

LUCIANA MOLLO

Avaliação de fatores fisiológicos envolvidos na
adaptação à condição de déficit hídrico e alterações
de temperatura em plantas da bromélia rupícola
Alcantarea imperialis (Carrière) Harms cultivadas *in*
vitro

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

SÃO PAULO

2017

LUCIANA MOLLO

Avaliação de fatores fisiológicos envolvidos na
adaptação à condição de déficit hídrico e alterações
de temperatura em plantas da bromélia rupícola
Alcantarea imperialis (Carrière) Harms cultivadas *in*
vitro

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

ORIENTADORA: DRA. CATARINA CARVALHO NIEVOLA

CO-ORIENTADORA: DRA. ADRIANA HISSAE HAYASHI

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

Mollo, Luciana

M837a Avaliação de fatores fisiológicos envolvidos na adaptação à condição de déficit hídrico e alterações de temperatura em plantas da bromélia rupícola *Alcantarea imperiallis* (Carrière) Harms cultivadas *in vitro* / Luciana Mollo -- São Paulo, 2017.
118p. il.

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

1. CAM. 2. Osmoproteção. 3. Carboidrato. I. Título.

CDU: 582.564

Aos meus pais, João e Teresa

(in memorian)

pela dedicação de toda uma vida e pelo orgulho
com que acompanharam meus passos, meus
irmãos Mario e Flávia, por todo o incentivo e
minha filha amada **Isabella**, minha grande
companheira de todos os momentos...

Dedico

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

Martin Luther King

Agradecimentos

Ao Instituto de Botânica por ter me dado a oportunidade de conviver com profissionais e pessoas especiais que só contribuíram para a minha formação.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica.

Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa de doutorado concedida.

À Dra Catarina Carvalho Nievola, minha orientadora, que ofereceu seu apoio, investindo seu tempo e paciência na minha formação, por ter me adotado sem questionamentos e ter oferecido sua amizade, dedicação e orientação me conduzindo pelos caminhos da fisiologia vegetal. Você é brilhante!

À minha co-orientadora Dra. Adriana Hissae Hayashi por todo o acompanhamento e zelo pelo trabalho e orientação pelos bons momentos.

À eterna orientadora, amada e amiga Dra. Maria das Graças Lapa Wanderley, por ter feito com que eu me apaixonasse pelo mundo da pesquisa e pelas Bromélias.

Aos meus pais, João e Teresa, que já não estão entre nós, mas me deixaram uma herança de retidão de caráter, de perseverança, por me mostrarem a importância do estudo, a importância da cultura, por serem pessoas de caráter primoroso por terem me dado uma família maravilhosa, mostrando que o amor é o valor maior da vida e por acreditarem no meu sonho de ser “cientista”. Ao meu pai amado, que me deixou recentemente, que permaneceu ao meu lado todos os dias lendo meu trabalho, ouvindo minhas queixas, presenciando meu cansaço e sempre me incentivando a prosseguir.

Aos meus irmãos Mário e Flávia e meus cunhados, Sônia e René, meu sobrinho Arthur, pelo apoio e companheirismo.

À minha filha querida, Isabella, que nunca me abandonou e esteve sempre ao meu lado me incentivando, ajudando e até dando conselhos. Que hoje segue meus passos pelos caminhos da ciência e me enche de orgulho por ser essa pessoa tão especial e pelo grande amor que sempre me dedicou. Nenhum outro bem na vida é maior que sua amizade e amor. Você é meu porto seguro!

A Dra. Vívian Tamaki, Dr. Shoey Kanashiro, Dr. Armando, Dr. Clovis e Dr. Francismar pela amizade e companheirismo durante toda a minha estada no Núcleo de

Pesquisa em Plantas Ornamentais do IBt, pelas palavras de incentivo e participação na minha formação.

Ao Ivomar e Jorge, por toda a colaboração e pela convivência sempre agradável.

Aos queridos amigos que ganhei de Deus nesse percurso, Daniela, Flávia, Camila, Priscila, Sabrina, Victoria, Fernanda, Pâmela, Danilo, Luana, por terem me ajudado, ensinado, ou apenas pelos bons momentos, pelos momentos de estresse, pelos almoços, conversas e risadas.

