Bogdanović *et al.* 2008, Mai *et al.* 2009, Airaki *et al.* 2012).

Estes ajustes são diversos, envolvendo tanto o acúmulo como o decréscimo de moléculas (Cantrel *et al.* 2011, Airaki *et al.* 2012), sendo que esta variação pode ser influenciada pelo tempo de exposição ao frio (Mai *et al.* 2009), o que pode alterar a resposta da planta a este estresse.

Dentre os fatores de aclimação e de-aclimação, dados da literatura apontam para elementos sinalizadores e/ou de metabolismo básico. Portanto, para se obter uma visão mais completa dos efeitos das primeiras horas de resfriamento sobre a bromélia *N. minutum*, uma série de parâmetros conhecidos por serem afetados pela temperatura foram

monitorados. Esses parâmetros selecionados são apontados na literatura como indicadores das respostas iniciais ou uma possível tolerância das plantas ao estresse, sendo eles a avaliação do conteúdo de óxido nítrico (NO, sigla do inglês) (Cantrel *et al.* 2011), a atividade das enzimas antioxidantes (Jan *et al.* 2013) e da enzima nitrato redutase (NR) (Yaneva *et al.* 1996), os danos de membrana (Mai *et al.* 2009), medidas de fluorescência da clorofila *a* (Hou *et al.* 2016), o conteúdo de pigmentos fotossintéticos (Haldimann 1999) e de carboidratos solúveis (Kaplan & Guy 2004), o que nos permitiu avaliar o funcionamento do aparato fotossintético, o nível do estresse oxidativo, o funcionamento do sistema antioxidante e a osmorregulação durante a exposição ao frio nesta bromélia. Abaixo segue a descrição desses parâmetros analisados durante este estudo.

2.1. Óxido nítrico & nitrato redutase

O óxido nítrico está relacionado com a expressão dos principais genes regulados pelo frio, por isso é considerado uma importante molécula na sinalização durante o resfriamento (Puyaubert & Baudouin 2014, Chamizo-Ampudia *et al.* 2017).

O NO é uma molécula gasosa com uma estrutura simples, pequenas dimensões e alta difusividade – propriedades mínimas requeridas para uma substância ser considerada um sinalizador celular (Khan *et al.* 2014). É considerado um radical livre, que por definição são moléculas que contém elétrons desemparelhados e são altamente reativas, iniciando reações em cadeia ao extrair um elétron de uma molécula vizinha para completar seu próprio orbital (Nelson & Cox 2014), podendo reagir com vários componentes celulares como tióis, cofatores enzimáticos, proteínas, nucleotídeos e lipídeos (Lima & Abdalla 2001). O óxido nítrico, juntamente com seus compostos derivados, como o peroxinitrito (ONOO⁻) e o radical dióxido de nitrogênio (*NO₂), são coletivamente chamados de espécies reativas de nitrogênio (RNS, da sigla em inglês) (Baudouin 2011).

A sinalização do NO e derivados ocorre por meio de modificações pós-traducionais em proteínas através de diversos mecanismos como *S*-nitrosilação, nitração e ligação a centros metálicos (Besson-Bard *et al.* 2008). Essas modificações tem como alvo resíduos de tirosina, tióis, DNA e lipídeos (Khan *et al.* 2014), ocorrendo em alvos específicos e afetando o metabolismo e a expressão de genes, o que leva ao controle do desenvolvimento ou da resposta ao estresse (Begara-Morales *et al.* 2015).

Estudos identificaram moléculas que podem ser possíveis alvos dessas modificações do NO e entre elas se incluem enzimas relacionadas ao estresse oxidativo, como a superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), glutatona redutase (GR) e catalase (CAT) (Clark *et al.* 2000, Lindermayr *et al.* 2005, Lin *et al.* 2011, Begara-Morales *et al.* 2014); proteínas do citoesqueleto; enzimas do metabolismo energético como a enolase, fosfoglicerato quinase, malato desidrogenase e aconitase; e proteínas de regulação, como o fator de iniciação eIF-4A1 (Lindermayr *et al.* 2005).

Embora o mecanismo molecular responsável pela síntese de NO em plantas seja controverso, L-arginina e nitrito são considerados os principais precursores de NO (Salgado *et al.* 2013). Em mamíferos, a maior via de produção de NO é a oxidação NADPH-dependente da L-arginina em L-citrulina, catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS, sigla em inglês), entretanto nenhum gene homólogo a NOS de mamíferos foi encontrado em plantas (Khan *et al.* 2014). A redução do nitrito pode ocorrer tanto de forma não-enzimática como enzimática. De forma não-enzimática, a redução do nitrito ocorre no apoplasto devido a condições ácidas ou a presença de ácido ascórbico ou fenóis (Khan *et al.* 2014). A enzima nitrato redutase (NR) estaria envolvida ao reduzir nitrito e produzir NO, sendo que muitos estudos apontam esta via como uma importante fonte de NO em plantas (Salgado *et al.* 2013).

NR é a enzima chave do metabolismo do nitrogênio, participando da redução do nitrato em nitrito, que posteriormente é reduzido para amônio pela enzima nitrito redutase e o amônio formado será utilizado na produção de aminoácidos (Buchanan *et al.* 2015). Para produzir NO, a NR troca o nitrato, seu substrato de maior afinidade, pelo nitrito, gerando NO (Salgado *et al.* 2013, Khan *et al.* 2014) (Fig. 1). Esta regulação parece ocorrer em função da concentração do substrato, portanto altos níveis de nitrito são necessários para competitivamente inibir a redução do nitrato (Kaiser & Huber 2001). Em plantas mantidas no frio, esta via é considerada uma das principais para produção de NO (Zhao *et al.* 2009, Cantrel *et al.* 2011, Ziogas *et al.* 2013). Em *Arabidopsis thaliana* foi verificada uma maior produção de NO a partir de 1 h de cultivo a 4 °C, sendo que essa produção precoce foi atribuída a NR (Cantrel *et al.* 2011).

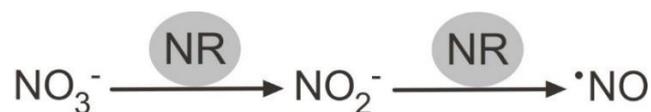


Figura 1 – Síntese de óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) em plantas a partir da redução do nitrito (NO_2^-) pela enzima nitrato redutase (NR). NO_3^- , nitrato. Adaptado de Röszer (2012).

2.2. Sistema antioxidante e danos de membrana

Durante a exposição ao frio, alterações no metabolismo podem induzir um estresse oxidativo nas células promovendo a geração e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), que apresentam uma função sinalizadora, podendo contribuir para a ativação de segundos mensageiros, indução de transcrição gênica e mudanças na atividade enzimática (Farnese *et al.* 2016). Casos essas ROS aumentem em situação de estresse, pode ocorrer a oxidação de componentes celulares, prejudicando as atividades metabólicas e afetando a integridade das organelas (Suzuki *et al.* 2012).

A produção de ROS, como por exemplo oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), é consequência das reações do metabolismo aeróbico. Os principais locais de produção de ROS são a cadeia transportadora de elétrons do cloroplasto e da mitocôndria (Buchanan *et al.* 2015). As plantas eliminam o excesso das ROS através do sistema de defesa antioxidante, que pode ser enzimático ou não-enzimático, presente em vários compartimentos subcelulares (Suzuki & Mittler 2006).

Entre os componentes do sistema de defesa antioxidante não enzimático estão o ascorbato, a glutathiona, os tocoferóis (vitamina E) e os carotenoides, já o sistema enzimático inclui por exemplo as enzimas SOD, APX, CAT e GR (Buchanan *et al.* 2015). A SOD é a primeira enzima de desintoxicação das ROS, dismutando o $\cdot\text{O}_2^-$ em H_2O_2 , que é convertido em H_2O pelas enzimas CAT e APX (Gupta *et al.* 2016). Esta última enzima também atua dentro do ciclo ascorbato-glutathiona juntamente com a GR e diversos outros componentes enzimáticos, onde são responsáveis por regenerarem o ascorbato e a glutathiona reduzida (Anjum *et al.* 2010). A figura 2 mostra um esquema com os principais componentes do sistema antioxidante.

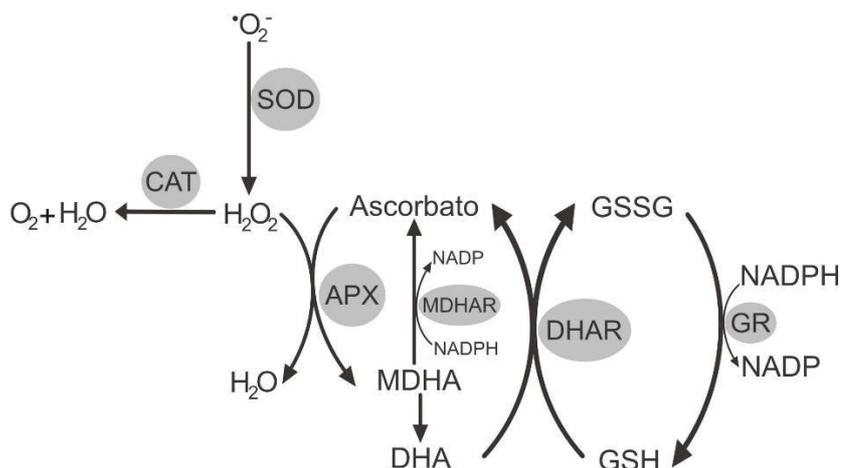


Figura 2 – Principais componentes do sistema antioxidante em plantas. $\text{O}_2^{\bullet -}$, superóxido; H_2O_2 , peróxido de hidrogênio; MDHA, monodehidroascorbato; DHA, dehidroascorbato; GSSG, glutathiona reduzida; GSH, glutathiona oxidada; SOD, superóxido dismutase; CAT, catalase; APX, ascorbato peroxidase; MDHAR, MDHA redutase; DHAR, DHA redutase; GR, glutathiona redutase. Adaptado de Buchanan *et al.* (2015).

Em plantas de melancia (*Citrullus lanatus* (Thomb.) Mansf.) cultivadas a 10 °C por 30 dias foi verificado aumento na atividade da SOD quando comparado com plantas crescidas a 35 °C (Rivero *et al.* 2002). Na seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) cultivada nesta mesma temperatura por até 96 h, também foi observado aumento na atividade da SOD e de outras enzimas antioxidantes, como a GR e APX, em relação às plantas crescidas a 28 °C (Mai *et al.* 2009). Estes autores também encontraram aumento na expressão dos genes codificando essas enzimas, sendo que este aumento já era significativo após 4 h de exposição ao frio. Com a de-aclimatação destas plantas a 28 °C, foi possível verificar a redução da expressão dos genes destas enzimas antioxidantes.

Uma das funções do sistema antioxidante é prevenir o surgimento de danos nas membranas, que podem levar a peroxidação lipídica (LPO, sigla em inglês), um processo que pode ser avaliado e utilizado como um indicador do estresse oxidativo celular (Lima & Abdalla 2001). Em plantas de espinafre (*Spinacia oleracea* L. 'Daye') sob estresse, os altos níveis de LPO diminuíram com o aumento da concentração de NO, pois este foi relacionado com o aumento da atividade das enzimas antioxidantes (Zheng *et al.* 2016). Porém em plantas de seringueira mantidas a 10 °C por 96 h, o aumento das enzimas antioxidantes não foi suficiente para proteger as membranas já que foram mantidos os altos níveis de LPO durante o período de resfriamento, ocasionando danos celulares que foram demonstrados através do aumento no extravasamento de eletrólitos (Mai *et al.* 2009).

Portanto, estudos que avaliem o sistema antioxidante e os danos de membrana são importantes para o entendimento dos mecanismos envolvidos para garantir a sobrevivência durante o período de estresse por frio.

2.3. Medidas de fluorescência da clorofila *a* e pigmentos fotossintéticos

Durante o período de iluminação, os fótons incidentes são absorvidos pelos pigmentos do complexo antena (clorofilas e carotenoides) e a energia de excitação é primeiramente transferida para os centros de reação dos fotossistema II (PSII) e fotossistema I (PSI), onde será usada para os processos fotoquímicos da fotossíntese (Roháček & Barták 1999). Existem outras duas vias competitivas para essa energia, que são a perda na forma de calor (dissipação térmica) ou a reemissão de um fóton pela clorofila excitada, que com isso retorna para o seu estado-base, sendo este um processo conhecido como fluorescência da clorofila *a* (Buchanan *et al.* 2015). Medidas de fluorescência da clorofila *a* são utilizadas para investigar a eficiência e a regulação da fotossíntese, em especial sob condições de estresse (Lichtenthaler & Miehé 1997, Oliveira *et al.* 2009, Li *et al.* 2014).

Um dos parâmetros mais utilizados em estudos de fluorescência da clorofila *a* é o F_v/F_m , que representa a eficiência fotossintética do PSII (Maxwell & Johnson 2000). F_v é a fluorescência variável, que é a diferença entre a fluorescência máxima (F_m) e a mínima (F_0) no escuro; F_0 representa a emissão de luz pelas moléculas de clorofilas excitadas antes dessa energia ser dissipada para o centro de reação do PSII; os valores de F_m estão relacionados com a eficiência do processo fotoquímico (Roháček & Barták 1999).

Em situações de estresse térmico, pode ocorrer um desbalanço entre a capacidade de absorver e dissipar a energia ocasionando danos no fotossistema II, fenômeno chamado de fotoinibição (Miura & Furumoto 2013). Este fenômeno pode ser caracterizado pelo declínio dos valores de F_v/F_m com um aumento nos valores de F_0 , sendo reversível em uma escala de horas ou dias (Skillman & Osmond 1998). O dano causado pela fotoinibição é maior nas plantas cultivadas em baixa temperatura do que naquelas mantidas em temperaturas maiores (Hou *et al.* 2016).

Em plantas de seringueira cultivadas a 10 °C houve um declínio da taxa fotossintética e também nos valores de F_v/F_m , o que foi associado com fotoinibição (Mai *et al.* 2009). Porém, uma recuperação da eficiência do PSII ocorreu quando essas plantas foram transferidas para 28 °C. Plantas de milho (*Zea mays*) crescidas a 15 °C também apresentaram uma redução nas taxas de F_v/F_m e esse resultado foi relacionado com os

menores teores de pigmentos fotossintéticos encontrados nessas plantas (Fracheboud *et al.* 1999).

A avaliação do conteúdo de pigmentos fotossintéticos durante o crescimento em baixa temperatura é relevante, já que alterações nesses teores são considerados sintomas típicos de plantas sob estresse (Hou *et al.* 2016). Modificações nos pigmentos fotossintéticos foram relatadas para o milho quando cultivado a 14 °C (dia)/ 12 °C (noite) (Haldimann 1999) e para a ervilha (*Pisum sativum* L.) crescida a 4 °C (Georgieva & Lichtenthaler 2006). Entretanto, durante o cultivo a 15 °C da bromélia *Vriesea inflata* (Wawra) Wawra, não houve diferença em relação ao conteúdo de pigmentos fotossintéticos quando comparada com aquelas cultivadas a 28 °C, resposta que foi associada à aclimatação ao frio (Pedroso *et al.* 2010).

Para a bromélia *N. minutum*, o cultivo por seis meses a 10 °C foi correlacionado com menor conteúdo de clorofila em relação às plantas mantidas por três meses nas mesmas condições (Carvalho *et al.* 2013). Ao serem transferidas para uma temperatura maior, foi observado um aumento nesses pigmentos em ambos os tratamentos (Carvalho 2012).

Esses resultados indicam que a intensidade e a duração do estresse térmico exercem uma grande influência sobre o conteúdo dos pigmentos fotossintéticos e consequentemente, sobre a fotossíntese. Entretanto, a fotossíntese pode ser estimulada durante o frio, principalmente as enzimas do ciclo de Calvin, influenciando na síntese de carboidratos, que em geral são acumulados com a redução da temperatura (Gaur & Sharma 2014), como foi visto anteriormente para essa bromélia (Carvalho *et al.* 2013).

3. Papel dos carboidratos no estabelecimento da tolerância ao frio

Durante a exposição a baixa temperatura, os carboidratos podem contribuir para a estabilização de membranas, regulação gênica, sinalização e redução de radicais livres (Couée *et al.* 2006, Welling & Palva 2006). Os carboidratos também podem apresentar um papel osmoprotetor, contribuindo para a entrada de água nas células (Buchanan *et al.* 2015), efeito secundário do frio (Levitt 1980).

A seguir, alguns exemplos do papel dos carboidratos incluem a função antioxidante da glicose que estaria relacionada com a sua participação na via das pentoses-fosfato e o consequente aumento na produção de NADPH, um dos maiores cofatores das enzimas eliminadoras das ROS (Fig. 2), contribuindo para diminuir a

formação dessa molécula nas células expostas ao frio (Couée *et al.* 2006). Adicionalmente, Bogdanović *et al.* (2008) mencionam que a frutose tem um papel relevante como antioxidante, já que este açúcar pode ser duas vezes mais efetivo em remover $\square\text{O}_2^-$ do que a glicose e por isso foi associada como uma importante defesa durante o resfriamento. Foi observado que a rafinose estaria envolvida na estabilização do PSII em plantas aclimatadas ao frio (Knaupp *et al.* 2011) e, juntamente com a estaquiase, pode contribuir para o aumento da estabilidade dos fosfolipídios nas membranas (Hincha *et al.* 2003). O *myo*-inositol é um precursor de diversas moléculas, como lipídeos, galactinol, pinitol (Valluru & Van den Ende 2011) e ácido ascórbico (Ahmad 2014). A trealose é encontrada em um grande grupo de organismos, exceto vertebrados, e tem várias funções como reserva, transporte e proteção durante o estresse (Figueroa & Lunn 2016).

A sacarose, juntamente com os seus produtos de degradação glicose e frutose, estão entre os mais importantes carboidratos acumulados durante o estresse por frio (Couée *et al.* 2006), sendo que estudos mostram que as enzimas participantes do metabolismo desse carboidrato podem ser reguladas pela temperatura (Guy *et al.* 1992, Sasaki *et al.* 2001). A principal enzima envolvida na síntese da sacarose é a sacarose-fosfato sintase (SPS, sigla em inglês), sendo que a degradação desse açúcar ocorre através das enzimas sacarose sintase (SS) e invertases (Buchanan *et al.* 2015). Um aumento na atividade da enzima SPS foi verificado após o cultivo por 24 h a 4 °C em *Arabidopsis thaliana* (Nägele *et al.* 2011) e em 72 h para o repolho (*Brassica oleracea* L.) crescido a 5 °C (Sasaki *et al.* 2001). Estes últimos autores observaram que, ao transferir o repolho para temperaturas maiores, há uma redução no conteúdo de sacarose, glicose e frutose e na atividade das enzimas do metabolismo de açúcares (SS e SPS), demonstrando que para essa espécie as alterações metabólicas causadas pelo crescimento no frio foram reversíveis (Sasaki *et al.* 2001).

A avaliação do conteúdo de carboidratos solúveis em bromélias cultivadas no frio por tempo prolongado foi realizada (Mollo *et al.* 2011, Carvalho *et al.* 2013), porém é desconhecido se esses açúcares poderiam estar envolvidos nas respostas ao frio em *N. minutum* logo nas primeiras horas de frio.

4. Hipóteses e Objetivos

A bromélia tropical *N. minutum* é considerada tolerante ao frio, pois sobreviveu a baixa temperatura por até seis meses (Carvalho *et al.* 2013), porém não são conhecidos os ajustes fisiológicos e bioquímicos envolvidos durante as primeiras horas de exposição ao frio nessa espécie, que seriam cruciais para garantir a sobrevivência aos eventos de frio súbito que podem ocorrer nesses biomas.

A hipótese deste trabalho é verificar se há uma correlação entre as diferenças nas concentrações de NO, ao longo da exposição ao frio dessa bromélia, e as respostas rápidas que determinam sua sobrevivência, principalmente em relação ao aumento do sistema de defesa antioxidante e a diminuição dos danos causados pela baixa temperatura, sendo que o aumento dos carboidratos solúveis contribuiria para esta tolerância. Além disso, durante a de-aclimatação acredita-se que essas respostas possam ser revertidas. Dessa forma, este trabalho visa responder as seguintes questões:

(1) Existe relação entre os níveis de óxido nítrico e as respostas rápidas que ocorrem durante a aclimação ao frio e de-aclimatação em *N. minutum*?

(2) O acúmulo de carboidratos contribuiria para a aclimação ao frio logo nas horas iniciais de exposição, modificando sua resposta após a de-aclimatação?

Considerando-se que alterações climáticas futuras possam levar a um aumento nas regiões tropicais da amplitude térmica e eventos de frio súbito (Pancel & Köhl 2016), este trabalho pode colaborar no entendimento dos mecanismos de ajustes rápidos existentes para que essas espécies sobrevivam às mudanças térmicas.

4.1. Objetivo geral

O objetivo desse trabalho foi verificar as respostas fisiológicas e bioquímicas encontradas nas primeiras horas de exposição à 10 °C em plantas de *Nidularium minutum*, avaliando quais alterações adquiridas durante a aclimação à baixa temperatura poderiam ser revertidas com a de-aclimatação a 25 °C.

4.1.1. Objetivos específicos

- Verificar a possível relação entre a produção de NO e atividade da enzima NR durante a exposição inicial ao frio em *N. minutum*, avaliando ainda se ocorreriam alterações no conteúdo de NO durante a aclimação ao frio e na de-aclimatação a 25 °C;

- Avaliar se ocorreram danos oxidativos e relacionar com os níveis das enzimas do sistema antioxidante durante a exposição inicial ao frio e a de-aclimação nessa bromélia;
- Analisar a eficiência do fotossistema II através das medidas de fluorescência da clorofila *a* e verificar se o conteúdo de pigmentos fotossintéticos poderia influenciar nessa resposta durante o resfriamento e de-aclimação;
- Verificar se há variação no acúmulo de carboidratos logo nas horas iniciais de frio e durante a fase de de-aclimação.

5. Metodologia utilizada

5.1. Exposição ao frio

Sementes de *Nidularium minutum* Mez (Fig. 3A e B) foram coletadas de plantas existentes na Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba – SP. Após germinação a 25 °C por 30 dias, as plantas foram transferidas para bandejas de plástico preenchidas com substrato de casca de *Pinus* moída (Carvalho *et al.* 2013) (Fig. 3C). Para evitar a perda excessiva de umidade, estas foram envolvidas por saco plástico transparente (Fig. 3D) e permaneceram nas mesmas condições descritas anteriormente por cinco meses. Posteriormente, as plantas foram transferidas para câmaras de germinação na temperatura de 10 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 h (Fig. 3E). Essa temperatura foi escolhida pois é considerada baixa para plantas de clima tropical (Rao 2004). Para uniformizar a influência da luz destas câmaras sob as plantas, foi realizado um rodízio semanal das bandejas entre as prateleiras.

As análises fisiológicas e enzimáticas da parte aérea das plantas foram realizadas após 3, 24, 48 e 72 horas de exposição ao frio (Fig. 4).

5.2. De-aclimação

Após 72 horas de crescimento na temperatura a 10 °C, cerca de 1000 plantas foram transferidas para a temperatura de 25 °C, sendo que um lote permaneceu na temperatura de 10 °C. As análises fisiológicas e enzimáticas da parte aérea das plantas foram realizadas 24, 48, 72 e 168 horas após o início da etapa de de-aclimação (Fig. 4).

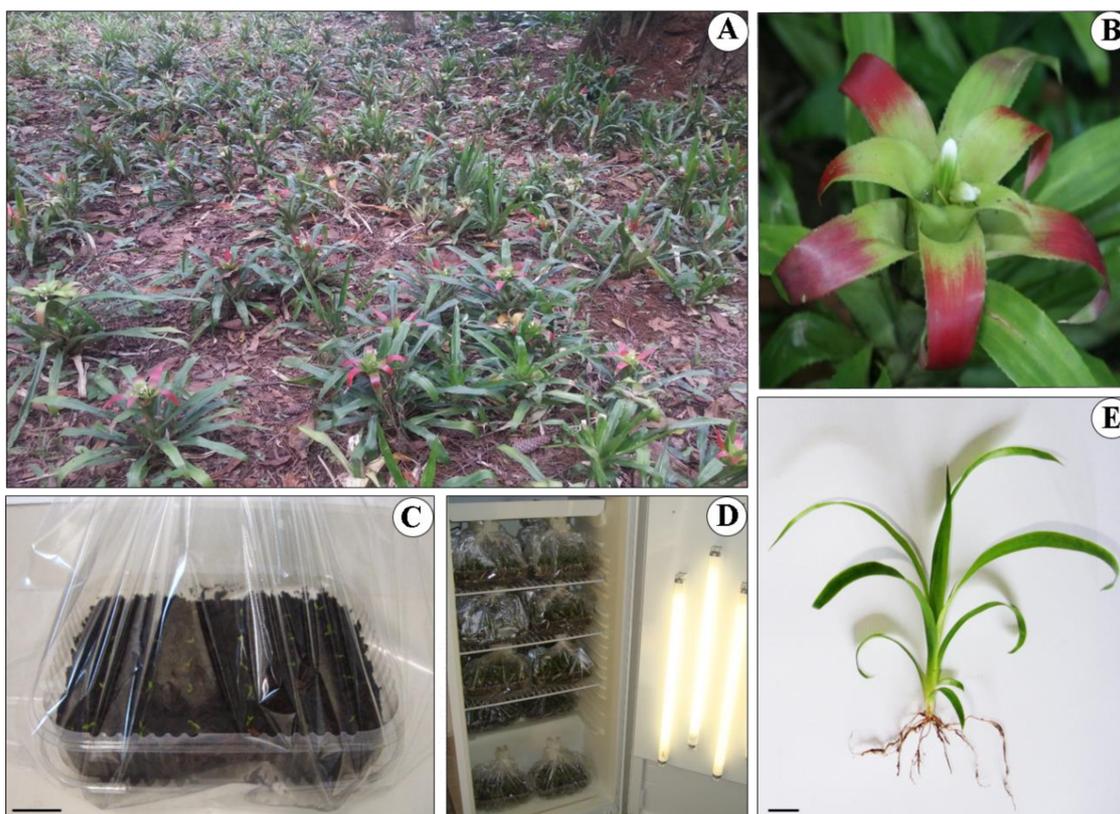


Figura 3 – *Nidularium minutum* Mez. (A) Indivíduos em seu hábitat natural. (B) Detalhe da inflorescência. (C) Plantas com 30 dias transferidas para bandejas. (D) Bandejas com plantas de cinco meses de idade na câmara de crescimento. (E) Detalhe de uma planta com cinco meses, antes de serem submetidas aos tratamentos térmicos. Barras= 3 cm (C); 1 cm (E).

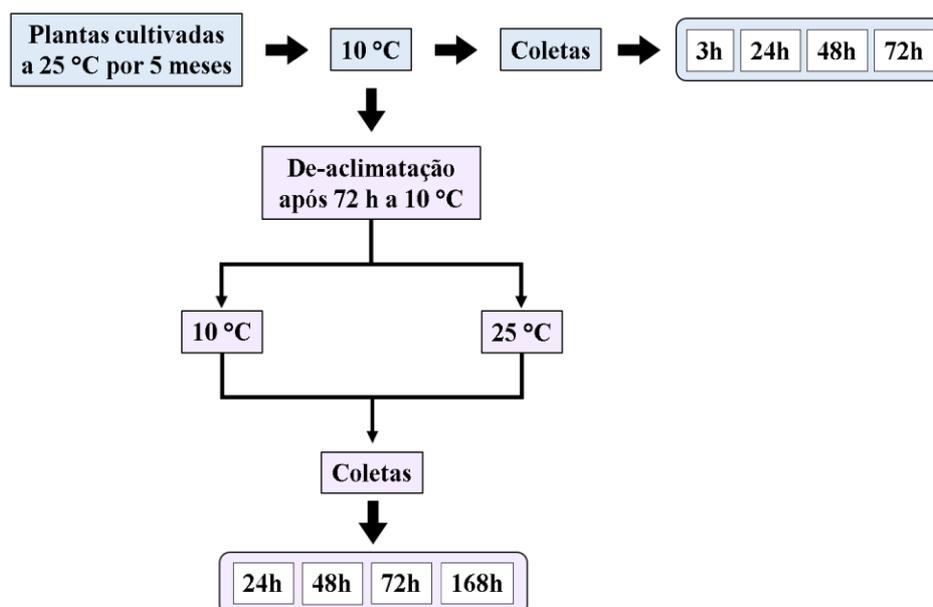


Figura 4 – Fluxograma experimental dos tratamentos de exposição ao frio (azul) e de-aclimatação (roxo).

O texto desta tese está subdividido em 2 capítulos que reúnem os dados referentes a primeira e a segunda questão levantada no trabalho, respectivamente. No final dessa tese foi incluído um anexo que reúne os dados referentes à padronização dos ensaios enzimáticos e análises fisiológicas.

6. Referências Bibliográficas

- Ahmad, P.** 2014. Oxidative Damage to Plants. Elsevier, San Diego.
- Airaki, M., Leterrier, M., Mateos, R.M., Valderrama, R., Chaki, M., Barroso, J.B., del Río, L.A., Palma, J.M. & Corpas, F.J.** 2012. Metabolism of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under low temperature stress. *Plant, Cell and Environmental* 35: 281–295.
- Alley, R.B., Marotzke, J., Nordhaus, W.D., Overpeck, J.T., Peteet, D.M., Pielke, R. a, Pierrehumbert, R.T., Rhines, P.B., Stocker, T.F., Talley, L.D. & Wallace, J.M.** 2003. Abrupt climate change. *Science* 299: 2005-2010.
- Anjum, N.A., Chan, M.-T. & Umar, S.** 2010. Ascorbate-glutathione pathway and stress tolerance in plants. Springer, New York.
- Atkinson, N.J. & Urwin, P.E.** 2012. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: From genes to the field. *Journal of Experimental Botany* 63: 3523–3544.
- Baudouin, E.** 2011. The language of nitric oxide signalling. *Plant Biology* 13: 233–242.
- Begara-Morales, J.C., Sánchez-Calvo, B., Chaki, M., Mata-Pérez, C., Valderrama, R., Padilla, M.N., López-Jaramillo, J., Luque, F., Corpas, F.J. & Barroso, J.B.** 2015. Differential molecular response of monodehydroascorbate reductase and glutathione reductase by nitration and *S*-nitrosylation. *Journal of Experimental Botany* 66: 5983–5996.
- Begara-Morales, J.C., Sánchez-Calvo, B., Chaki, M., Valderrama, R., Mata-Pérez, C., López-Jaramillo, J., Padilla, M.N., Carreras, A., Corpas, F.J. & Barroso, J.B.** 2014. Dual regulation of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) by tyrosine nitration and *S*-nitrosylation. *Journal of Experimental Botany* 65: 527–538.
- Besson-Bard, A., Pugin, A. & Wendehenne, D.** 2008. New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* 59: 21–39.
- Benzing, D.H.** 2000. Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation. Cambridge University Press, Cambridge.

- Bogdanović, J., Mojović, M., Milosavić, N., Mitrović, A., Vučinić, Ž. & Spasojević, I.** 2008. Role of fructose in the adaptation of plants to cold-induced oxidative stress. *European Biophysics Journal* 37: 1241–1246.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W. & Jones, R.L.** 2015. *Biochemistry & molecular biology of plants*, 2 ed. Wiley Blackwell, West Sussex, UK.
- Cantrel, C., Vazquez, T., Puyaubert, J., Rezé, N., Lesch, M., Kaiser, W.M., Dutilleul, C., Guillas, I., Zachowski, A. & Baudouin, E.** 2011. Nitric oxide participates in cold-responsive phosphosphingolipid formation and gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 189: 415–427.
- Carvalho, C.P.** 2012. Influência de baixas temperaturas no crescimento, conteúdo de carboidratos e aclimatização da bromélia endêmica *Nidularium minutum* Mez cultivada *in vitro*. Dissertação de mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- Carvalho, C.P., Hayashi, A.H., Braga, M.R. & Nievola, C.C.** 2013. Biochemical and anatomical responses related to the *in vitro* survival of the tropical bromeliad *Nidularium minutum* to low temperatures. *Plant Physiology and Biochemistry* 71: 144–154.
- Chamizo-Ampudia, A., Sanz-Luque, E., Llamas, A., Galvan, A. & Fernandez, E.** 2017. Nitrate reductase regulates plant nitric oxide homeostasis. *Trends in Plant Science* 22: 163–174.
- Clark, D., Durner, J., Navarre, D.A. & Klessig, D.F.** 2000. Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 1380–1384.
- Couée, I., Sulmon, C., Gouesbet, G. & El Amrani, A.** 2006. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 57: 449–459.
- Cramer, G.R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M. & Shinozaki, K.** 2011. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology* 11: 163.
- Farnese, F.S., Menezes-Silva, P.E., Gusman, G.S. & Oliveira, J.A.** 2016. When bad guys become good ones: the key role of reactive oxygen species and nitric oxide in the plant responses to abiotic stress. *Frontiers in Plant Science* 7: 471.
- Figuroa, C.M. & Lunn, J.E.** 2016. A tale of two sugars - trehalose 6-phosphate and sucrose. *Plant Physiology* 172: 7-27.

- Fracheboud, Y., Haldimann, P., Leipner, J. & Stamp, P.** 1999. Chlorophyll fluorescence as a selection tool for cold tolerance of photosynthesis in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany* 50: 1533–1540.
- Gaur, R. & Sharma, P.** 2014. Approaches to plant stress and their management, 1st ed. Springer, New York.
- Georgieva, K. & Lichtenthaler, H.K.** 2006. Photosynthetic response of different pea cultivars to low and high temperature treatments. *Photosynthetica* 44: 569–578.
- Gorsuch, P.A., Pandey, S. & Atkin, O.K.** 2010. Thermal de-acclimation: how permanent are leaf phenotypes when cold-acclimated plants experience warming? *Plant, Cell and Environmental* 33: 1124–1137.
- Gupta, D.K., Palma, J.M. & Corpas, F.J.** 2016. Redox state as a central regulator of plant-cell stress responses. Springer, New York.
- Gutjahr, M.R. & Tavares, R.** 2009. Clima. *In*: M.I.M.S. Lopes, M. Kirizawa & M.M.R.F. Melo (orgs.). Patrimônio da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba. Instituto de Botânica, São Paulo. pp. 39-51.
- Guy, C.L., Huber, J.L.A. & Huber, S.C.** 1992. Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature. *Plant Physiology* 100: 502–508.
- Haldimann, P.** 1999. How do changes in temperature during growth affect leaf pigment composition and photosynthesis in *Zea mays* genotypes differing in sensitivity to low temperature? *Journal of Experimental Botany* 50: 543–550.
- Hincha, D.K., Zuther, E. & Heyer, A.G.** 2003. The preservation of liposomes by raffinose family oligosaccharides during drying is mediated by effects on fusion and lipid phase transitions. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1612: 172–177.
- Hou, W., Sun, A.H., Chen, H.L., Yang, F.S., Pan, J.L. & Guan, M.Y.** 2016. Effects of chilling and high temperatures on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in leaves of watermelon seedlings. *Biologia Plantarum* 60: 148–154.
- Huner, N.P.A., Öquist, G. & Sarhan, F.** 1998. Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends in Plant Science* 3 (6): 224–230.
- Iba, K.** 2002. Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 53: 225–245.

- Jan, S., Kamili, A.N., Hamid, R. & Parray, J.A.** 2013. Variation in adaptation mechanisms of medicinal herbs to the extreme winter conditions across the North Western Himalaya. *Israel Journal of Plant Science* 61: 1–11.
- Janská, A., Maršík, P., Zelenková, S. & Ovesná, J.** 2010. Cold stress and acclimation - what is important for metabolic adjustment? *Plant Biology* 12: 395–405.
- Kaiser, W.M. & Huber, S.C.** 2001. Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers 52: 1981–1989.
- Kaplan, F. & Guy, C.L.** 2004. β -Amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock. *Plant Physiology* 135: 1674–1684.
- Khan, M.N., Mobin, M., Mohammad, F. & Corpas, F.J.** 2014. Nitric oxide in plants: metabolism and role in stress physiology. Springer, New York.
- Knaupp, M., Mishra, K.B., Nedbal, L. & Heyer, A.G.** 2011. Evidence for a role of raffinose in stabilizing photosystem II during freeze – thaw cycles. *Planta* 234, 477–486.
- Kodra, E., Steinhaeuser, K. & Ganguly, A.R.** 2011. Persisting cold extremes under 21st-century warming scenarios. *Geophysical Research Letters* 38: 1–5.
- Larcher, W.** 2006. *Ecofisiologia Vegetal*. RiMa, São Carlos.
- Levitt, J.** 1980. Chilling injury and resistance. *In: Responses of plants to environmental stresses*. Academic Press, New York.
- Li, X., Gong, B. & Xu, K.** 2014. Interaction of nitric oxide and polyamines involves antioxidants and physiological strategies against chilling-induced oxidative damage in *Zingiber officinale* Roscoe. *Scientia Horticulturae* 170: 237–248.
- Lichtenthaler, H.K. & Miché, J.A.** 1997. Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends in Plant Science* 2: 316–320.
- Lima, É.S. & Abdalla, P.D.S.** 2001. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 37: 293–303.
- Lin, A., Wang, Y., Tang, J., Xue, P., Li, C., Liu, L., Hu, B., Yang, F., Loake & G.J., Chu, C.** 2011. Nitric oxide and protein S-nitrosylation are integral to hydrogen peroxide-induced leaf cell death in rice. *Plant Physiology* 158: 451–464.
- Lindermayr, C., Saalbach, G. & Durner, J.** 2005. Proteomic identification of S-nitrosylated proteins. *Plant Physiology* 137: 921–930.
- Luther, H.E.** 2010. An alphabetical list of bromeliad binomials. 12 ed. Sarasota Bromeliad Society and Marie Selby Botanical Gardens, Sarasota.

- Mai, J., Herbette, S., Vandame, M., Kositsup, B., Kasemsap, P., Cavaloc, E., Julien, J.L., Améglio, T. & Roeckel-Drevet, P.** 2009. Effect of chilling on photosynthesis and antioxidant enzymes in *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. Trees – Structure and Function 23: 863–874.
- Mailler, S. & Lott, F.** 2015. Impact of subgrid-scale orography on equatorial angular momentum budget and the cold surges in a general circulation model. Monthly Weather Review 143: 4443–4458.
- Mamede, M.C.H., Souza, V.C., Prado, J., Barros, F., Wanderley, M.G.L. & Rando, J.G.** 2007. Livro Vermelho das Espécies Vegetais Ameaçadas de Extinção no Estado de São Paulo. Instituto de Botânica, São Paulo.
- Marengo, J., Cornejo, A., Satyamurty, P. & Nobre, C.** 1997. Cold surges in tropical and extratropical South America: the strong event in June 1994. Monthly Weather Review 125: 2759–2786.
- Maxwell, K. & Johnson, G.N.** 2000. Chlorophyll fluorescence — a practical guide. Journal of Experimental Botany 51: 659–668.
- Miura, K. & Furumoto, T.** 2013. Cold signaling and cold response in plants. International Journal of Molecular Science 14: 5312-5337.
- Mollo, L., Martins, M.C.M., Oliveira, V.F., Nievola, C.C. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2011. Effects of low temperature on growth and non-structural carbohydrates of the imperial bromeliad *Alcantarea imperialis* cultured *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 107: 141–149.
- Müller, G.V., Gan, M.A., Piva, E.D. & Silveira, V.P.** 2015. Energetics of wave propagation leading to cold event in tropical latitudes of South America. Climatic Dynamics 45: 1-20.
- Nägele, T., Kandel, B.A., Frana, S., Meißner, M. & Heyer, A.G.** 2011. A systems biology approach for the analysis of carbohydrate dynamics during acclimation to low temperature in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Journal 278: 506–518.
- Nelson, D.L. & Cox, M.M.** 2014. Princípios de Bioquímica de Lehninger, 6th ed. Artmed, Porto Alegre.
- 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 Cellular and Development Biology - Plant* 41: 832–837.

- Nunes, J.V.C.** 2006. Bromélias. *In*: L.L. Simões & C.F. Lino. Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais. 2.ed. São Paulo, Senac. pp. 119-132.
- Oliveira, J.G., Aguiar, P.L.A. & Vitória, A.P.** 2009. Alterations in chlorophyll a fluorescence, pigment concentrations and lipid peroxidation to chilling temperature in coffee seedlings. *Environmental and Experimental Botany* 67: 71–76.
- Pancel, L. & Köhl, M.** 2016. *Tropical Forestry Handbook*. 2 ed. Springer, Berlin.
- Pedroso, A.N.V., Lazarini, R.A.D.M., Tamaki, V. & Nievola, C.C.** 2010. *In vitro* culture at low temperature and *ex vitro* acclimatization of *Vriesea inflata* an ornamental bromeliad. *Revista Brasileira de Botânica* 33: 407–414.
- Petoukhov, V. & Semenov, V.A.** 2010. A link between reduced Barents-Kara sea ice and cold winter extremes over northern continents. *Journal of Geophysical Research Atmospheres* 115: 1–11.
- Puyaubert, J. & Baudouin, E.** 2014. New clues for a cold case: nitric oxide response to low temperature. *Plant, Cell & Environmental* 37: 2623–2630.
- Rao, N.K.** 2004. Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology* 3: 136–145.
- Rivero, R.M., Ruiz, J.M., García, P.C., López-Lefebvre, L.R., Sánchez, E. & Romero, L.** 2002. Response of oxidative metabolism in watermelon plants subjected to cold stress. *Functional Plant Biology* 29: 643–648.
- Roháček, K. & Barták, M.** 1999. Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: Basic concepts, useful parameters, and some applications. *Photosynthetica* 37 (3): 339-363.
- Rószter, T.** 2012. *The biology of subcellular nitric oxide*. Springer, New York.
- Ruelland, E. & Zachowski, A.** 2010. How plants sense temperature. *Environmental and Experimental Botany* 69: 225-232.
- Salgado, I., Carmen Martínez, M., Oliveira, H.C. & Frungillo, L.** 2013. Nitric oxide signaling and homeostasis in plants: a focus on nitrate reductase and *S*-nitrosoglutathione reductase in stress-related responses. *Revista Brasileira de Botânica* 36: 89–98.
- Sasaki, H., Ichimura, K., Imada, S. & Yamaki, S.** 2001. Sucrose synthase and sucrose phosphate synthase, but not acid invertase, are regulated by cold acclimation and deacclimation in cabbage seedlings. *Journal of Plant Physiology* 158: 847–852.

- Skillman, J.B. & Osmond, C.B.** 1998. Influence of nitrogen supply and growth irradiance on photoinhibition and recovery in *Heuchera americana* (Saxifragaceae). *Physiologia Plantarum* 103: 567–573.
- Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R. & Miller, G.** 2012. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell and Environmental* 35: 259–270.
- Suzuki, N. & Mittler, R.** 2006. Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia Plantarum* 126: 45–51.
- Tavares, A.R. & Barros, F.** 2009. Plantas com potencial ornamental. *In*: M.I.M.S. Lopes, M. Kirizawa & M.M.R.F. Melo (orgs.). Patrimônio da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba. Instituto de Botânica, São Paulo. pp. 441-470.
- Valluru, R. & Van den Ende, W.** 2011. *Myo*-inositol and beyond - Emerging networks under stress. *Plant Science* 181: 387–400.
- Welling, A. & Palva, E.T.** 2006. Molecular control of cold acclimation in trees. *Physiologia Plantarum* 127: 167-181.
- Yaneva, I., Mäck, G., Vunkova-Radeva, R. & Tischner, R.** 1996. Changes in nitrate reductase activity and the protective effect of molybdenum during cold stress in winter wheat grown on acid soil. *Journal of Plant Physiology* 149: 211–216.
- Zhao, M.-G., Chen, L., Zhang, L.-L. & Zhang, W.-H.** 2009. Nitric reductase-dependent nitric oxide production is involved in cold acclimation and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 151: 755–67.
- Zheng, P., Bai, X., Long, J., Li, K. & Xu, H.** 2016. Nitric oxide enhances the nitrate stress tolerance of spinach by scavenging ROS and RNS. *Scientia Horticulturae* 213: 24–33.
- Ziogas, V., Tanou, G., Filippou, P., Diamantidis, G., Vasilakakis, M., Fotopoulos, V. & Molassiotis, A.,** 2013. Nitrosative responses in citrus plants exposed to six abiotic stress conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* 68: 118–126.

CAPÍTULO 1

Variations in nitric oxide content, NR activity and levels of antioxidant enzymes during cold tolerance in the tropical bromeliad *N. minutum* Mez

Camila P. Carvalho^A, Poliana Cardoso-Gustavson^B, Edson Rodrigues^C, Helenice Mercier^D, Catarina C. Nievola^{A,E}

^ANúcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais, Instituto de Botânica SMA/SP, 04301-902, São Paulo, SP, Brasil;

^BCentro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, 09606-070, São Bernardo do Campo, Brasil;

^CInstituto Básico de Biociências, Universidade de Taubaté, 12030-180, Taubaté, SP, Brasil;

^DDepartamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 05508-090, São Paulo, SP, Brasil;

^ECorresponding author. E-mail: ccnievola@uol.com.br

ABSTRACT

In tropical biomes, abrupt cold events occurs and can be associated with large thermal daily amplitude, suggesting that plants should make fast adjustments to ensure survival under temperature changes. Chilling stress can enhance activity of the enzyme nitrate reductase (NR), which is associated to nitric oxide (NO) production, a molecule with toxic or protective effect, depending on stress intensity and duration. *Nidularium minutum* Mez is considered chilling tolerant because it lives in a rain forest with temperatures ranging from 2 to 30 °C. Nevertheless, the role of NO in the metabolic changes that occur during early cold exposure and the recovery under temperature increase (de-acclimation) is unknown. Hence, we cultivated *N. minutum* at 10 °C for 72 h and after this period, a subset was transferred to 25 °C and another remained at 10 °C. Until 72 h of chilling, induction of oxidative stress was suggested due to enhance in NO content, related to high NR activity, which would led to decrease in antioxidant enzyme levels and increase lipid peroxidation (LPO). During de-acclimation, NR and NO levels reduced while antioxidant enzyme activities enhanced and LPO reduced, showing a recovery of cold stress. Plants maintained at 10 °C after 72 h underwent cold acclimation by reducing NO levels leading to a less intense stress response. Our results showed that variations in NO content had an important role during cold acclimation and de-acclimation in *N. minutum*, which may be involved in the regulation of oxidative responses in this bromeliad.

Keywords: antioxidant enzymes, Bromeliaceae, cold acclimation, de-acclimation, lipid peroxidation, nitrate reductase, thermal changes.

1. INTRODUCTION

Temperature variation is the most common stress that plants are subject, affecting their distribution and limiting the region in which they can survive, as each plant species has its own optimum temperature for growth (Iba, 2002). Considering that plants are sessile, they have mechanisms that allow them to precisely detect environmental changes and respond to complex stress conditions to minimize damages (Atkinson and Urwin, 2012). The adjustment that plants undergo in response to changes in environmental factors is called acclimation (Buchanan et al., 2015), however it might be reversed by returning the plants to initial conditions (de-acclimation) (Gorsuch et al., 2010; Sasaki et al., 2001).

Even in warming scenarios, analyses of climate model simulations reveal that short cold events are likely to persist under the 21st century, and will be more intense than the average of the 20th century (Kodra et al., 2011). Indeed, these events occur in tropical biomes (Mailler and Lott, 2015; Marengo et al., 1997; Müller et al., 2015) and can cause a range amount 15 °C in 24 h, with an average duration of 5–6 days (Marengo et al., 1997). In some tropical regions, this cooling may occur suddenly and could be related to a large thermal amplitude (Pancel and Köhl, 2016). Studies about how tropical plants acclimate to ensure survival to the initial events of cold exposure are scarce, but they are necessary and useful to allow cultivating tropical plants in regions with a broad range of temperature.

There are increasing evidences that nitric oxide (NO) is an important molecule participating in plant responses to chilling (Airaki et al., 2012; Puyaubert and Baudouin, 2014; Sehrawat et al., 2013), affecting adaptive processes via gene expression control, enzymes activity and/or the overall redox balance (Baudouin, 2011). Considered an important NO source during chilling, the nitrite-dependent pathway leads to NO formation via the reduction of nitrite mainly by nitrate reductase (NR) (Cantrel et al., 2011; Chamizo-Ampudia et al., 2017). Besides, low temperature stimulated NR levels, as related for wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Sadovo-1) (Yaneva et al., 2002), which could contribute for NO production under cold.

NO can mediate several biological events through accumulation of different reactive nitrogen species (RNS) (Begara-Morales et al., 2015). Together with reactive oxygen species (ROS), RNS can react with membrane lipids and initiate a chain process known as lipid peroxidation (LPO), that causes disruption of the intracellular membranes

and cellular injury (Fancy et al., 2016; Lytvyn et al., 2016; Mai et al., 2009; Siddiqui et al., 2011). The effect of low temperature on the cellular damage related to photosynthetic apparatus has been showed by changes in chlorophyll fluorescence measurements (Hou et al., 2016; Mai et al., 2009; Rapacz et al., 2011). Cold can cause a decline in photosynthetic quantum conversion leading to increase in chlorophyll fluorescence (Lichtenthaler and Miehe, 1997). Nevertheless, reduced chlorophyll fluorescence during cold exposure was observed in the presence of NO in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe), suggesting that NO decreased chilling-induced inhibition of electron transport in photosystem II (PSII) (Li et al., 2014), indicating, interestingly, a beneficial role of NO during stress.

The rain forest Alto da Serra de Paranapiacaba Biological Reserve, São Paulo State, Brazil, registers an average winter temperature of 14 °C, minimum temperatures reaching 1.6 °C and a thermal amplitude range from 2 to 30 °C (Gutjahr & Tavares, 2009). Hence, to ensure survival under increased thermal amplitude and abrupt chilling episodes, occurring in a global scale and predominantly affecting some regions as South America, the Middle East and the western United States (Kodra et al., 2011), plants growing in these areas probably developed fast and efficient mechanisms of resiliency and adaptability to such conditions. *N. minutum* is an endemic bromeliad from the Alto da Serra de Paranapiacaba Biological Reserve, and previous studies showed that this species is cold tolerant (Carvalho et al., 2013). Accordingly, the high resistance to cold, found for *N. minutum* after cultivation at 10 °C for six months, involved growth reduction, biochemical adjustments and anatomical alterations as responses to a prolonged exposure to low temperature (Carvalho et al., 2013). In addition, we observed that growth resumed when plants of *N. minutum* were transferred to a higher temperature (25 °C). However, the physiological and biochemical changes involved in these responses for *N. minutum* and tropical plants in general are still unknown.

We hypothesized that this bromeliad has a specific metabolism regulation in the early cold exposure, probably with NO involvement. As NO content can change over stress response, we suggest that this variation could modulate oxidative responses and promote *N. minutum* cold acclimation. The aim of this study was to analyze changes in NO in the tropical species *N. minutum* during the first hours of cold exposure, and verify whether variations in the NO content would be involved in acclimation of this plant to low temperature. Another aim was to verify a possible recovery of the metabolism during transfer to high temperatures (de-acclimation), which simulate changes in tropical

environmental. To get a view of the chilling effects, a series of parameters known to be differently affected by cold temperature have been monitored.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Plant material and growth conditions

Seeds of *Nidularium minutum* Mez harvested from plants growing in the Alto da Serra de Paranapiacaba Biological Reserve (São Paulo, SP, Brazil) were placed in Petri dishes on a filter paper soaked in distilled water. The Petri dishes were maintained in a culture room under the following conditions: 25 ± 2 °C, photosynthetic flux density of $45 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, and a 12-hour photoperiod. After one month, plantlets were transferred to plastic trays containing fine sterilized commercial medium-size *Pinus* bark as substrate covered by a plastic sack (Carvalho et al., 2013). The trays were maintained under the same culture conditions describe above for a period of 5 months. Plants were fertilized weekly with 20 mL of Murashige & Skoog (1962) solution with half concentration of macronutrients.

Low temperature treatment was imposed by transferring plants of *N. minutum* to a growth chamber adjusted to 10 °C, 3 h after the start of the light period. Plants were kept under chilling stress conditions for 3, 24, 48, and 72 h. For the de-acclimation experiment, a subset of *N. minutum* plants were transferred to a growth chamber adjusted to 25 °C, while a group of control plants remained in the cold chamber. De-acclimation was imposed for 24, 48, 72 e 168 h. Irradiance and photoperiod in growth chambers were the same as described above.

Tissue temperature was measured based on thermal images acquired with a Testo 875-1i infrared camera (Lenzkirch, Germany). The camera has 320x240-pixel resolution and a built-in 32° lens, with thermal sensitivity of 50 mK at 30 °C and temperature resolution of ± 2 °C. The emissivity in this study was deemed to be 0.95. This infrared (IR) thermography camera allows temperature measurements without contact with the plants, and according to the figure 1, leaf temperature is in agreement with the proposal for this study.

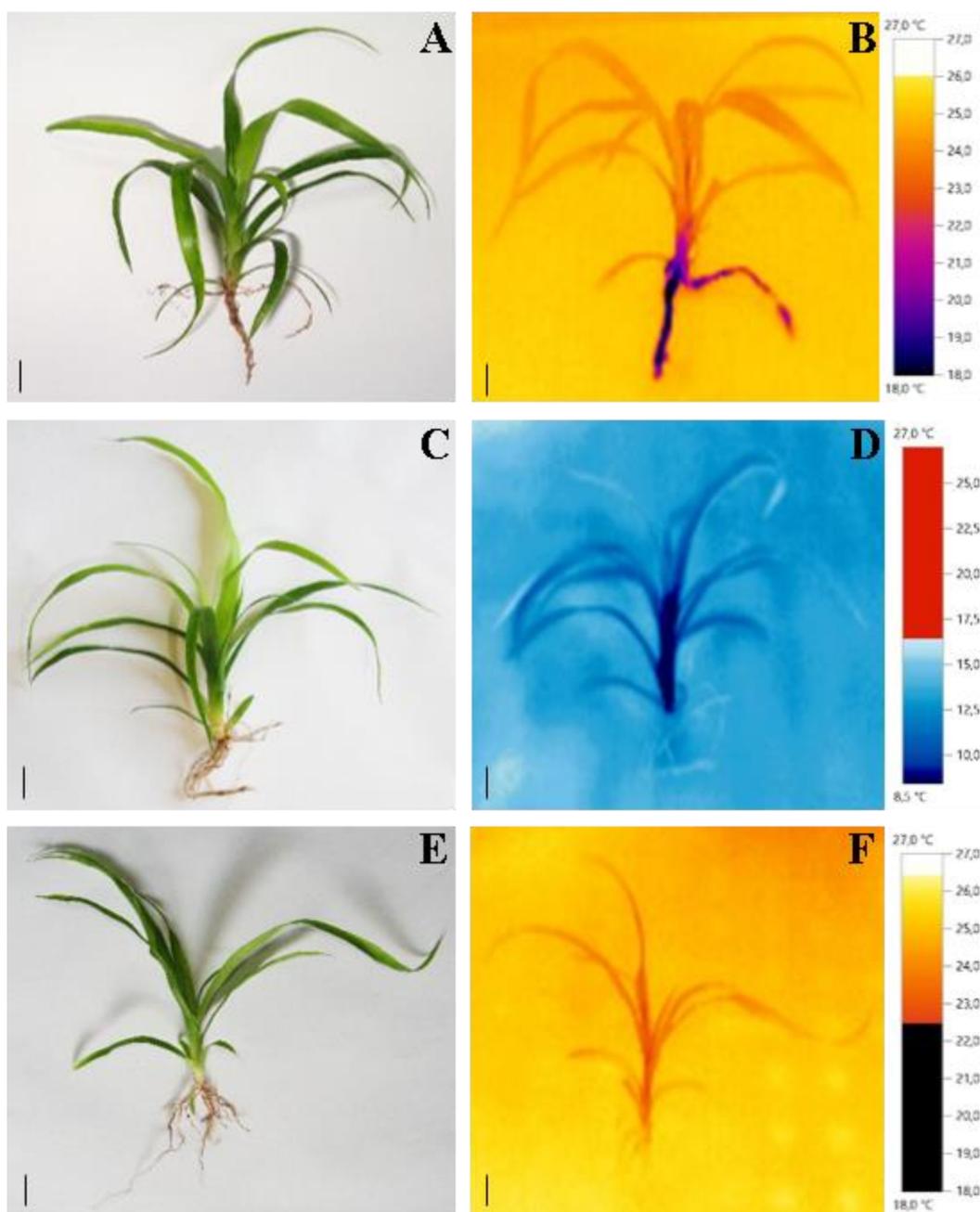


Figure 1 – Morphological (A, C and E) and infrared thermograph images (B, D and F) of *Nidularium minutum* cultivated for five months at 25 °C (A, B), during the cold exposure (10°C) for 72 h (C, D) and after de-acclimation for seven days at 25 °C (E, F). Temperatures are visualized according to the shown color palette. The different color points in the palette represent different temperatures values. Bars= 1 cm.

2.2. Nitrate reductase activity

Nitrate reductase (NR) (EC 1.7.1.1) activity was measured by the *in vivo* assay described by Jaworski (1971), modified by Nievola and Mercier (2001). Leaves were cut into slices (5 mm wide) and 0.75 g of fresh tissue was transferred to tubes containing 6 mL of incubation mixture consisting of 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5), 0.1 M KNO₃ and 4% (v/v) n-propanol. The material was vacuum infiltrated four times for one min and incubated in the dark at 30 °C for 90 min. The nitrite concentration was determined by the addition of 0.3 mL of 58 mM of sulfanilamide (dissolved in 3N HCl) and 0.3 mL of 8 mM N-(1-naphthyl) ethylenediamine to 1 mL aliquots of the assay medium. Blanks for each sample were taken before the incubation. Absorbance was measured at 540 nm. NR activity was expressed as μmol nitrite produced per hour per gram of dry weight (DW).

2.3. NO emission

Leaf nitric oxide (NO) emission was determined spectrofluorimetrically based on Melo et al. (2016), with modifications. Leaves were cut into small pieces, immediately weighed (approximately 100 mg of fresh weight) and incubated with 1 mL of 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2) containing 7.5 μM diaminorhodamine-4M (DAR-4M) in the dark at room temperature on a rotatory shaker (80 rpm) for 30 min. After incubation, 1 mL of potassium phosphate buffer was added and the supernatant fluorescence was measured with a spectrofluorometer with 560-nm excitation and 575-nm emission. Results were expressed as arbitrary fluorescence units per g DW per hour.

2.4. NO imaging

Endogenous NO formation was visualized with NO-sensitive cell-permeable probe dye 4, 5-diaminofluorescein diacetate (DAF2-DA) as previously reported by Ederli et al. (2006), with modifications. Free-hand transversal leaf sections from plants of each thermal treatment were stained with 10 μM DAF2-DA dissolved in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) for 1 h in the dark at room temperature. Subsequently, the leaf sections were washed to remove excess fluorophore and immediately analyzed under a widefield Leica DM 5500B microscope. To test the specificity of the fluorescent probes, additional leaf sections were incubated with 500 μM 2-phenyl-4, 4, 5, 5-tetra-methylimidazole-1-oxyl-oxide (cPTIO), a NO scavenger, washed and visualized under the same conditions.

2.5. Nitrate and ammonium determination

Leaf samples were frozen in liquid N₂ and stored at -80 °C. Frozen leaf samples were ground to fine powder and 100 mg was used for both analyses. Plant tissue samples were homogenized with 1 ml deionized water and centrifuged at 22,000xg for 30 min. The supernatant was saved for analysis.

Nitrate content was measured by the salicylic acid method described by Cataldo et al. (1975). An aliquot of 20 µL of the extract was added to 80 µL of 5% (w/v) salicylic acid in concentrated H₂SO₄. After 20 min at room temperature, 1.9 mL of 2N NaOH was added to the mixture to raise pH to at least 12. Due to extract pigmentation, a blank for each sample was prepared. The blank consisted of the extract, 80 µL of concentrated H₂SO₄ (without salicylic acid) and 1.9 mL of 2N NaOH. Absorbance was measured at 410 nm. Results were expressed as nmol nitrate per mg DW.

Ammonium content was measured by the phenol-hypochlorite method described by Weatherburn (1967). An aliquot of 100 µL of the extract was added to 0.5 mL of a mixture of 1% (w/v) phenol and 0.005% (w/v) nitroprusside, followed by the addition of 0.5 mL of a solution containing 5.37% (w/v) sodium phosphate, sodium hypochlorite (10-14%) and 0.5% (w/v) NaOH. After homogenization, the mixture was incubated at 37 °C for 15 min. Absorbance was measured at 625 nm. Results were expressed as pmol ammonium per mg DW.

2.6. Lipid peroxidation (LPO)

LPO was assayed using the method of Jiang et al. (1991) with modifications. Leaf samples were frozen in liquid N₂ and stored at -80 °C. Frozen leaf samples were ground to fine powder and 100 mg was homogenized with 2 mL of 80% (v/v) ethanol and centrifuged at 3,000xg at 25 °C for 15 min. An aliquot of 200 µL of the extract was added to 800 µL of the reaction mixture containing 100% methanol, 100 µM xylenol orange, 25 mM H₂SO₄, 4mM butylated hydroxytoluene and 250 µM FeSO₄NH₄. The mixture was incubated at room temperature for 21 min and homogenized by inversion every 3 min. Absorbance was measured at 560 nm. The calculation was made using a standard curve of cumene hydroperoxide (Sigma®).

2.7. Antioxidant activity

Antioxidant enzyme levels were measured in fresh tissue (0.25 g) homogenized in 2 mL of 1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5), 1 mM EDTA-Na₂, 50 mM NaCl

and 1 mM ascorbic acid in the presence of a pinch of PVPP (approx. 2%) (Souza et al., 2013). This mixture was centrifuged at 11,000xg at 4 °C for 15 min and the enzyme extract was kept at 4 °C.

Catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) level was measured based on the consumption of H₂O₂ at 240 nm for 2 min. The reaction system contained 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5), 10 mM H₂O₂ and 40 µL of enzyme extract in 1 ml of the reaction mixture (Luck, 1974).

Ascorbate peroxidase (APX) (EC 1.11.1.11) level was assayed based on the measure of the absorbance decrease at 290 nm for 2 min due to ascorbate oxidation. The reaction system contained 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 0.1 mM EDTA-Na₂, 0.5 mM ascorbic acid 0.2 mM H₂O₂ and 20 µL of enzyme extract in 1 ml of the reaction mixture (Nakano and Asada, 1981, modified by Weng et al., 2007).

Glutathione reductase (GR) (EC 1.8.1.7) activity was determined as a decrease in absorbance at 340 nm for 2 min, due to NADPH oxidation. The reaction mixture system consisted of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 0.15 mM NADPH, 0.5 mM oxidized glutathione, 3 mM MgCl₂ and 100 µL of enzyme extract in 1 mL of the reaction mixture (Schaedle and Bassham, 1977).

Superoxide dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1) level was determined based on its ability to inhibit the photochemical reduction of nitroblue tetrazolium salt (NBT) according to Beauchamp and Fridovich (1971), modified by Balen et al. (2009). The reaction system was composed of 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8), 4 µM riboflavin, 10 mM methionine, 56 µM NBT, 0.1 mM EDTA-Na₂ and 20 µL of enzyme extract in 1 mL of the reaction mixture. The mixture was placed in a light box lined with aluminum foil for 5 min. A blank was made with deionized water instead of extract. One unit of SOD activity was defined as the amount of enzyme inhibiting by 50% the reduction of NBT at 560 nm.

APX, CAT and GR activities were expressed as µmol or nmol of substrate converted into product min⁻¹ (U or mU, respectively). Protein content in all samples was measured according to Bradford dye-binding method (Bradford, 1976) with bovine serum albumin (Sigma[®]) as standard.

2.8. Pigment determination

Leaf samples were frozen in liquid N₂ and stored at -80 °C. Frozen leaf samples were ground to fine powder and 50 mg was dissolved in 1 mL 100% acetone via

ultrasonication at 4 °C for 30 min and then centrifuged at 22,000xg at 4 °C for 20 min, saving the cooled supernatant (Munné-Bosch and Lalueza, 2007, with modifications). These steps were repeated until the supernatant became crystalline.

In order to determine photosynthetic pigments, leaf extract absorbance was measured at 662, 645 and 470 nm (chlorophylls *a* and *b* and carotenoids, respectively). Specific absorption coefficients of chlorophylls and carotenoids described by Lichtenthaler and Buschmann (2001) were used. Results were expressed as µg pigment per mg DW.

2.9. Chlorophyll *a* fluorescence measurements

Chlorophyll fluorescence was recorded with a portable modulated chlorophyll fluorometer (Multi-Mode Chlorophyll Fluorometer-OS5p, Opti-Sciences®, Hudson-USA). Fluorescence was measured 3 h after the start of the light period. Before measurement, the leaves were dark-adapted for 30 min in a leaf clip at growth chamber temperature (10 or 25 °C). The maximum potential photochemical efficiency of PSII was expressed as the ratio $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$. Fluorescence measurements were taken from five plants for each thermal treatment.

2.10. Data analysis

Experimental data were submitted to *t* test to determine the significance of the differences between individual treatments. In all analyses, $p \leq 0.05$ was considered to indicate statistical significance. Analyses were performed in GraphPad Prism software (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

3. RESULTS

NR levels remained high during chilling of *N. minutum* (Fig. 2A), coinciding with increased NO emission (Fig. 2B). An increase in the nitrate and ammonium concentrations was also observed along the low temperature phase (Fig. 2C and D). After 72 h cultivated at 10 °C, a subsample was returned to 25 °C for 168 h (de-acclimation) and a decrease in NR, NO emission and nitrate content, was observed in these plants and those maintained at low temperature (Fig. 2A, B and C). Despite the ammonium content have also decreased during de-acclimation, these values were greater in plants grown at 10 °C than those detected in plants transferred to 25 °C (Fig. 2D).

Results obtained with DAF2-DA confirmed an increase in endogenous NO levels after 72 h at 10 °C in comparison with those kept at 25 °C (Fig. 3). NO emission was observed in plasmalemma, cytoplasm, nuclei and chloroplasts in mesophyll cells (Fig. 3B and C). The absence of green-fluorescence emission from leaf sections incubated with cPTIO confirmed the NO production in these sites (Fig. 3E).

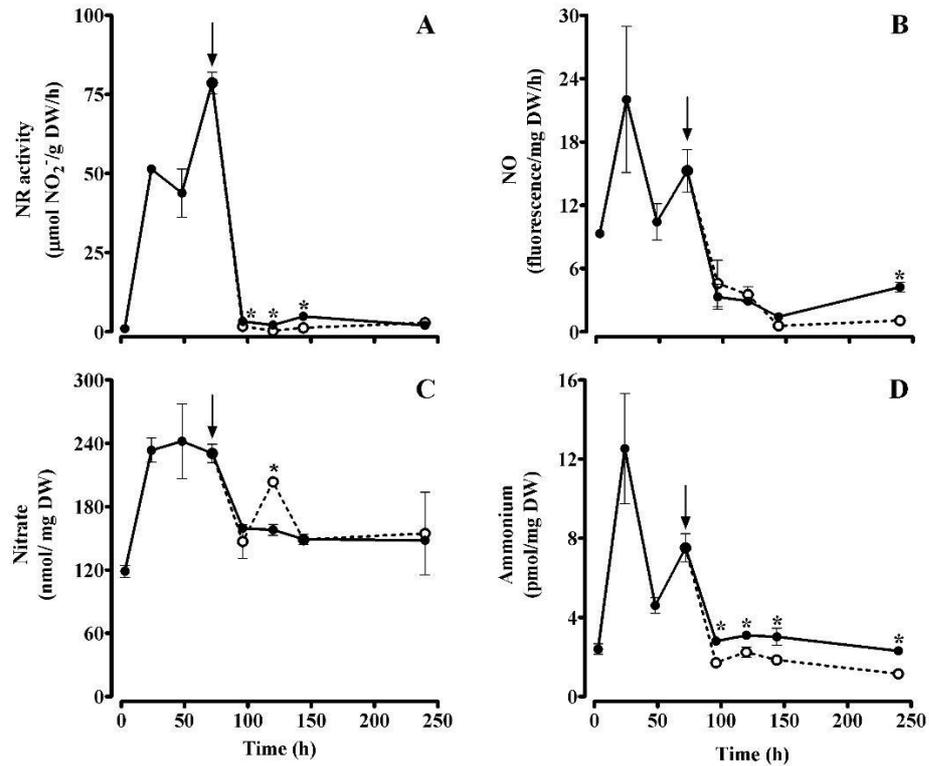


Figure 2 – (A) Nitrate reductase (NR) activity, (B) NO emission, (C) endogenous nitrate and (D) endogenous ammonium in *Nidularium minutum* during cold exposure (10 °C) and de-acclimation (25 °C). Asterisks show significant differences according to the *t* test for samples taken at the same time. Each point represents the average of three replicates and the vertical bars show the standard deviation of the mean. Arrow indicates the time when temperature was changed from 10 to 25 °C. DW = dry weight. ●● chilling; ○○ de-acclimation after 72h of cold exposition.

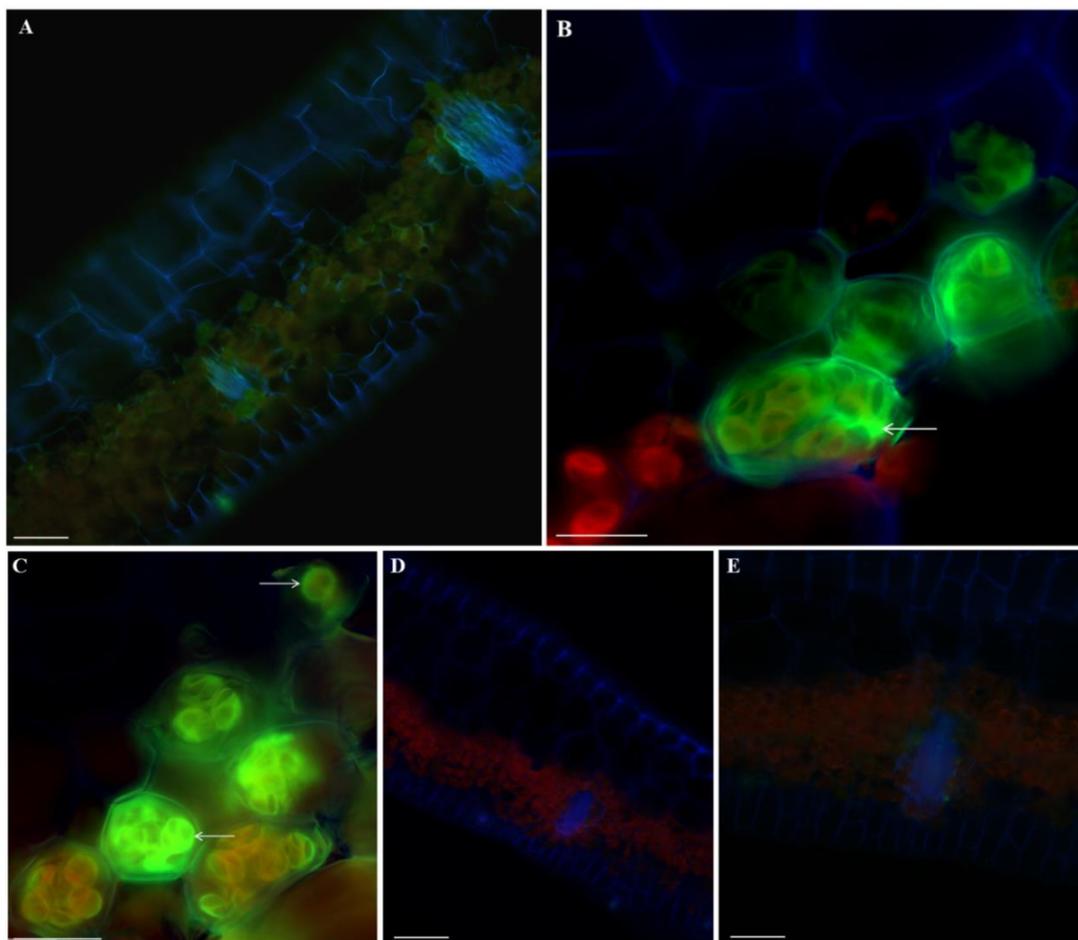


Figure 3 –Nitric oxide (NO) production in *Nidularium minutum* leaves exposed to 25 °C (A) or to cold (10 °C; B–C) after 72 h. Note the absence of NO detection from cells of leaves at 25 °C (A), and a strong green fluorescence emission (indicative of NO production) in the cell membrane, cytoplasm (arrow in B), nuclei and chloroplasts membrane (arrows in C) of some mesophyll cells from plants at 10 °C. (D–E) Sections from leaves at 25 (D) and 10 °C (E) treated with cPTIO, note the absence of NO fluorescence. Scale bars: 50 μm .

For LPO, our results showed lipoperoxide accumulation during low temperature exposure, with a peak after 72 hours of chilling (Fig. 4A) which indicates the occurrence of membrane damage. Analysis of antioxidant enzymes (SOD, CAT, GR and APX) showed, in general, a low level over 72 h of cold (Fig. 4B, C, D and E). LPO showed a decrease during de-acclimation phase (Fig. 4A). In contrast, for all antioxidant enzymes activities, an increase was observed at the same period both for de-acclimated and for those maintained at 10 °C plants (Fig. 4B, C, D and E).

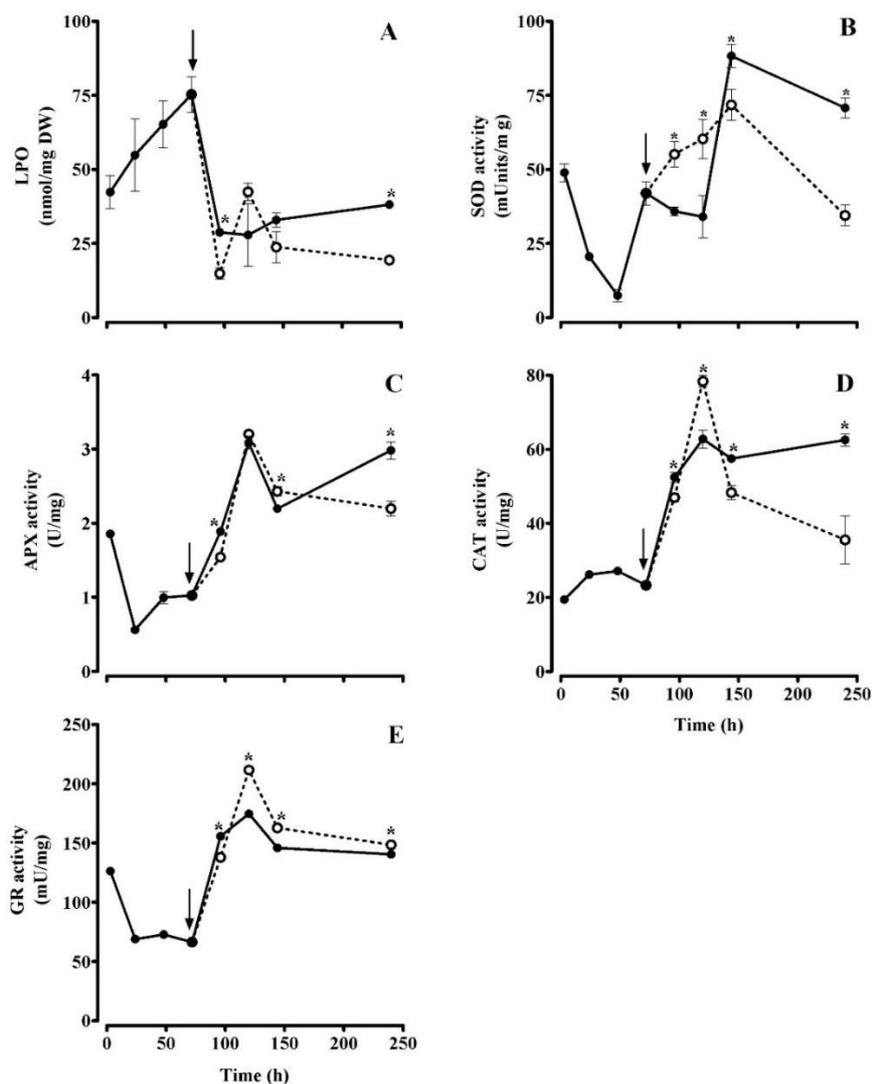


Figure 4 – (A) Lipid peroxidation (LPO), and (B) superoxide dismutase (SOD), (C) ascorbate peroxidase (APX), (D) catalase (CAT) and (E) glutathione reductase (GR) activities in *Nidularium minutum* during cold exposure (10 °C) and de-acclimation (25 °C). Asterisks show significant differences according to the *t* test for samples taken at the same time point. Each point represents the average of three replicates and the vertical bars show the standard deviation of mean. Arrow indicates the time when temperature was changed from 10 to 25 °C. DW = dry weight. ●● chilling; ○○ de-acclimation after 72h of cold exposition.

Cold exposure affected the maximum potential photochemical efficiency of PSII of *N. minutum*, as F_v/F_m ratio decreased during cold exposure (Fig. 5A). Initial fluorescence (F_0) in acclimated plants increased during the 72 h, which may indicate an impairment in the energy transference of the antenna complex to the reaction centers (Fig. 5B). The maximal fluorescence values (F_m), which indicate the efficiency of the photochemical process, showed no change during the low temperature cultivation, as

showed in Fig. 5C. *N. minutum* de-acclimated plants had a higher F_v/F_m ratio and lower F_0 values when compared with those of plants maintained at 10 °C (Fig. 5A and B). Values of F_m did not change over the phase of de-acclimation (Fig. 5C).

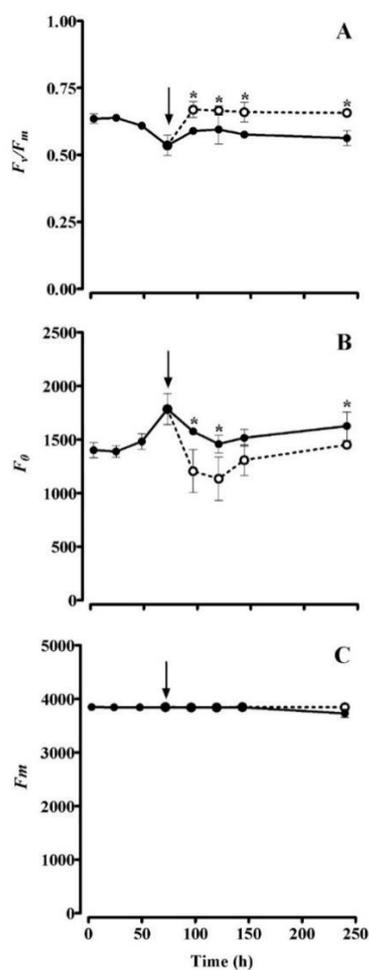


Figure 5 – (A) Photosystem II quantum yield F_v/F_m ratio, (B) minimal fluorescence (F_0) and (C) maximal fluorescence (F_m) in *Nidularium minutum* during cold exposure (10 °C) and de-acclimation (25 °C). Asterisks show significant differences according to the *t* test for samples taken at the same time point. Each point represents the average of three replicates and the verticals bars show the standard deviation of mean. Arrow indicates the time when temperature was changed from 10 to 25 °C. DW: dry weight. ●● chilling; ○○ de-acclimation after 72h of cold exposition.

Photosynthetic pigments in plants showed an increase during the cold exposure, with chlorophyll *a* levels being higher than that of chlorophyll *b* and carotenoids (Fig. 6). In general, pigments in de-acclimated plants were higher than in plants maintained at 10 °C (Fig. 6).

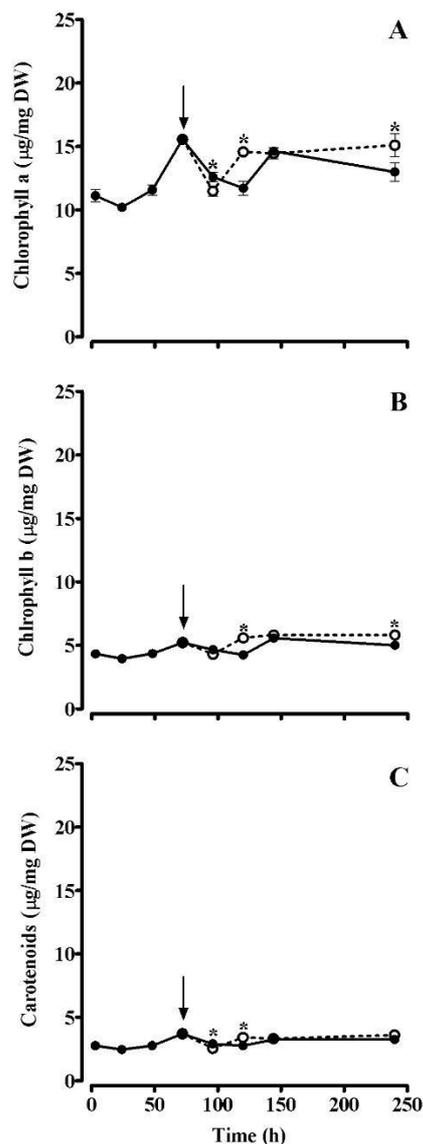


Figure 6 – (A) Chlorophyll a, (B) chlorophyll b and (C) carotenoids in *Nidularium minutum* during cold exposure (10 °C) and de-acclimation (25 °C). Asterisks show significant differences according to the *t* test for samples taken at the same time point. Each point represents the average of three replicates and the vertical bars show the standard deviation of mean. Arrow indicates the time when temperature was changed from 10 to 25 °C. DW: dry weight. ●● chilling; ○○ de-acclimation after 72h of cold exposition.

4. DISCUSSION

Plant survival to thermal fluctuations depends on rapid adjustments in metabolism. In this study, we suggested that variations in NO content could be related to the early responses of the tropical bromeliad *Nidularium minutum* to cold. High NO

concentrations during 72 hours of chilling was associated with oxidative stress, nevertheless, the reduction of its content was related to cold acclimation and de-acclimation in this plant.

This rapid NO increase also occurred in *Arabidopsis thaliana* after 1 h at 4 °C, and this molecule was considered an intermediate in gene regulation during cold transduction network (Cantrel et al., 2011). The major source of NO in plants seems to be the nitrite-dependent pathway, which leads to NO formation via the reduction of nitrite mainly by NR (Chamizo-Ampudia et al., 2017). Our results showed high NR and NO levels during 72 h of chilling exposure in *N. minutum*. The high NR activity found can be related to cold, as this stress can stimulate this enzyme (Yaneva et al., 2002), and consequently could lead to an enhance in NO levels. Increased NO synthesis related to NR activity in bromeliads was previously reported for pineapple (*Ananas comosus* ‘Smooth Cayenne’) (Freschi et al., 2010). In leaves of *A. thaliana* maintained at 4 °C for 72 h NR activity was also enhanced, which was associated with an increase in transcripts of *NIA1* and *NIA2*, genes responsible for NR encoding (Zhao et al., 2009).

Nitrate content in *N. minutum* increased during chilling exposure and reached a steady level after 24 h at 10 °C. Despite the fact that low temperature reduces nitrate uptake (Bose and Srivastava, 2001), this enhance can be related to high NO levels, as NO up-regulated the expression of most nitrate transporter genes in rice (*Oryza sativa* L.) (Sun et al., 2015). Considering the high NO and NR levels detected in this bromeliad submitted to cold, we suggest that increase nitrate uptake could be related to NO biosynthesis, since nitrate is reduced to nitrite by NR, nitrite accumulation could shift the NR equilibrium toward NO production (Manoli et al., 2014).

Ammonium increase can be associated to high NO content, which also up-regulate the expression of ammonium transporter genes (Sun et al., 2015), and with low temperature, as abiotic stress may increase ROS formation which result in proteolysis, contributing to intracellular elevate ammonium levels (Skopelitis et al., 2006). This ion is considered toxic and causes negative effects on plant metabolism, such as growth reduction, changes in intracellular pH and osmotic balance and uncoupling of photophosphorylation from electron transport (Gerendás et al., 1997). Indeed, under stress condition, the increase in LPO in rice was associated with the decrease in glutamine synthetase (GS), the key enzyme in ammonium assimilation, which would lead to ammonium accumulation in this species (Chien et al., 2002). Therefore, we cannot

discard the involvement of NO and ammonium as causing agents of increased LPO level in *N. minutum* cold exposed for 72 h.

LPO increase was also correlated to high amounts of NO in *N. minutum* during growth at 10 °C, as demonstrated in NO image with probe dye DAF2-DA (Fig. 3). NO is a signaling molecule involved in many physiological processes during plant development and nutrient assimilation (Sun et al., 2015), but is also a free radical and during stress exposure can cause oxidative damage on membrane integrity (Foyer et al., 1997; Lytvyn et al., 2016). Under chilling stress, membrane injuries can also be caused by ROS accumulation (Zheng et al., 2016), suggesting that these molecules could be associated with NO in the LPO increase in *N. minutum*, although analysis to confirm this hypothesis was not performed in the present study.

The levels of antioxidant enzyme activities were reduced in *N. minutum* cultivated under low temperature, and it occurred concomitantly with NO increases. Our findings indicate that in the first hours of cold exposure, NR enhanced NO production and this increase may have down-regulated antioxidant enzyme activities. This lower oxidative defense could lead to membrane damages. SOD is the first enzyme in the ROS detoxification system, converting superoxide radical to H₂O₂. Subsequently, CAT and APX convert H₂O₂ to H₂O. GR is one of the antioxidant enzymes of the ascorbate–glutathione cycle, but do not detoxify ROS directly (Buchanan et al., 2015). In general, chilling generate oxidative stress, expressed through elevated activities of SOD, CAT, APX and GR (Erdal, 2012; Jan et al., 2013; Shi et al., 2013). For *N. minutum*, the decrease of these enzymes levels could be associated with high NO production, since rapid NO accumulation in response to strong stress stimuli has been occasionally linked to inhibition of antioxidant enzymes, due to NO regulation at the level of activity and gene expression of such enzymes (Groß et al., 2013).

NO and derived molecules can be involved in redox-based posttranslational modification proteins (PTMs), including binding to metal centers, S-nitrosylation of thiol groups and nitration of tyrosine (Groß et al., 2013; Begara-Morales et al., 2015). This kind of regulation by NO may have occurred in antioxidants enzymes in this bromeliad during chilling, as related for others species under stress (Begara-Morales et al., 2014; Clark et al., 2000; Lindermayr et al., 2005), since about 30% of the cold responsive signaling-related proteins are post-translationally modified by NO (Sehrawat et al., 2013).

Decrease in *Fv/Fm* ratio under low temperature stress might be associated with injury of membrane systems including plasmalema, chloroplast and thylakoid membranes

(Li et al., 2014), as we observed for *N. minutum* in the LPO analyses. An integrate membrane system is important for normal photosynthetic electron transport, which is required for plant survival. During cold exposure, PSII is often considered a sensitive component of the photochemistry (Hou et al., 2016; Hurry and Huner, 1992; Li et al., 2014), probably due to accumulation of ROS and NO in the chloroplast that could affect photosynthetic apparatus (Groß et al., 2013). The reduced levels of antioxidant enzymes observed in *N. minutum* may have contributed to ROS and NO accumulation during cold exposure, which resulted in increased membrane damage as suggested by the LPO analysis and, consequently, reduced F_v/F_m ratios. Indeed, the increase in F_0 and the reduction in F_v/F_m ratio observed in the leaves of *N. minutum* reflect possible damages to PSII centers (Skillman and Osmond, 1998), which could be associated with the susceptibility of the species to photoinhibition at the lowest temperature.

The slight increase in chlorophylls content could be related to maintenance of F_m values over the chilling-exposure period. This increase can occur due to high NO levels observed in the cold treatment, as this molecule can interact with metallo-groups (chlorophyll has a Mg^{2+} in a heme group) and can change the chlorophyll metabolic pathway (Laxalt et al., 1997), alleviating chlorophyll decay in leaves under this stress condition. Furthermore, high carotenoids content could contribute to enhance the capacity for energy dissipation (Haldimann, 1999) and maintenance of F_m values for this bromeliad cultivated at 10 °C. Therefore, these results suggest that plants cultivated at 10 °C for 72 h would be subject to oxidative stress condition and increase in pigments together with maintenance of the F_m values would have contributed to the survival of *N. minutum*.

After 72 h of chilling, a subset of plants remained at 10 °C and another was transferred to 25 °C (de-acclimation). In general, parameters evaluated were less intense in plants continued to grow at 10 °C, which might indicate that a mechanism of cold acclimation was taking place in *N. minutum*. NO would be the signal, as its levels were reduced with cold prolongation. Nitrate reduction may have contributed to lower NR levels in this bromeliad, consequently leading to lower NO production. However, Ammonium content decreased in this period, but remained higher in plants exposed to cold in comparison with the de-acclimated ones, which could be a consequence of low temperature growth in *N. minutum*, since stress situations are associated with an increase of this ion (Chien et al., 2002; Wang et al., 2008). Besides, the increase in ammonium could also contribute to damages in photosynthetic centers (Britto and Kronzucker, 2002),

as could the decrease in F_v/F_m ratio and the increase in F_0 observed in these plants, indicating that photoinhibition remained in the cold treatment. Nevertheless, the photosynthetic pigments had few changes over the cold exposure, although the trend shows a decrease in their levels with cold prolongation, as related for this species after six months cultivated at 10 °C (Carvalho et al., 2013). F_m values remained constant during the prolonged cold exposure, indicating that the electron transport efficiency was maintained even under this stress condition, which may have contributed to *N. minutum* cold acclimation.

Transfer to a higher temperature (25 °C) caused the decrease of stress parameters in de-acclimated plants, and we associated this response with the low NO levels at this phase. The recovery is supported by the decline in ammonium and LPO contents, together with the enhancement in antioxidant enzymes in de-acclimated plants compared with those at 10 °C. The increase in these enzymes may be related to the reversible NO-dependent PTMs that act as an on-off switch control to many enzymes, and are important for the efficient recovery from stress (Abat et al., 2008; Puyaubert and Baudouin, 2014).

Increase in F_v/F_m ratios was also observed in de-acclimated plants, suggesting that *N. minutum* was able to re-establish the maximum quantum efficiency of PSII photochemistry when transferred to a higher temperature. With the recovery of F_0 in 24 h after de-acclimation, the susceptibility of photoinhibition associated with the acclimation phase in *N. minutum* could be quickly reverted. We suggest that this recovery may be related to the enhancement of the antioxidant system, since high levels of both ROS and NO can cause destruction of the photosynthetic apparatus (Miura and Furumoto, 2013). F_m values remained constant during this phase.

In conclusion, our findings indicated that variation in NO endogenous content could be involved in *N. minutum* survival and acclimation during the cold events that may occur in tropical environment. Higher NO levels in plants cultivated at 10 °C compared with those at 25 °C seem to impose oxidative damage to this bromeliad, reflected mainly in the increased LPO and decreased antioxidant enzyme levels. However, after 72 h of cold exposure, reduction in the values of the evaluated parameters suggested cold acclimation. Transfer to a higher temperature during the de-acclimation phase decreased NO levels, coinciding with an enhancement in antioxidant enzymes, reduced LPO and likely contributed to *N. minutum* recovery responses to cold exposure. Reversible post-translationally modifications by NO in antioxidant enzymes may be an important adjustment to temperature changes for this species, despite that proteomics analyses will

be required to evaluate this hypothesis. Thus, metabolic adjustments verified in *N. minutum* showed NO participation in tropical plants thermal responses, showing toxic and protective properties depending on its concentration and duration profile. Thus, our findings demonstrate that this tropical bromeliad is able to sense abrupt temperature changes and to rapidly respond to it with metabolic adjustments related to NO production which can be crucial in the current scenario of global climate change. Therefore, these finds can also be implicated to its survival under natural conditions.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, grant number 13/25047-0).

5. REFERENCES

- Abat, J.K., Talwar, P.S., Deswal, R., 2008. S-nitrosylation – another biological switch like phosphorylation? *Physiol. Mol. Biol. Plants* 14, 119–130.
- Airaki, M., Leterrier, M., Mateos, R.M., Valderrama, R., Chaki, M., Barroso, J.B., del Río, L.A., Palma, J.M., Corpas, F.J., 2012. Metabolism of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under low temperature stress. *Plant, Cell Environ.* 35, 281–295. doi:10.1111/j.1365-3040.2011.02310.x
- Atkinson, N.J., Urwin, P.E., 2012. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *J. Exp. Bot.* 63, 3523–3544. doi:10.1093/jxb/ers100
- Balen, B., Tkalec, M., Pavoković, D., Pevalek-Kozlina, B., Krsnik-Rasol, M., 2009. Growth conditions in *in vitro* culture can induce oxidative stress in *Mammillaria gracilis* tissues. *J. Plant Growth Regul.* 28, 36–45. doi:10.1007/s00344-008-9072-5
- Baudouin, E., 2011. The language of nitric oxide signalling. *Plant Biol.* 13, 233–242. doi:10.1111/j.1438-8677.2010.00403.x
- Beauchamp, C.U., Fridovich, I., 1971. Improved assays for superoxide dismutase and an assay applicable to polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 44, 276–287. doi:10.1016/0003-2697(71)90370-8

- Begara-Morales, J.C., Sánchez-Calvo, B., Chaki, M., Mata-Pérez, C., Valderrama, R., Padilla, M.N., López-Jaramillo, J., Luque, F., Corpas, F.J., Barroso, J.B., 2015. Differential molecular response of monodehydroascorbate reductase and glutathione reductase by nitration and S-nitrosylation. *J. Exp. Bot.* 66, 5983–5996. doi:10.1093/jxb/erv306
- Begara-Morales, J.C., Sánchez-Calvo, B., Chaki, M., Valderrama, R., Mata-Pérez, C., López-Jaramillo, J., Padilla, M.N., Carreras, A., Corpas, F.J., Barroso, J.B., 2014. Dual regulation of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) by tyrosine nitration and S-nitrosylation. *J. Exp. Bot.* 65, 527–538. doi:10.1093/jxb/ert396
- Bose, B., Srivastava, H.S., 2001. Absorption and accumulation of nitrate in plants: influence of environmental factors. *Indian J. Exp. Biol.* 39, 101–110.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Britto, D.T., Kronzucker, H.J., 2002. NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. *J. Plant Physiol.* 159, 567–584. doi:http://dx.doi.org/10.1078/0176-1617-0774
- Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L., 2015. *Biochemistry & molecular biology of plants*, 2nd ed. Wiley Blackwell, West Sussex, UK.
- Cantrel, C., Vazquez, T., Puyaubert, J., Rezé, N., Lesch, M., Kaiser, W.M., Dutilleul, C., Guillas, I., Zachowski, A., Baudouin, E., 2011. Nitric oxide participates in cold-responsive phosphosphingolipid formation and gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 189, 415–427. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03500.x
- Carvalho, C.P., Hayashi, A.H., Braga, M.R., Nievola, C.C., 2013. Biochemical and anatomical responses related to the *in vitro* survival of the tropical bromeliad *Nidularium minutum* to low temperatures. *Plant Physiol. Biochem.* 71, 144–154. doi:10.1016/j.plaphy.2013.07.005
- Cataldo, D.A., Maroon, M., Schrader, L.E., Youngs, V.L., 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 6, 71–80. doi:10.1080/00103627509366547
- Chamizo-Ampudia, A., Sanz-Luque, E., Llamas, A., Galvan, A., Fernandez, E., 2017. Nitrate reductase regulates plant nitric oxide homeostasis. *Trends Plant Sci.* 22, 163–174. doi:10.1016/j.tplants.2016.12.001

- Chien, H.F., Chuan, C.L., Wang, J.W., Chien, T.C., Ching, H.K., 2002. Changes in ammonium ion content and glutamine synthetase activity in rice leaves caused by excess cadmium are a consequence of oxidative damage. *Plant Growth Regul.* 36, 41–47. doi:10.1023/A:1014742014171
- Clark, D., Durner, J., Navarre, D. a, Klessig, D.F., 2000. Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 13, 1380–1384. doi:10.1094/MPMI.2000.13.12.1380
- Ederli, L.E., Morettini, R., Borgogni, A., Wasternack, C. Miersch, O., Reale, L., Ferranti, F., Tosti, N., Pasqualini, S. 2006. Interaction between nitric oxide and ethylene in the induction of alternative oxidases in ozone-treated tobacco plants. *Plant Physiol.* 142, 595–608.
- Erdal, S., 2012. Plant physiology and biochemistry androsterone-induced molecular and physiological changes in maize seedlings in response to chilling stress. *Plant Physiol. Biochem.* 57, 1–7. doi:10.1016/j.plaphy.2012.04.016
- Fancy, N.N., Bahlmann, A.-K., Loake, G.J., 2016. Nitric oxide function in plant abiotic stress. *Plant, Cell Environ.* 40, 462–472. doi:10.1111/pce.12707
- Foyer, C.H., LopezDelgado, H., Dat, J.F., Scott, I.M., 1997. Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol. Plant.* 100, 241–254. doi:10.1034/j.1399-3054.1997.1000205.x
- Freschi, L., Rodrigues, M.A., Domingues, D.S., Purgatto, E., Van Sluys, M.A., Magalhaes, J.R., Kaiser, W.M., Mercier, H., 2010. Nitric oxide mediates the hormonal control of crassulacean acid metabolism expression in young pineapple plants. *Plant Physiol.* 152, 1971–1985. doi:10.1104/pp.109.151613
- Gerendás, J., Zhu, Z., Bendixen, R., Ratcliffe, R.G., Sattelmacher, B., 1997. Physiological and biochemical processes related to ammonium toxicity in higher plants. *Z. Pflanzenernähr. Bodenkd.* 160, 239–251.
- Gorsuch, P.A., Pandey, S., Atkin, O.K., 2010. Thermal de-acclimation: how permanent are leaf phenotypes when cold-acclimated plants experience warming? *Plant, Cell Environ.* 33, 1124–1137. doi:10.1111/j.1365-3040.2010.02134.x
- Groß, F., Durner, J., Gaupels, F., 2013. Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. *Front. Plant Sci.* 4, 419. doi:10.3389/fpls.2013.00419
- Haldimann, P., 1999. How do changes in temperature during growth affect leaf pigment composition and photosynthesis in *Zea mays* genotypes differing in sensitivity to low temperature? *J. Exp. Bot.* 50, 543–550. doi:10.1093/jxb/50.333.543

- Hou, W., Sun, A.H., Chen, H.L., Yang, F.S., Pan, J.L., Guan, M.Y., 2016. Effects of chilling and high temperatures on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in leaves of watermelon seedlings. *Biol. Plant.* 60, 148–154. doi:10.1007/s10535-015-0575-1
- Hurry, V.M., Huner, N.P.A., 1992. Effect of cold hardening on sensitivity of winter and spring wheat leaves to short-term photoinhibition and recovery of photosynthesis. *Plant Physiol.* 100, 1283–1290. doi: 10.1104/pp.100.3.1283
- Iba, K., 2002. Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 225–45. doi:10.1146/annurev.arplant.53.100201.160729
- Jan, S., Kamili, A.N., Hamid, R., Parray, J.A., 2013. Variation in adaptation mechanisms of medicinal herbs to the extreme winter conditions across the North Western Himalaya. *Isr. J. Plant Sci.* 61, 1–11. doi:10.1080/07929978.2014.939828
- Jaworski, E.G., 1971. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43, 1274–1279. doi:10.1016/S0006-291X(71)80010-4
- Jiang, Z.Y., Woollard, A.C.S., Wolff, S.P., 1991. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 26, 853–856. doi:10.1007/BF02536169
- Kodra, E., Steinhäuser, K., Ganguly, A.R., 2011. Persisting cold extremes under 21st-century warming scenarios. *Geophys. Res. Lett.* 38, 1–5. doi:10.1029/2011GL047103
- Laxalt, A.M., Beligni, M. V., Lamattina, L., 1997. Nitric oxide preserves the level of chlorophyll in potato leaves infected by *Phytophthora infestans*. *Eur. J. Plant Pathol.* 103, 643–651. doi:10.1023/A:1008604410875
- Li, X., Gong, B., Xu, K., 2014. Interaction of nitric oxide and polyamines involves antioxidants and physiological strategies against chilling-induced oxidative damage in *Zingiber officinale* Roscoe. *Sci. Hortic.* 170, 237–248. doi:10.1016/j.scienta.2014.03.026
- Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C., 2001. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS. *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.* F4.3.1-F4.3.8.
- Lichtenthaler, H.K., Miehe, J.A., 1997. Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends Plant Sci.* 2, 316–320. doi:10.1016/S1360-1385(97)89954-2
- Lindermayr, C., Saalbach, G., Durner, J., 2005. Proteomic Identification of S-nitrosylated proteins. *Plant Physiol.* 137, 921–930. doi:10.1104/pp.104.058719.1

- Liu, X., Wang, L., Liu, L., Guo, Y., Ren, H., 2011. Alleviating effect of exogenous nitric oxide in cucumber seedling against chilling stress. *African J. Biotechnol.* 10, 4380–4386. doi:10.5897/AJB10.812
- Luck, H., 1974. Catalases. In: Bregmeyer, H.U (ed.) *Methods of enzymatic analysis*, vol 2. Academic Press, New York.
- Lytvyn, D.I., Raynaud, C., Yemets, A.I., Bergounioux, C., Blume, Y.B., 2016. Involvement of inositol biosynthesis and nitric oxide in the mediation of UV-B induced oxidative stress. *Front. Plant Sci.* 7, 430–442. doi:10.3389/fpls.2016.00430
- Mai, J., Herbette, S., Vandame, M., Kositsup, B., Kasemsap, P., Cavaloc, E., Julien, J.L., Améglio, T., Roeckel-Drevet, P., 2009. Effect of chilling on photosynthesis and antioxidant enzymes in *Hevea brasiliensis* Muell. Arg.. *Trees Struct. Funct.* 23, 863–874. doi:10.1007/s00468-009-0328-x
- Mailler, S., Lott, F., 2015. Impact of subgrid-scale orography on equatorial angular momentum budget and the cold surges in a general circulation model. *Mon. Weather Rev.* 143, 4443–4458. doi:10.1175/MWR-D-14-00233.1
- Manoli, A., Begheldo, M., Genre, A., Lanfranco, L., Trevisan, S., Quaggiotti, S., 2014. NO homeostasis is a key regulator of early nitrate perception and root elongation in maize. *J. Exp. Bot.* 65, 185–200. doi:10.1093/jxb/ert358
- Marengo, J., Cornejo, A., Satyamurty, P., Nobre, C., 1997. Cold surges in tropical and extratropical South America: the strong event in June 1994. *Mon. Weather Rev.* 125, 2759–2786. doi:10.1175/1520-0493(1997)125<2759:CSITAE>2.0.CO;2
- Melo, N.K.G., Bianchetti, R.E., Lira, B.S., Oliveira, P.M.R., Zuccarelli, R., Dias, D.L.O., Demarco, D., Peres, L.E.P., Rossi, M., Freschi, L., 2016. Nitric oxide, ethylene, and auxin cross talk mediates greening and plastid development in deetioloating tomato seedlings. *Plant Physiol.* 170, 2278–2294. doi:10.1104/pp.16.00023
- Miura, K., Furumoto, T., 2013. Cold signaling and cold response in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 5312–5337. doi:10.3390/ijms14035312
- Müller, G.V., Gan, M.A., Piva, E.D., Silveira, V.P., 2015. Energetics of wave propagation leading to cold event in tropical latitudes of South America. *Clim. Dyn.* 45, 1–20. doi:10.1007/s00382-015-2532-2
- Munné-Bosch, S., Lalueza, P., 2007. Age-related changes in oxidative stress markers and abscisic acid levels in a drought-tolerant shrub, *Cistus clusii* grown under Mediterranean field conditions. *Planta* 225, 1039–1049. doi:10.1007/s00425-006-0412-z

- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen-peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach-chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22, 867–880. doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232
- Nievola, C.C., Mercier, H., 2001. Variações diurnas da atividade *in vivo* da redutase do nitrato em abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merr. - Bromeliaceae). *Rev. Bras. Botânica* 24, 295–301. doi:10.1590/S0100-84042001000300008
- Pancel, L., Köhl, M., 2016. *Tropical forestry Handbook*, 2nd ed. Springer, Berlin. doi:10.1007/978-3-642-41554-8
- Puyaubert, J., Baudouin, E., 2014. New clues for a cold case: nitric oxide response to low temperature. *Plant, Cell Environ.* 37, 2623–2630. doi:10.1111/pce.12329
- Rapacz, M., Sasal, M., Gut, M., 2011. Chlorophyll fluorescence-based studies of frost damage and the tolerance for cold-induced photoinhibition in freezing tolerance analysis of triticale (*Triticosecale* Wittmack). *J. Agron. Crop Sci.* 197, 378–389. doi:10.1111/j.1439-037X.2011.00472.x
- Sasaki, H., Ichimura, K., Imada, S., Yamaki, S., 2001. Sucrose synthase and sucrose phosphate synthase, but not acid invertase, are regulated by cold acclimation and deacclimation in cabbage seedlings. *J. Plant Physiol.* 158, 847–852.
- Schaedle, M., Bassham, J.A., 1977. Chloroplast glutathione reductase. *Plant Physiol.* 59, 1011–1012. doi:10.1104/pp.59.5.1011
- Sehrawat, A., Gupta, R., Deswal, R., 2013. Nitric oxide-cold stress signalling cross-talk, evolution of a novel regulatory mechanism. *Proteomics* 13, 1816–1835. doi:10.1002/pmic.201200445
- Shi, H., Ye, T., Chen, F., Cheng, Z., Wang, Y., Yang, P., Zhang, Y., Chan, Z., 2013. Manipulation of arginase expression modulates abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*: effect on arginine metabolism and ROS accumulation. *J. Exp. Bot.* 64, 1367–1379. doi:10.1093/jxb/ers400
- Siddiqui, M.H., Al-Whaibi, M.H., Basalah, M.O., 2011. Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress. *Protoplasma* 248, 447–455. doi:10.1007/s00709-010-0206-9

- Skillman, J.B., Osmond, C.B., 1998. Influence of nitrogen supply and growth irradiance on photoinhibition and recovery in *Heuchera americana* (Saxifragaceae). *Physiol. Plant.* 103, 567–573. doi:10.1034/j.1399-3054.1998.1030416.x
- Skopelitis, D.S., Paranychianakis, N.V., Paschalidis, K.A., Pliakonis, E.D., Delis, I., Yakoumakis, D.I., Kouvarakis, A., Papadakis, A., Stephanou, E.G., Roubelakis-Angelakis, K.A., 2006. Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. *Plant Cell* 18, 2767–2781. doi:10.1105/tpc.105.038323
- Souza, S.R., Blande, J.D., Holopainen, J.K., 2013. Pre-exposure to nitric oxide modulates the effect of ozone on oxidative defenses and volatile emissions in lima bean. *Environ. Pollut.* 179, 111–119. doi:10.1016/j.envpol.2013.03.065
- Sun, H., Li, J., Song, W., Tao, J., Huang, S., Chen, S., Hou, M., Xu, G., Zhang, Y., 2015. Nitric oxide generated by nitrate reductase increases nitrogen uptake capacity by inducing lateral root formation and inorganic nitrogen uptake under partial nitrate nutrition in rice. *J. Exp. Bot.* 66, 2449–2459. doi:10.1093/jxb/erv030
- Wang, C., Zang, S.H., Wang, P.F., Hou, J., Li, W., Zhang, W.J., 2008. Metabolic adaptations to ammonia-induced oxidative stress in leaves of the submerged macrophyte *Vallisneria natans* (Lour.) Hara. *Aquat. Toxicol.* 87, 88–98. doi:10.1016/j.aquatox.2008.01.009
- Wang, Y., Holroyd, G., Hetherington, A.M., Ng, C.K.Y., 2004. Seeing “cool” and “hot” - infrared thermography as a tool for non-invasive, high-throughput screening of *Arabidopsis* guard cell signalling mutants. *J. Exp. Bot.* 55, 1187–1193. doi:10.1093/jxb/erh135
- Weatherburn, M.W., 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* 39, 971–974. doi:10.1021/ac60252a045
- Weng, X.Y., Zheng, C.J., Xu, H.X., Sun, J.Y., 2007. Characteristics of photosynthesis and functions of the water-water cycle in rice (*Oryza sativa*) leaves in response to potassium deficiency. *Physiol. Plant.* 131, 614–621. doi:10.1111/j.1399-3054.2007.00978.x
- Yaneva, I.A., Hoffmann, G.W., Tischner, R., 2002. Nitrate reductase from winter wheat leaves is activated at low temperature via protein dephosphorylation. *Physiol. Plant.* 114, 65–72. doi:10.1034/j.1399-3054.2002.1140110.x

- Zhao, M.-G., Chen, L., Zhang, L.-L., Zhang, W.-H., 2009. Nitric reductase-dependent nitric oxide production is involved in cold acclimation and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 151, 755–67. doi:10.1104/pp.109.140996
- Zheng, P., Bai, X., Long, J., Li, K., Xu, H., 2016. Nitric oxide enhances the nitrate stress tolerance of spinach by scavenging ROS and RNS. *Sci. Hortic.* 213, 24–33. doi:10.1016/j.scienta.2016.10.008

CAPÍTULO 2

Changes in sugar content are involved in the early responses of the bromeliad *Nidularium minutum* Mez to cold

Camila Pereira Carvalho^{A,B}, Marcia Regina Braga^C, Catarina Carvalho Nievola^{B,D}

^APrograma de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Instituto de Botânica, São Paulo, SP, Brasil;

^BNúcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais, Instituto de Botânica, São Paulo, SP, Brasil;

^CNúcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica, Instituto de Botânica, São Paulo, SP, Brasil

^DCorresponding author. E-mail: ccnievola@uol.com.br

ABSTRACT

In natural environment, *Nidularium minutum* Mez can face chilling events associated with large thermal amplitude, suggesting that tropical plants may have fast metabolic adjustments to tolerate temperature changes. Accumulation of soluble sugars was previously observed in this bromeliad during prolonged cold exposure, which was associated to osmoregulation. However, it was not reported whether the increase in soluble sugars would occur during early cold exposure, contributing to cellular homeostasis prior and after acclimation. The aim of this study was to evaluate the involvement of soluble sugars in the first hours of *N. minutum* exposition to low temperatures (10 °C) and after plant transference to 25 °C (de-acclimation). After 72 h of chilling, higher levels of glucose, fructose and sucrose were detected in plants maintained at 10 °C compared to those of de-acclimated ones. Only *myo*-inositol enhanced in de-acclimated plants. Sucrose/glucose + fructose ratio increased in plants maintained under cold treatment, probably related to an enhancement in sucrose synthesis and a decrease in sucrose cleavage induced by chilling. These data suggest that sucrose could be involved in the early cold exposure responses of *N. minutum* whereas glucose seems to be related to long-term responses. These qualitatively changes in sugar content might play a role in the homeostasis maintenance during cold acclimation of this tropical bromeliad.

Keywords: acclimation, Bromeliaceae, fast responses, soluble sugars, thermal amplitude.

1. INTRODUCTION

Plants experience wide temporal and spatial variations in temperature, which affect metabolic processes and cellular homeostasis (Iba 2002). Among them, cold is one of the major environmental stress that influences plant growth and development (Chinnusamy *et al.* 2006, Miura & Furumoto 2013). Low temperatures, defined as below optimal but above freezing temperatures, affect more tropical and subtropical plants than temperate species, although chilling events can also occur in tropical biomes (Marengo *et al.* 1997). Therefore, plants growing in this region probably developed fast and efficient mechanisms of resiliency and adaptability to such conditions. The physiological adjustment leading to cold tolerance is called acclimation (Buchanan *et al.* 2015).

Accumulation of soluble sugars during cold acclimation has been demonstrated for several plant species (Klotke *et al.* 2004, Shin *et al.* 2015, Tarkowski & Van den Ende 2015, Figueroa & Lunn 2016, Yoon *et al.* 2017). Sugars contribute to the osmotic adjustment, since cold stress can cause cellular dehydration and the accumulation of solutes reduces the water potential, leading to water entrance (Buchanan *et al.* 2015, Iqbal *et al.* 2016). Sucrose, fructose, and raffinose can interact with the phosphate of phospholipids, decreasing membrane permeability (Hinch *et al.* 2003, Ruelland *et al.* 2009, Tarkowski & Van den Ende 2015). Maltose, trehalose, and glucose are involved in protein and enzyme stabilization, contributing for the functionality of membrane-associated process, such as the photosynthetic electron transport chain, avoiding physical and metabolic damages caused by cold temperatures (Kaplan & Guy 2004). Sucrose can act as primary messenger and regulates signals that control the expression of genes involved in plant growth and metabolism (Rosa *et al.* 2009). Furthermore, these sugars are important for the homeostasis maintenance during the stress exposure, preserving cell stability and compensating the environment changes (Miller *et al.* 2010, Chamizo-Ampudia *et al.* 2017).

Increased sugar content has been observed in the beginning of the cold exposure, as related to sucrose and maltose increase in *Arabidopsis thaliana* after 1 h at 6 °C (Sicher 2011) and to sucrose, glucose and fructose raise for cabbage after 72 h at 5 °C (Sasaki *et al.* 2001). This raise can be related to stimulation in Calvin cycle enzymes by cold, influencing the synthesis of carbohydrates (Strand *et al.* 1999). Enzymes related to sucrose production also enhance their activity after 72 h of cold exposure in cabbage (Sasaki *et al.* 2001) and after 24 h in *A. thaliana* (Nägele *et al.* 2011).

Temperature fluctuations in tropical biomes can vary up to 15 °C in 24 h (Marengo *et al.* 1997), moreover cold events can occur in certain periods of the year (Mailler & Lott 2015, Müller *et al.* 2015). Living in a rain forest requires a fast adjustment to tolerate temperature changes, which include cold exposure and temperature increases (de-acclimation) (Sasaki *et al.* 2001, Gorsuch *et al.* 2010). Thus, sugars can be involved in this fast regulation as temperature can influence the amount of their synthesis (Yoon *et al.* 2017) and affect plant responses to cold.

For tropical plants, as bromeliads, the increase in soluble sugars can be induced by cold (Mollo *et al.* 2011, Carvalho *et al.* 2013). *Nidularium minutum* Mez accumulates *myo*-inositol, sucrose, fructose and glucose when maintained *in vitro* at 10 °C for six months (Carvalho *et al.* 2013). The authors suggested that *N. minutum* survived the prolonged cold treatment since the species is native of a rain forest in Brazil, Alto da Serra de Paranapiacaba Biological Reserve, São Paulo State, where temperatures range from 2 to 30 °C (Gutjahr & Tavares 2009). The increase in soluble sugars found in such conditions probably contributes to species survival, especially the high glucose content found during the chilling period. However, it was not reported whether soluble sugars increased in the first hours of cold exposure, as this increase could indicate the role of these compounds in thermal adjustments during abrupt cold events that can occur in tropical biomes (Marengo *et al.* 1997). Therefore, we hypothesized that sugar accumulation could occur in the first hours of chilling as an early response to the stress whereas qualitative changes in sugar levels could signal further homeostasis responses. So, the aim of this study was to investigate the involvement of soluble sugars in the early events of cold exposure and de-acclimation of *N. minutum*.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Plant material and thermal treatments

Seeds of *Nidularium minutum* Mez harvested from plants growing in the Alto da Serra de Paranapiacaba Biological Reserve (São Paulo, SP, Brazil) were placed in Petri dishes on a filter paper soaked in distilled water. The Petri dishes were maintained in a culture room at 25 ± 2 °C, with a total irradiance of $45 \mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$, in a 12 h daylight regime. After one month, plantlets were transferred to plastic trays containing fine sterilized commercial medium-size *Pinus* bark as substrate involved by a plastic sack (Carvalho *et al.* 2013) and maintained under the same culture conditions for five months.

Plants were fertilized weekly with 20 ml of a solution of Murashige & Skoog (1962) with half strength of macronutrients.

For cold exposure treatment, plants were transferred to a growth chamber maintained at 10 °C under the same light conditions as above, and samples were analyzed after 3, 24, 48 and 72 h of chilling stress. After 72 h at 10 °C, a subset of plants were de-acclimated by transferring them to the growth chamber at 25 °C. Irradiance and photoperiod were the same described above. De-acclimation was imposed for 24, 48, 72 and 168 h.

2.2. Extraction and analyses of soluble sugars

Leaf samples were frozen in liquid N₂ and stored at -80 °C. Frozen leaf samples were ground to a fine powder and 100 mg were used for analysis. Soluble sugars were extracted in 80% ethanol (40 mg fresh mass ml⁻¹) as described by Carvalho *et al.* (2013). The amounts of total carbohydrates and reducing sugars in the ethanolic extracts, after the alcohol removal, were determined colorimetrically by the phenol-sulphuric acid method (Dubois *et al.* 1956) and Somogyi-Nelson procedure (Somogyi 1945), respectively, using glucose (Sigma®) as standard.

The extracts were deionized through Dowex ion exchange columns (Carvalho *et al.* 2013) and analyzed by HPAEC/PAD using an ICS 3000 Dionex system with a CarboPac PA-1 column (250 x 4 mm). Sugars were eluted by mixing eluent A (water) and eluent B (150 mM sodium hydroxide) for 35 min at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹ at a constant temperature of 30 °C. *Myo*-inositol, glucose, fructose, sucrose, stachyose, raffinose and trehalose (Sigma®) were used as standards for identification and quantification of the sugars based on the retention time and peak areas.

2.3. Data analysis

Data were submitted to *t* test to determine the significance of the differences between individual treatments. In all analyses, $p \leq 0.05$ was considered to indicate statistical significance. Analyses were performed in GraphPad Prism software (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

3. RESULTS

In general, an increase in total and reducing sugars was observed for *N. minutum* maintained at 10 °C (Fig. 1), suggesting that these molecules can be involved in the water preservation under cold. During de-acclimation phase, these sugars decreased ca. 50% compared with plants maintained at 10 °C for 168 h (Fig. 1).

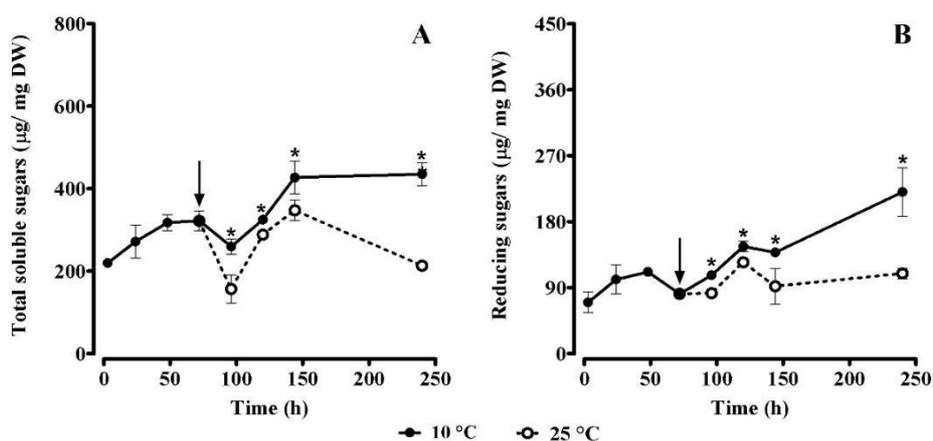


Figure 1 – (A) Total and (B) reducing sugars content in leaves of *N. minutum* during cold exposure (10 °C) and de-acclimation (25 °C). Asterisks show significant differences according to the *t* test for samples taken at the same time point. ●● chilling; ○○ de-acclimation after 72h of cold exposition (↓). Vertical bars indicate standard deviation. (n=3)

Myo-inositol, glucose, fructose, and sucrose were detected as soluble sugars in leaves of *N. minutum*. Sucrose and glucose were the most abundant sugars (Fig. 2). Trehalose, stachyose and raffinose were not detected. Soluble sugars were differentially affected by chilling stress. An increase in *myo*-inositol and fructose contents were detected under 72 h of cold in contrast with reduced glucose concentrations (Fig. 2). Sucrose levels remained slightly constant during this period (Fig. 2D). Under de-acclimation, all sugars showed high content in plants maintained at 10 °C in the first 24 h at 25 °C, except *myo*-inositol, with the high values observed in the de-acclimated plants (Fig. 2). Increased sucrose to hexoses (glucose + fructose) ratio was observed during 72 h of cold exposure (Fig. 2E).

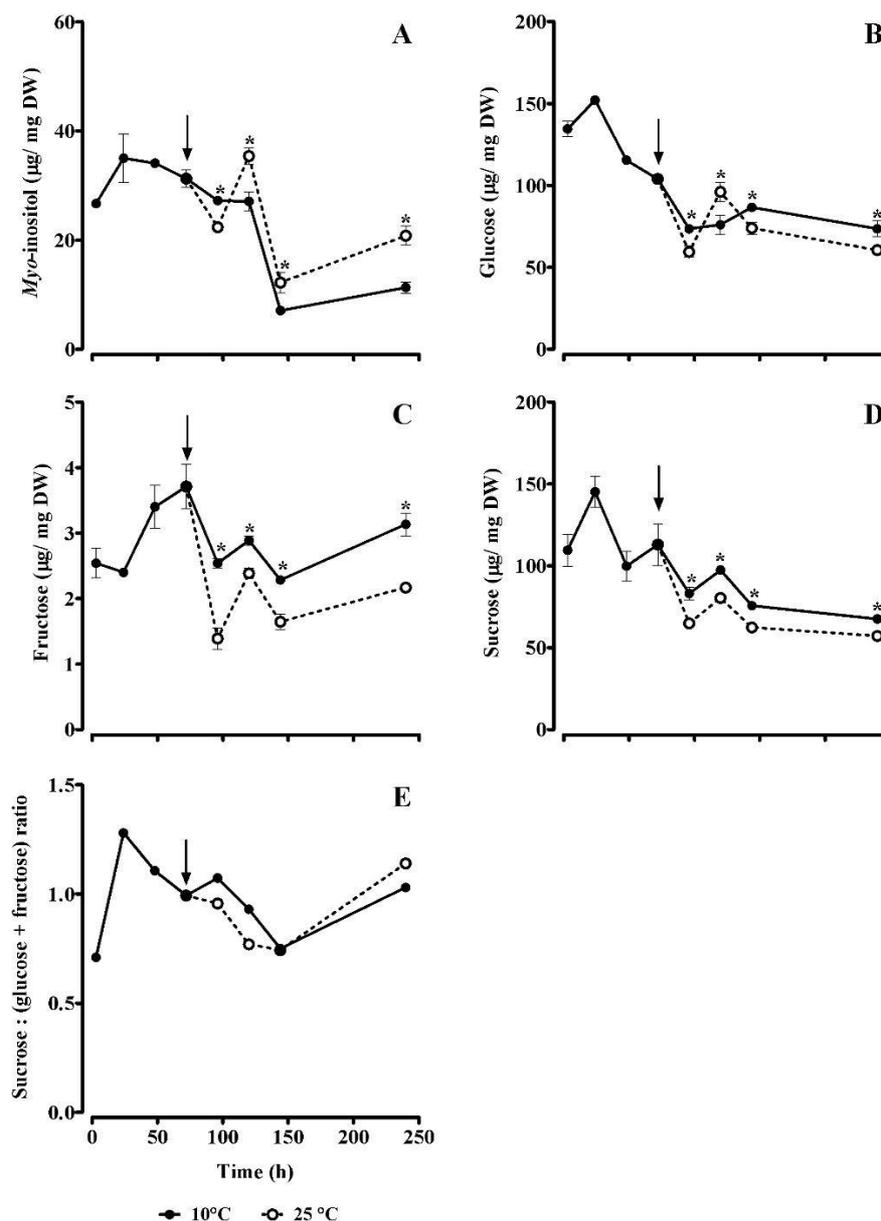


Figure 2 – (A) *Myo*-inositol, (B) glucose, (C) fructose, (D) sucrose content and (E) sucrose: (glucose + fructose) ratio in leaves of *N. minutum* during cold exposure (10 °C) and de-acclimation (25 °C). Asterisks show significant differences according to the *t* test for samples taken at the same time point. ●● chilling; ○○ de-acclimation after 72 h of cold exposition (↓). Verticals bars indicate standard deviation. ($n=3$)

4. DISCUSSION

The present study showed that *N. minutum* accumulated soluble sugars in the first hours of chilling. As reported for several species, accumulation of soluble sugars during chilling may be an indicative of great cold tolerance (Keller & Steffen 1995, Bogdanović

et al. 2008, Majláth *et al.* 2016). For bromeliads, an increase in soluble sugars was previously detected in *Alcantarea imperialis*, which exhibited higher soluble sugar content in plants cultivated at 15 °C in comparison with those maintained at 30 °C (Mollo *et al.* 2011).

N. minutum showed a reduction in soluble sugars concentration after only 24 h of de-acclimation, however continuous enhancement in these compounds occurred in plants maintained at 10 °C. These results are consistent with the findings reported for cabbage (Sasaki *et al.* 1996), indicating that sugars accumulated at low temperature were rapidly metabolized during de-acclimation at normal growing temperatures.

Trehalose and raffinose family oligosaccharides can be synthesized by plants exposed to low temperatures as osmolytes and stress protectants (Tarkowski & Van den Ende 2015, Figueroa & Lunn 2016). Our results showed absence of such sugars in *N. minutum*, what was similar to that previously observed in long-term response at 10 °C for this bromeliad (Carvalho *et al.* 2013). These sugars were related to cold acclimation in another bromeliad, *A. imperialis* (Mollo *et al.* 2011).

Myo-inositol is known to be a compatible solute usually accumulated in plants as a stress response (Cramer *et al.* 2011). For *N. minutum*, this sugar seems to be involved in the early mechanisms of cold stress tolerance, since in the de-acclimation phase *myo*-inositol reduced at 10 °C and increased at 25 °C. In plants maintained for six months in thermal treatments, this sugar content was similar to that found for those grown at 25 °C (Carvalho *et al.* 2013). Therefore, we suggest that this sugar should be involved in normal cell metabolism and plant growth, serving as a precursor to a large variety of compounds, such as galactinol, pinitol, cell wall polysaccharides (Valluru & Van den Ende 2011) and even ascorbic acid (Ahmad 2014).

A decrease in glucose content was found in *N. minutum* during early cold exposure. In contrast, in pea the content of this sugar was higher in leaves exposed at 5 °C for 24 h than those maintained at 40 °C (Kaplan & Guy 2004). Even glucose being associated to high resistance to chilling injury (Cao *et al.* 2013). However, this sugar has also be related to ROS-producing metabolic pathways, since high glucose content is toxic due to increased production of ROS by glucose auto-oxidation and glucose metabolism (Couée *et al.* 2006), showing a dual role of this sugar with respect to stress tolerance. Thus, glucose reduction during the early cold exposure in *N. minutum* could contribute to cell protection against oxidative injury caused by this sugar.

Notably in the first hours of low temperature exposition, we observed fructose accumulation for this bromeliad, however this increase did not occur during the prolonged chilling treatment (Carvalho *et al.* 2013). This sugar is involved in osmoregulation, but studies with pea cultivated at 2 °C for 3 h associated high fructose content to an increase of the antioxidant capacity (Bogdanović *et al.* 2008). Oxidative stress are related to overproduction of reactive oxygen species (ROS) caused by stress exposure, which can damage or kill cells (Buchanan *et al.* 2015). For *N. minutum*, we suggest that fructose could also contributed with the non-enzymatic defense mechanisms in the first hours of chilling stress, as related for pea.

Decrease in glucose, fructose and sucrose occurred after 24 h of the plant transference to 25 °C for this bromeliad. Similar results occurred in cabbage when plants grown at 5 °C were de-acclimated at 20/15 °C (Sasaki *et al.* 2001) and in tomato leaves grown at 8/5 °C and transferred to 25/20 °C (Keller & Steffen 1995). Fast reduction in these soluble sugars during de-acclimation suggests that they could be involved in the initial signaling of the temperature change in *N. minutum* as we observed for other species.

In general, the sucrose: glucose + fructose ratio was higher in plants maintained at 10 °C than in those cultivated at 25 °C, which strongly suggest that sucrose is the main sugar related to the early response to cold exposure for this bromeliad. Enhancement in this sugar are related to the central importance of sucrose in higher plants, as a major carbon structure and form of sugar transport (Couée *et al.* 2006), and can be rapidly be mobilized as metabolic needs require (Guy *et al.* 1992). Sucrose increase and cold tolerance was previously reported for spinach and tomato (Guy *et al.* 1992, Keller & Steffen 1995). In addition, sucrose transport and hydrolysis play key regulatory roles in sugar signal generation in the developmental stages and under environmental stress (Folgado *et al.* 2014).

Previous data related to six months of chilling in *N. minutum* showed a lower sucrose: (glucose + fructose) ratio (Carvalho *et al.* 2013) in comparison with those under early cold exposure, although after 240 h of chilling this ratio has decreased. These results suggest that sugar metabolism play a pivotal role in this bromeliad, sucrose acting mainly under early chilling treatment whereas glucose seems to have its action on long-term low temperature growth. This difference could be explained by effects on enzyme activity related to sugar metabolism, as enzymes are regulate by temperature (Guy *et al.* 1992, Sasaki *et al.* 2001, Fotopoulos 2005). Although enzymatic activity was not addressed in

the present study, it is reasonable to suggest that under the first hours of *N. minutum* cold exposure, an enhancement in sucrose phosphate synthase (SPS) activity, an enzyme related to sucrose synthesis, and a decrease in the activities of the enzymes involved in sucrose cleavage, as sucrose synthase (SS) and invertases, can have occurred (Sasaki *et al.* 2001, Nägele *et al.* 2011, Jiang *et al.* 2016). Thus, we proposed that under early cold exposure, glucose would mainly attend energetic requirement or biosynthetic routes, while sucrose accumulation would be related to others metabolic functions, for example signalization in *N. minutum*. Similar responses were also found in *A. imperialis* during the prolonged cold exposition (nine months) (Mollo *et al.* 2011). High levels of glucose and a low sucrose content were also related to a decrease in SPS and SS-synthesis in loquat fruits stored at 1 °C for 35 days (Cao *et al.* 2013). As fructose levels found for *N. minutum* were low, even in a prolonged chilling (Carvalho *et al.* 2013), it did not altered the sucrose: (glucose + fructose) ratio.

Enhancement in soluble sugars could be due to efficient photosynthetic rate that can occurs during exposition of this stress, mainly with increase in the expression and subsequent activity of Calvin cycle enzymes (Strand *et al.* 1999). With the availability of substrate, the sugar synthesizing enzymes can enhance their activities, even in the first hours of cold exposures (Sasaki *et al.* 2001, Nägele *et al.* 2011), leading to soluble sugar accumulation during chilling. Moreover, a study with an *Arabidopsis* mutant associated the inability to cold acclimate with its low sugar content (Uemura *et al.* 2003), showing the essential role of sugars for low temperature tolerance.

In conclusion, high soluble sugar content seems to be implicated in the fast tolerance response for the tropical bromeliad *N. minutum* to chilling stress. In the first hours of chilling, this plant seems to accumulate sucrose, with glucose enhancement just after prolonged low temperature maintenance. Under de-acclimation phase, soluble sugars decreased, showing the modulation of soluble carbohydrate metabolism in tolerance to temperature stress for this species. We proposed that regulation of this metabolism is involved in maximize synthesis of sugars, and these compounds can be qualitatively changed over the cold exposure, contributing to the homeostasis responses for cold acclimation in this bromeliad.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, grant number 13/25047-0).

5. REFERENCES

- Ahmad, P.** 2014. *Oxidative Damage to Plants*. Elsevier, San Diego.
- Bogdanović, J., Mojović, M., Milosavić, N., Mitrović, A., Vučinić, Ž. & Spasojević, I.** 2008. Role of fructose in the adaptation of plants to cold-induced oxidative stress. *European Biophysics Journal* 37: 1241–1246.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W. & Jones, R.L.** 2015. *Biochemistry & molecular biology of plants*, 2 ed. Wiley Blackwell, West Sussex, UK.
- Cao, S., Yang, Z. & Zheng, Y.** 2013. Sugar metabolism in relation to chilling tolerance of loquat fruit. *Food Chemistry* 136: 139–143.
- Carvalho, C.P., Hayashi, A.H., Braga, M.R. & Nievola, C.C.** 2013. Biochemical and anatomical responses related to the *in vitro* survival of the tropical bromeliad *Nidularium minutum* to low temperatures. *Plant Physiology and Biochemistry* 71: 144–154.
- Chamizo-Ampudia, A., Sanz-Luque, E., Llamas, A., Galvan, A. & Fernandez, E.** 2017. Nitrate reductase regulates plant nitric oxide homeostasis. *Trends in Plant Science* 22: 163–174.
- Chinnusamy, V., Zhu, J. & Zhu, J.** 2006. Gene regulation during cold acclimation in plants. *Physiologia Plantarum* 126: 52–61.
- Couée, I., Sulmon, C., Gouesbet, G. & El Amrani, A.** 2006. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 57: 449–459.
- Cramer, G.R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M. & Shinozaki, K.** 2011. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology* 11: 163.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F.** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350–356.

- Figueroa, C.M. & Lunn, J.E.** 2016. A tale of two sugars – trehalose-6-phosphate and sucrose. *Plant Physiology* 172: 7-27.
- Folgado, R., Sergeant, K., Renaut, J., Swennen, R., Hausman, J-F. & Panis, B.** 2014. Changes in sugar content and proteome of potato in response to cold and dehydration stress and their implications for cryopreservation. *Journal of Proteomics* 98: 99–111.
- Fotopoulos, V.** 2005. Plant invertases: structure, function and regulation of a diverse enzyme family. *Journal of Biological Research* 4: 127–137.
- Gorsuch, P.A., Pandey, S. & Atkin, O.K.** 2010. Thermal de-acclimation: how permanent are leaf phenotypes when cold-acclimated plants experience warming? *Plant, Cell and Environmental* 33: 1124–1137.
- Gutjahr, M.R. & Tavares, R.** 2009. Clima. *In*: M.I.M.S. Lopes, M. Kirizawa & M.M.R.F. Melo (orgs.). *Patrimônio da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba*. Instituto de Botânica, São Paulo. pp. 39-51.
- Guy, C.L., Huber, J.L.A. & Huber, S.C.** 1992. Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature. *Plant Physiology* 100: 502–508.
- Hincha, D.K., Zuther, E. & Heyer, A.G.** 2003. The preservation of liposomes by raffinose family oligosaccharides during drying is mediated by effects on fusion and lipid phase transitions. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1612: 172–177.
- Iba, K.** 2002. Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 53: 225–245.
- Iqbal, N., Nazar, R. & Khan, N.A.** 2016. *Osmolytes and plants acclimation to changing environment: emerging omics technologies*. Springer, New York.
- Jiang, H.-Y., Gao, Y., Wang-Tian, W. & Bai-jun, H.** 2016. Evaluation of cold resistance in grapevines via photosynthetic characteristics, carbohydrate metabolism and gene expression levels. *Acta Physiologiae Plantarum* 38: 251.
- Kaplan, F. & Guy, C.L.** 2004. β -Amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock. *Plant Physiology* 135: 1674–1684.
- Keller, E., & Steffen, K.L.** 1995. Increased chilling tolerance and altered carbon metabolism in tomato leaves following application of mechanical stress. *Physiologia Plantarum* 93: 519–525.

- Klotke, J., Kopka, J., Gatzke, N. & Heyer, A.G.** 2004. Impact of soluble sugar concentrations on the acquisition of freezing tolerance in accessions of *Arabidopsis thaliana* with contrasting cold adaptation - evidence for a role of raffinose in cold acclimation. *Plant, Cell and Environmental* 27: 1395–1404.
- Mailler, S. & Lott, F.** 2015. Impact of subgrid-scale orography on equatorial angular momentum budget and the cold surges in a general circulation model. *Monthly Weather Review* 143: 4443–4458.
- Majláth, I., Darko, E., Palla, B., Nagy, Z., Janda, T. & Szalai, G.** 2016. Reduced light and moderate water deficiency sustain nitrogen assimilation and sucrose degradation at low temperature in durum wheat. *Journal of Plant Physiology* 191: 149–158.
- Marengo, J., Cornejo, A., Satyamurty, P. & Nobre, C.** 1997. Cold surges in tropical and extratropical South America: the strong event in June 1994. *Monthly Weather Review* 125: 2759–2786.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S. & Mittler, R.** 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and Environmental* 33: 453–467.
- Miura, K. & Furumoto, T.** 2013. Cold signaling and cold response in plants. *International Journal of Molecular Science* 14: 5312-5337.
- Mollo, L., Martins, M.C.M., Oliveira, V.F., Nievola, C.C. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2011. Effects of low temperature on growth and non-structural carbohydrates of the imperial bromeliad *Alcantarea imperialis* cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 107: 141–149.
- Müller, G.V., Gan, M.A., Piva, E.D. & Silveira, V.P.** 2015. Energetics of wave propagation leading to cold event in tropical latitudes of South America. *Climatic Dynamics* 45: 1-20.
- Murashige, T. & Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473–497.
- Nägele, T., Kandel, B.A., Frana, S., Meißner, M. & Heyer, A.G.** 2011. A systems biology approach for the analysis of carbohydrate dynamics during acclimation to low temperature in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Journal* 278: 506–518.
- Rosa, M., Prado, C., Podazza, G., Interdonato, R., González, J.A., Hilal, M. & Prado, F.E.** 2009. Soluble sugars- metabolism, sensing and abiotic stress. *Plant Signaling and Behavior* 4: 388–393.

- Ruelland, E., Vaultier, M.N., Zachowski, A. & Hurry, V.** 2009. Cold signalling and cold acclimation in plants. *Advances in Botanical Research* 49: 35–150.
- Sasaki, H., Ichimura, K., Imada, S. & Yamaki, S.** 2001. Sucrose synthase and sucrose phosphate synthase, but not acid invertase, are regulated by cold acclimation and deacclimation in cabbage seedlings. *Journal of Plant Physiology* 158: 847–852.
- Sasaki, H., Ichimura, K. & Oda, M.** 1996. Changes in sugar content during cold acclimation and deacclimation of cabbage seedlings. *Annals of Botany* 78: 365–369.
- Shin, H., Kim, K., Oh, Y., Yun, S.K., Oh, S-I, Sung, J. & Kim, D.** 2015. Carbohydrate changes in peach shoot tissues and their relationship to cold acclimation and deacclimation. *The Horticulture Journal* 84 (1): 21–29.
- Sischer, R.** 2011. Carbon partitioning and the impact of starch deficiency on the initial response of *Arabidopsis* to chilling temperatures. *Plant Science* 181: 167-176.
- Somogyi, M.** 1945. A new reagent for the determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry* 160: 61-68.
- Strand, Å., Hurry, V., Henkes, S., Huner, N., Gustafsson, P., Gardeström, P. & Stitt, M.** 1999. Acclimation of *Arabidopsis* leaves developing at low temperatures. Increasing cytoplasmic volume accompanies increased activities of enzymes in the Calvin cycle and in the sucrose-biosynthesis pathway. *Plant Physiology* 119: 1387-1397.
- Tarkowski, L.P. & Van den Ende, W.** 2015. Cold tolerance triggered by soluble sugars: a multifaceted countermeasure. *Frontiers in Plant Science* 6: 1–7.
- Valluru, R. & Van den Ende, W.** 2011. Myo-inositol and beyond – emerging networks under stress. *Plant Science* 181: 387-400.
- Uemura, M., Warren, G. & Steponkus, P.L.** 2003. Freezing sensitivity in the *sfr4* mutant of *Arabidopsis* is due to low sugar content and is manifested by loss of osmotic responsiveness. *Plant Physiology* 131: 1800-1807.
- Yoon, Y.-E., Kuppsamy, S., Cho, K.M., Kim, P.J., Kwack, Y.-B. & Lee, Y.B.** 2017. Influence of cold stress on contents of soluble sugars, vitamin C and free amino acids including gamma-aminobutyric acid (GABA) in spinach (*Spinacia oleracea*). *Food Chemistry* 215: 185-192.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A bromélia tropical *Nidularium minutum* Mez é endêmica de um ambiente com temperaturas que variam de 2 a 30 °C, com registros de 1,6 °C no inverno (Gutjahr & Tavares 2009). Estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa avaliaram a possibilidade de manter essa espécie em coleção *in vitro* sob crescimento lento por meio do uso de baixa temperatura, estratégia indicada para espécies endêmicas, ameaçadas de extinção (Sarasan *et al.* 2006, Pedroso *et al.* 2010, Lima-Brito *et al.* 2011, Mollo *et al.* 2011) como é o caso dessa bromélia. Os resultados mostraram que essa espécie sobrevive ao cultivo a 10 °C constantes por até seis meses (Carvalho *et al.* 2013). Rao (2004) relatou que plantas tropicais são sensíveis ao frio e por isso são usadas temperaturas entre 15 e 20 °C nessas coleções, porém nosso grupo de trabalho conseguiu baixar esse limite para *N. minutum*. Plantas de *N. minutum* nessa condição apresentaram redução do seu crescimento em cerca de seis vezes quando comparadas àquelas mantidas a 25 °C. Essa redução no crescimento diminui a necessidade de fazer subcultivos dessas plantas mantidas *in vitro*. Apesar da diminuição do tamanho, essas plantas alcançaram cerca de 95% de sobrevivência, o que demonstra a tolerância dessa bromélia ao frio, revelando um interessante aspecto a ser investigado. Considerando que as variações climáticas futuras podem levar a um aumento da amplitude térmica e eventos de frio súbito em biomas tropicais (Pancel & Köhl 2016), estudos que abordem os rápidos ajustes térmicos de espécies nativas frente à essas mudanças térmicas são cada vez mais necessários. Este estudo visou aprofundar os mecanismos fisiológicos de tolerância ao frio nessa espécie, tema que tem sido explorado pelo grupo de trabalho para outras espécies de bromélias.

Durante o desenvolvimento desta tese, já nas primeiras horas de exposição a 10 °C, as plantas de *N. minutum* apresentaram respostas relacionadas a uma condição de estresse por até 72 h, sendo que após esse período os parâmetros avaliados se apresentaram menos intensos, sugerindo a aclimação dessa bromélia ao frio. Quando as plantas foram transferidas para temperatura maior (25 °C - de-aclimação) mostraram indícios de recuperação após 24 h nessa condição menos fria. Associado aos processos de estresse térmico/aclimação/de-aclimação, foi demonstrado envolvimento do NO e dos carboidratos solúveis na manutenção da tolerância ao frio, aspectos não relatados ainda para plantas tropicais avaliadas em horas de exposição ao frio.

Os resultados apresentados no capítulo 1 mostraram que durante 72 h de exposição ao frio, esta bromélia apresentou um aumento no conteúdo de NO, que foi associado aos

altos níveis encontrados da enzima NR. Esta enzima, que faz parte do metabolismo do nitrogênio, reduz nitrato a nitrito que poderá ser reduzido a NO pela própria NR, sendo que muitos trabalhos consideram essa enzima a principal fonte de NO, em especial no resfriamento (Cantrel *et al.* 2011, Chamizo-Ampudia *et al.* 2017).

Durante as 72 h iniciais de resfriamento, foi observado um aumento nos níveis de LPO, que estão diretamente associados com danos em membranas. Este aumento foi correlacionado com a alta concentração de NO, já que este é um radical livre e pode reagir com diversas moléculas, incluindo lipídeos de membrana (Foyer *et al.* 1997, Lytvyn *et al.* 2016). Além disso, as análises nesse período mostraram redução das enzimas do sistema antioxidante, acúmulo de amônio e fotoinibição, sugerindo que esta planta estaria sujeita a uma condição de estresse oxidativo quando cultivada a 10 °C. Entretanto, o aumento dos pigmentos juntamente com a manutenção da fluorescência máxima observados estariam contribuindo para a sobrevivência dessa espécie até 72 h a 10 °C. É possível supor que tenha havido uma elevação no conteúdo das ROS relacionado com os danos encontrados nessas primeiras horas de resfriamento em *N. minutum*.

Durante a etapa de de-aclimação, foi possível observar uma menor intensidade nos parâmetros apontados como indicadores das respostas ao estresse nas plantas cultivadas a 25 °C em comparação com aquelas que foram mantidas a 10 °C, sugerindo que a partir desse ponto iniciaria a aclimação ao frio em *N. minutum*. O NO seria o sinal, já que seus níveis foram reduzidos com o prolongamento do frio, interferindo nas outras respostas encontradas. O aumento nos níveis das enzimas antioxidantes provavelmente contribuiu para aliviar as respostas a exposição ao frio. O NO exerce uma grande influência na regulação pós-traducional em proteínas e enzimas, inclusive nas enzimas antioxidantes, levando a ativação ou redução da atividade dessas moléculas (Begara-Morales *et al.* 2015). Essa regulação pode ser reversível de acordo com o nível de NO e por isso acredita-se que ela tenha ocorrido com as enzimas antioxidantes durante este estudo. Todavia, apesar das alterações metabólicas se apresentarem menos intensas e esta bromélia estar aclimatada a baixa temperatura, a condição de crescimento a 10 °C constante continua sendo considerada estressante.

O capítulo 2 apresenta os resultados em relação ao conteúdo de carboidratos solúveis em plantas crescidas por 72 h a 10 °C e nas plantas de-aclimatadas a 25 °C. Foi observado um maior conteúdo de carboidratos nas plantas mantidas no frio em comparação com aquelas transferidas para 25 °C. A sacarose foi o carboidrato encontrado em maior quantidade durante as horas iniciais de exposição ao frio para *N. minutum*,

porém com o frio prolongado, ou seja após seis meses mantida a 10 °C, foi verificado um maior conteúdo de glicose nessas plantas (Carvalho *et al.* 2013). Esses resultados demonstram que o acúmulo de carboidratos pode estar relacionado com a sinalização de respostas ao frio logo nas primeiras horas de resfriamento, sendo que o tipo de carboidrato acumulado pode variar de acordo com o tempo de exposição a este estresse.

Dessa forma, os resultados discutidos nesses dois capítulos evidenciam as alterações metabólicas envolvidas nas primeiras horas de aclimatação ao frio e de-aclimatação de uma espécie tropical. Com isso, essas relações entre os níveis de NO e dos carboidratos solúveis reforçam ainda mais os seus papéis na aclimatação dessa espécie. A figura 1 apresenta um diagrama com as principais respostas encontradas durante a aclimatação e de-aclimatação para essa espécie.

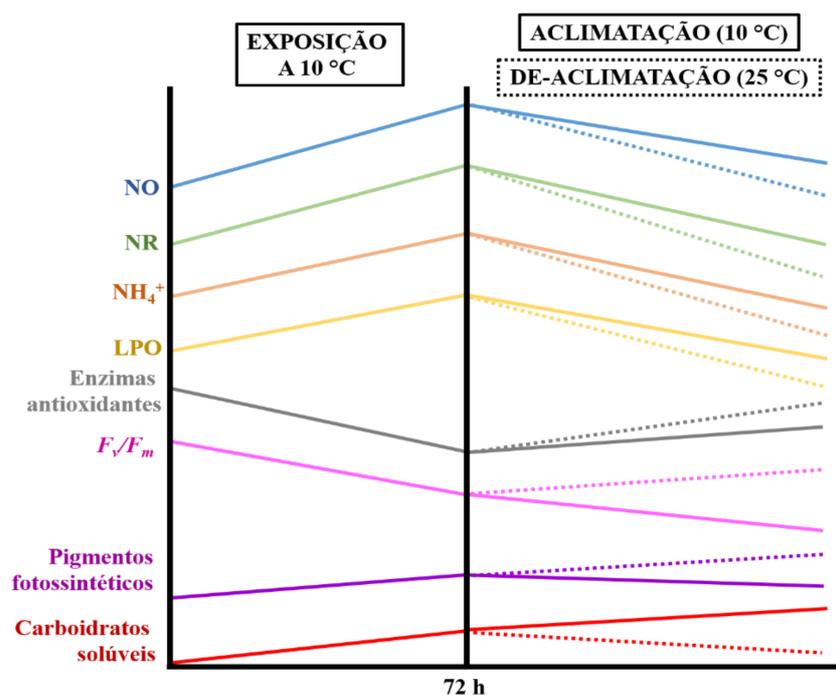


Figura 1 – Diagrama ilustrando as principais respostas encontradas durante a exposição inicial a 10 °C por até 72 h e após esse período, que foi indicado nesse trabalho como o início da aclimatação ao frio para essa espécie (*linha contínua*), e também o período de 24 h após a de-aclimatação (*linha tracejada*), onde foi verificado o início da recuperação para os parâmetros analisados. Observe a variação na intensidade das respostas ao longo do tempo em relação a permanência a 10 °C e a transferência para a temperatura de 25 °C.

1. Perspectivas futuras

Este trabalho mostrou que o NO pode estar envolvido na aclimação ao frio em *N. minutum*. A fim de ampliar o conhecimento sobre o papel dessa molécula durante a exposição ao estresse para plantas tropicais, estudos de proteômica poderiam analisar essa modulação pós-traducional do NO, principalmente em relação às enzimas que possam ser ativadas ou inibidas durante as respostas ao frio. Essa análise também indicaria outras moléculas que estariam sendo reguladas com o resfriamento, como açúcares álcool, moléculas do sistema antioxidante não enzimático, enzimas, etc. Adicionalmente, uma avaliação das enzimas do metabolismo da sacarose poderia auxiliar na compreensão das alterações em relação aos carboidratos acumulados ao longo da exposição ao frio para essa espécie. Além disso, análises quantitativas de ROS, como por exemplo o peróxido de hidrogênio, poderiam complementar os resultados obtidos com esse trabalho em relação aos danos causados durante a exposição a baixa temperatura para essa espécie tropical.

A extensão em que as plantas podem tolerar as variações térmicas é controlada geneticamente, sendo que o grau de plasticidade da espécie irá, por sua vez, ser dependente da regulação e expressão de muitos genes alguns dos quais podem ser específicos de cada tecido. Este trabalho contribui para ampliar o conhecimento da fisiologia de espécies tropicais, fornecendo subsídios para investigações futuras acerca de genes envolvidos com a tolerância ao frio, cuja expressão não ocorre normalmente em ambiente tropical quando as temperaturas são frequentemente mais elevadas. Este conhecimento poderá ser aplicado em espécies cultivadas para aumentar sua tolerância ao frio, que é um dos principais estresses ambientais que limita a distribuição geográfica de plantas, produtividade, qualidade e pós-colheita de culturas (Chinnusamy *et al.* 2006).

2. Referências Bibliográficas

Begara-Morales, J.C., Sánchez-Calvo, B., Chaki, M., Mata-Pérez, C., Valderrama, R., Padilla, M.N., López-Jaramillo, J., Luque, F., Corpas, F.J. & Barroso, J.B. 2015. Differential molecular response of monodehydroascorbate reductase and glutathione reductase by nitration and S-nitrosylation. *Journal of Experimental Botany* 66: 5983–5996.

- Cantrel, C., Vazquez, T., Puyaubert, J., Rezé, N., Lesch, M., Kaiser, W.M., Dutilleul, C., Guillas, I., Zachowski, A. & Baudouin, E.** 2011. Nitric oxide participates in cold-responsive phosphosphingolipid formation and gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 189: 415–427.
- Carvalho, C.P., Hayashi, A.H., Braga, M.R. & Nievola, C.C.** 2013. Biochemical and anatomical responses related to the *in vitro* survival of the tropical bromeliad *Nidularium minutum* to low temperatures. *Plant Physiology and Biochemistry* 71: 144–154.
- Chamizo-Ampudia, A., Sanz-Luque, E., Llamas, A., Galvan, A. & Fernandez, E.** 2017. Nitrate reductase regulates plant nitric oxide homeostasis. *Trends in Plant Science* 22: 163–174.
- Chinnusamy, V., Zhu, J. & Zhu, J.-K.** 2006. Gene regulation during cold acclimation in plants. *Physiologia Plantarum* 126: 52-61.
- Foyer, C.H., LopezDelgado, H., Dat, J.F. & Scott, I.M.** 1997. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum* 100: 241–254.
- Gutjahr, M.R. & Tavares, R.** 2009. Clima. *In*: M.I.M.S. Lopes, M. Kirizawa & M.M.R.F. Melo (orgs.). Patrimônio da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba. Instituto de Botânica, São Paulo. pp. 39-51.
- Lima-Brito, A., Albuquerque, M.M.S., Alvim, B.F.M., Resende, S.V., Bellintani, M.C. & Santana, J.R.F.** 2011. Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de sempre-viva. *Ciência Rural* 41: 1354–1361.
- Lytvyn, D.I., Raynaud, C., Yemets, A.I., Bergounioux, C. Blume, Y.B.** 2016. Involvement of inositol biosynthesis and nitric oxide in the mediation of UV-B induced oxidative stress. *Frontiers in Plant Science* 7: 430.
- Mollo, L., Martins, M.C.M., Oliveira, V.F., Nievola, C.C. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2011. Effects of low temperature on growth and non-structural carbohydrates of the imperial bromeliad *Alcantarea imperialis* cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 107: 141–149.
- Pancel, L. & Köhl, M.** 2016. *Tropical Forestry Handbook*, 2 ed. Springer, Berlin.
- Pedroso, A.N.V., Lazarini, R.A.D.M., Tamaki, V. & Nievola, C.C.** 2010. *In vitro* culture at low temperature and *ex vitro* acclimatization of *Vriesea inflata* an ornamental bromeliad. *Revista Brasileira de Botânica* 33: 407–414.

Rao, N.K. 2004. Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology* 3: 136–145.

Sarasan, V., Cripps, R., Ramsay, M.M., Atherton, C., McMichen, M., Prendergast, G. & Rowntree, J.K. 2006. Conservation *in vitro* of threatened plants — Progress in the past decade. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 42: 206–214.

ANEXO A – Padronização das condições para análises bioquímicas

Para garantir a precisão dos resultados apresentados para *N. minutum*, análises bioquímicas necessárias para a realização desse trabalho foram padronizadas. Dessa forma, foram realizados ensaios para os protocolos de peroxidação lipídica e das enzimas antioxidantes e da enzima nitrato redutase (NR). Em relação a determinação dos pigmentos fotossintéticos, foi avaliado um novo método para otimizar esta análise. Todos estes testes foram realizados na parte aérea de plantas de *N. minutum* cultivadas a 25 °C.

Peroxidação lipídica

Para as análises de peroxidação lipídica foi testado o método do xilenol-laranja que é baseado na medida de hidroperóxidos, que são os produtos primários da peroxidação (Jiang *et al.* 1991). Este método baseia-se na oxidação do ferro II para ferro III por hidroperóxidos, o qual reage com o xilenol laranja, produzindo um cromóforo que tem absorção máxima em 560 nm. Os resultados obtidos mostram uma linearidade da absorbância em relação a variação da tomada de ensaio (Fig. 1). Estes foram reprodutíveis indicando que o método é adequado ao material utilizado, sendo que foram determinados 200 µL do extrato para as dosagens posteriores.

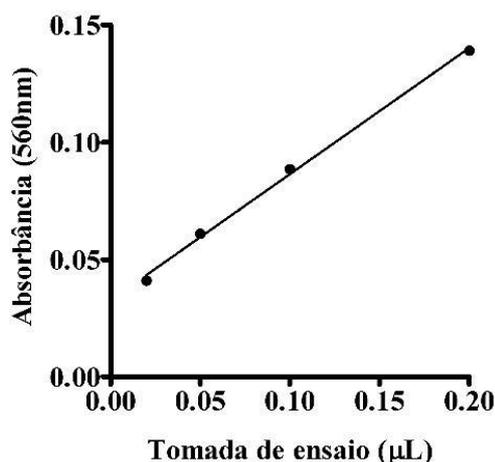


Figura 1 – Valores de absorbância em função do volume de extrato utilizado para estimar a peroxidação lipídica em folhas de *Nidularium minutum*.

Enzimas antioxidantes

Em relação as enzimas antioxidantes, foram realizadas padronizações para catalase (CAT) (Luck 1974), ascorbato peroxidase (APX) (Nakano & Asada 1981, modificado por Weng *et al.* 2007), glutathiona redutase (GR) (Schaedle & Bassham 1977) e superóxido dismutase (SOD) (Beauchamp & Fridovich 1971, modificado por Balen *et al.* 2009). A atividade da SOD foi determinada pela inibição da redução do nitroblue tetrazólio (NBT) pelo superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) produzido em reação fotoquímica com riboflavina. Assim, foi verificado que quanto maior o volume de extrato adicionado ao sistema de reação, maior foi a dismutação de $\cdot\text{O}_2^-$ pela SOD e, conseqüentemente, menor redução de NBT, resultando em valores menores de absorbância (Fig. 2A). Para as outras enzimas, foram avaliadas as atividades em relação ao volume de extrato empregado para o ensaio, que representa a quantidade de material vegetal utilizada na análise (Fig. 2B-D). Verificou-se que os valores de absorbância da CAT, APX e GR variaram linearmente em relação a quantidade de extrato, demonstrando que a atividade enzimática presente nos tecidos vegetais de *N. minutum* é diretamente proporcional ao volume de amostra utilizado.

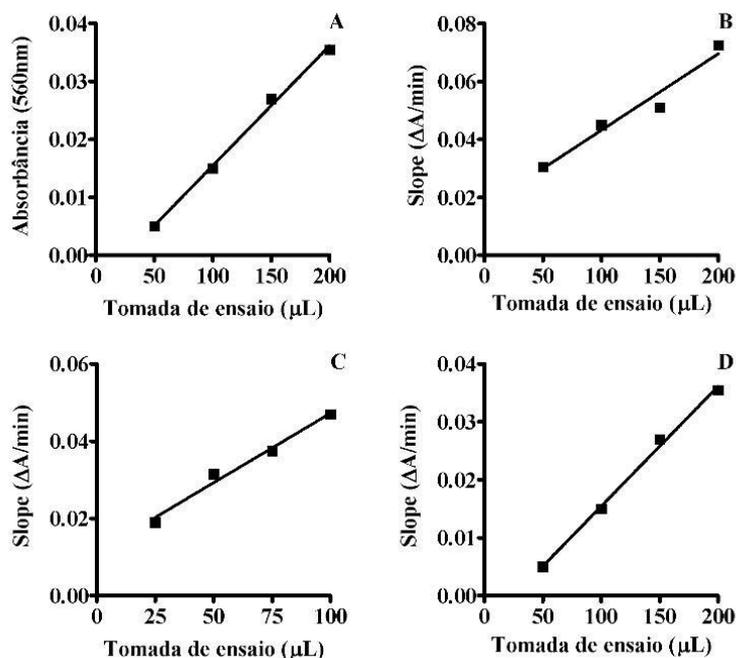


Figura 2 – Efeito do volume de extrato sobre a atividade final das enzimas superóxido dismutase (A), catalase (B), ascorbato peroxidase (C) e glutathiona redutase (D) em folhas de *N. minutum*. A inclinação (“slope”) das retas expressam a variação da absorbância em função do tempo de reação (atividade enzimática arbitrária).

O efeito do tempo de iluminação (concentração de $\cdot\text{O}_2^-$ no sistema de reação) sobre a atividade da SOD presente nos extratos encontra-se na figura 3A. A atividade da SOD se mostrou linear entre os tempos de 5 e 20 minutos. Para os estudos subsequentes, optou-se pelo tempo de 10 minutos. As atividades das enzimas CAT, APX e GR foram determinadas por métodos contínuos, como pode ser visto na figura 3. Para os cálculos das atividades enzimáticas foi utilizado o segmento linear da curva que corresponde ao início da reação.

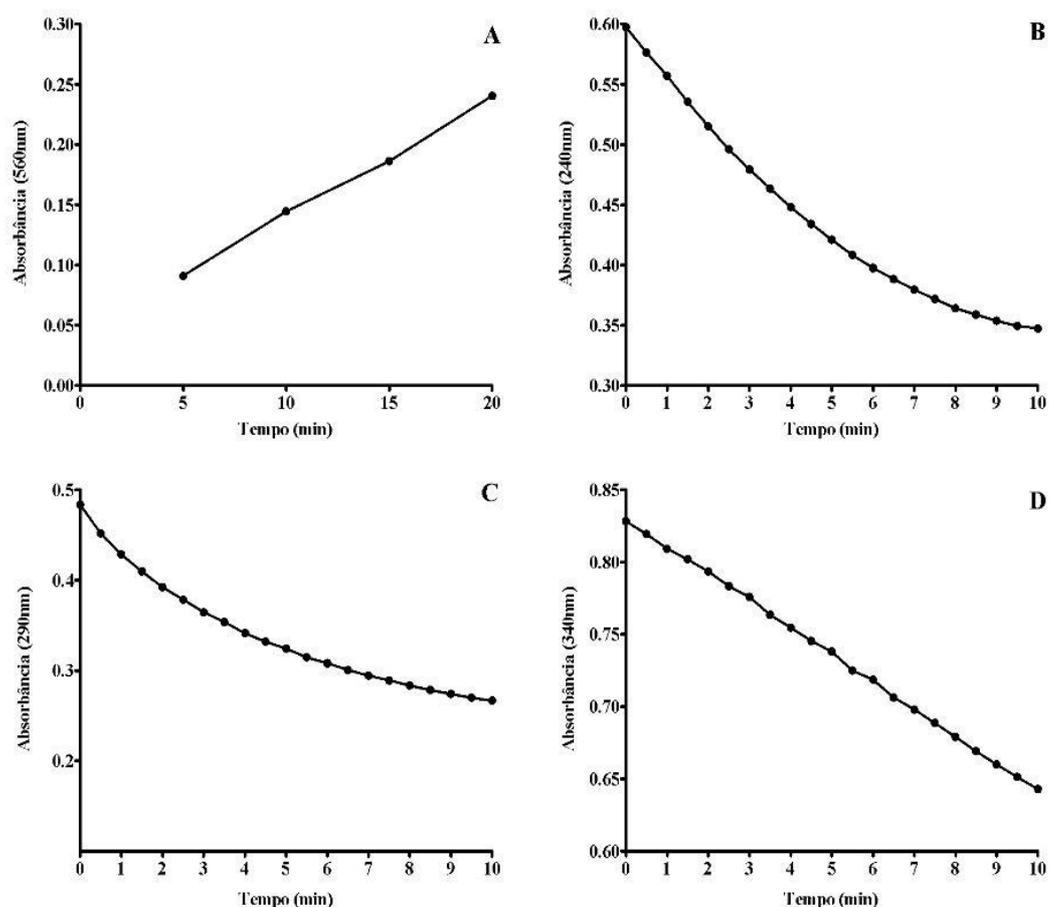


Figura 3 – Determinação da atividade superóxido dismutase por método fotoquímico (A). A atividade das enzimas catalase (B), ascorbato peroxidase (C) e glutathiona redutase (D) foram determinadas por métodos contínuos.

Enzima Nitrato Redutase (NR)

A padronização de análise da enzima NR seguiu o método de Jaworski (1971), modificado por Nievola & Mercier (2001). Foi utilizado o ensaio *in vivo* para a determinação da atividade dessa enzima, o qual foi escolhido por esta técnica ter sido utilizada amplamente para várias espécies vegetais, inclusive em bromélias (Nievola & Mercier 2001). Este método consiste na incubação de fragmentos de tecido vegetal em meio de ensaio, no escuro, sendo avaliada a taxa de difusão do nitrito para este meio. Para esta padronização, foram avaliados a concentração de propanol, do substrato nitrato e o tempo de incubação a 30 °C (Fig. 4). A figura 4A mostra maiores atividades enzimáticas utilizando-se 4% de propanol, sendo que o efeito deste reagente seria aumentar a permeabilidade celular ao nitrato do meio de incubação (Jaworski 1971), resultando em uma maior atividade da enzima. Já em relação a concentração de nitrato, que é o substrato desta enzima, e o tempo de incubação, foi verificado uma maior atividade a 100 mM após 1h30 de incubação a 30 °C (Fig. 4B e C). Portanto, para as análises dessa enzima foram utilizados 4% de propanol, 100 mM de nitrato e incubação por 1h30 a 30 °C.

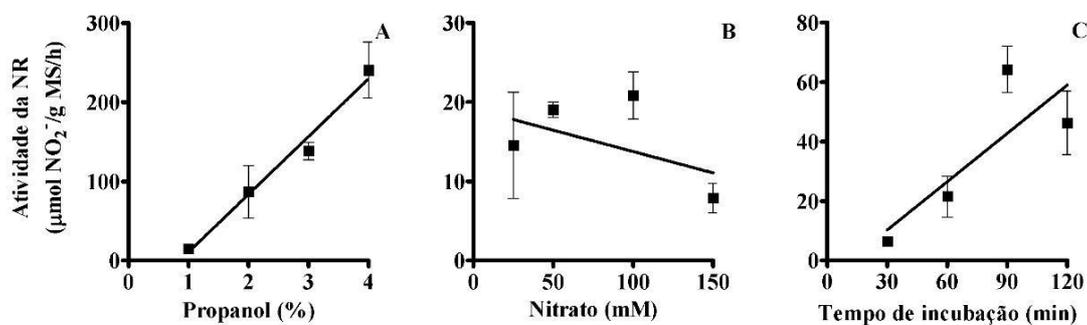


Figura 4 – Padronização das condições de ensaio *in vivo* da enzima nitrato redutase em folhas de *Nidularium minutum*. (A) Concentração de n-propanol, (B) concentração de nitrato e (C) tempo de incubação das amostras a 30 °C.

Pigmentos fotossintéticos

A determinação do conteúdo de pigmentos fotossintéticos foi otimizada em relação ao protocolo utilizado em estudos anteriores para essa espécie, de modo a utilizar-se a menor quantidade de material possível. Foi realizado um teste com o método de

Munné-Bosch & Lalueza (2007) para avaliar a sensibilidade do método de extração de pigmentos através da variação na quantidade de massa utilizada. Para isto, foram utilizadas massas de 50, 100 e 200 mg. Os cálculos do conteúdo de pigmentos foram realizados de acordo com as equações descritas em Lichtenthaler & Buschmann (2001). A figura 5 mostra que, ao variar o volume de extrato para a realização da leitura, foi observada alta linearidade em relação aos valores de absorvância obtidos para cada pigmento de acordo com a análise de regressão ($R^2 > 0,90$). Ao expressar o conteúdo de pigmentos por massa seca, não houve diferença estatística dentre as três quantidades de massa utilizadas ($p > 0,05$) (Fig. 6). Desta forma, é possível utilizar 50 mg de material vegetal para dosar o conteúdo de pigmentos fotossintéticos através do método de extração descrito, o que auxilia na redução de material vegetal necessário para as dosagens.

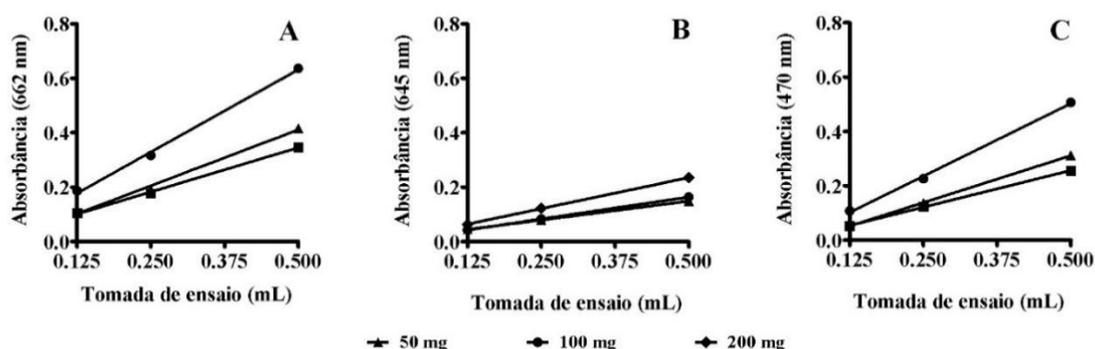


Figura 5 – Determinação do conteúdo de pigmentos fotossintéticos a partir de diferentes quantidades de massa e volume de extrato em folhas de *Nidularium minutum*. (A) Clorofila *a*, (B) clorofila *b* e (C) carotenoides.

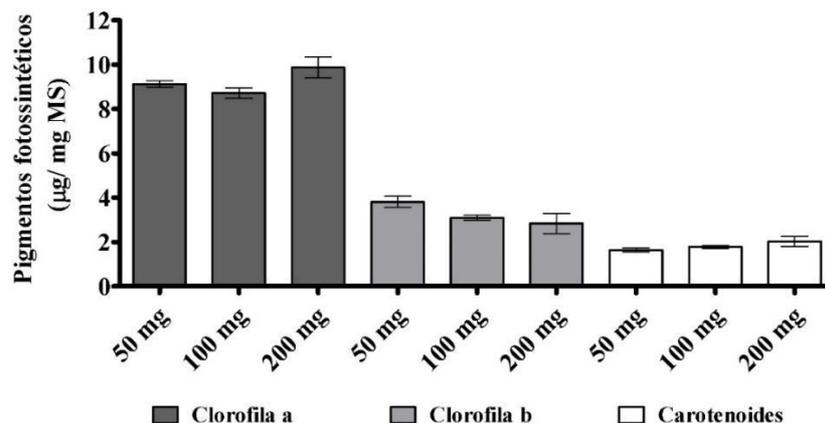


Figura 6 – Conteúdo de pigmentos por massa seca, considerando a quantidade de massa utilizada durante a extração para a análise em folhas de *Nidularium minutum*. (A) Clorofila *a*, (B) clorofila *b* e (C) carotenoides.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Balen, B., Tkalec, M., Pavoković, D., Pevalek-Kozlina, B. & Krsnik-Rasol, M.** 2009. Growth conditions in *in vitro* culture can induce oxidative stress in *Mammillaria gracilis* tissues. *Journal of Plant Growth Regulation* 28: 36–45.
- Beauchamp, C. & Fridovich, I.** 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44: 276–287.
- Jaworski, E.G.** 1971. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 43: 1274–1279.
- Jiang, Z.Y., Woollard, A.C.S. & Wolff, S.P.** 1991. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe^{2+} in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 26: 853–856.
- Lichtenthaler, H.K. & Buschmann, C.** 2001. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* F4.3.1-F4.3.8.
- Luck, H.** 1974. Catalases. *In*: H.U. Bregmeyer (ed.). *Methods of enzymatic analysis*, vol 2. Academic Press, New York.
- Munné-Bosch, S. & Lalueza, P.** 2007. Age-related changes in oxidative stress markers and abscisic acid levels in a drought-tolerant shrub, *Cistus clusii* grown under Mediterranean field conditions. *Planta* 225: 1039–1049.
- Nakano, Y. & Asada, K.** 1981. Hydrogen-peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach-chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22: 867–880.

- Nievola, C.C. & Mercier, H. 2001.** Variações diurnas da atividade *in vivo* da redutase do nitrato em abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merr. - Bromeliaceae). Revista Brasileira de Botânica 24: 295–301.
- Schaedle, M. & Bassham, J.A. 1977.** Chloroplast glutathione reductase. Plant Physiology 59: 1011–1012.
- Weng, X.Y., Zheng, C.J., Xu, H.X. & Sun, J.Y. 2007.** Characteristics of photosynthesis and functions of the water-water cycle in rice (*Oryza sativa*) leaves in response to potassium deficiency. Physiologia Plantarum 131: 614–621.