Às novas filhas que ganhei nesta caminhada, minhas amadas “estagiárias” Adriana Jorge e Gabriela Cabral... muito orgulho de vocês!!! Obrigada pela companhia, pelo empenho, pelas risadas, pelas coletas 24 horas... por tudo!!! Vocês são demais...

À Dra. Helenice Mercier que me abriu as portas do Laboratório de Fisiologia Vegetal do Instituto de Biociências da USP e engrandeceu muito meu trabalho.

Ao grande presente que foi ter ganhado sua amizade, Paulinha que me ajudou no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Instituto de Biociências da USP, me ensinou e continua me ensinando muito, por ter uma alma pura e ser muito especial. Você é um exemplo de pessoa e profissional.

Aos inúmeros amigos que fiz durante todo o período de Botânico.

Aos meus colegas de trabalho da EE Dr. Baeta Neves e Colégio Singular por todo o apoio que me deram neste período e, principalmente, aos meus alunos que de alguma forma sempre perguntavam sobre meus trabalhos de pesquisa. Adoro todos vocês!

A Deus, por ter tornado o meu sonho realidade.

A todos, que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.



Alcantarea imperialis em inselbergue da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro (L.Mollo)

RESUMO

As espécies de plantas do ambiente rupícola são adaptadas às variações de temperatura e à baixa disponibilidade hídrica, como é o caso da espécie ornamental *Alcantarea imperialis* conhecida como bromélia imperial, oriunda da Serra dos Órgãos (RJ). Cresce sobre afloramentos rochosos (inselbergues), solos rasos e pedregosos, sendo exposta a alternância de temperatura que pode variar de 5 a 40 °C em um único dia, situação que pode estar associada ou não a episódios de escassez de água. Tem sido considerado que a sobrevivência das plantas nativas desse ambiente está relacionada à ativação de mecanismos fisiológicos como, por exemplo, a produção de carboidratos para a osmoproteção e também a indução da via fotossintética CAM. Contudo, análises em plantas adultas de *A. imperialis* mostraram que realizam metabolismo C₃, embora apresentassem características anatômicas semelhantes às plantas CAM. É possível supor que em condições que associem a falta de água ao termoperíodo essa espécie apresente o metabolismo CAM, sobretudo nas fases iniciais de desenvolvimento, quando não apresentam folhas que permitam o acúmulo de água, formando o tanque. O objetivo deste trabalho é identificar se há presença desse metabolismo em plantas jovens de *A. imperialis* mantidas sob reduzida disponibilidade hídrica associada ou não ao termoperíodo. Adicionalmente foram realizadas análises anatômicas e avaliados o conteúdo de carboidratos de modo a identificar outras características morfológicas e funcionais dessas plantas que permitam a sobrevivência na condição imposta. Foi analisado o conteúdo relativo de água nos tecidos vegetais, pigmentos fotossintéticos, produção de carboidratos solúveis, a atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC), conteúdo de ácidos orgânicos e anatomia das folhas de plantas de *A. imperialis* cultivadas *in vitro* sob condições de termoperíodo (30 °C claro/ 15 °C escuro), sendo

comparadas a outro lote de plantas mantidas a 25 °C constantes. Aos dois lotes foi adicionado Polietilenoglicol – 6000 (PEG 6000) de modo a simular os efeitos da falta de água do ambiente (-1,9 MPa e -8,5 MPa), constituindo tratamentos independentes. As plantas foram obtidas através da germinação de sementes em meio de cultura de Murashigue & Skoog (1962) com concentração de macronutrientes reduzida a metade, 30 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de Agar. Após 6 meses, as plantas foram transferidas para o mesmo meio, sem Agar e com PEG em concentrações de 7,5% (-1,9 MPa) e 45% (-8,5 MPa) além de outro lote de plantas mantido sem PEG (-0,5 MPa). As plantas foram coletadas para as análises, em períodos que variaram entre 7, 15 e 30 dias após a transferência para os tratamentos. Os resultados demonstraram que esta espécie pode apresentar o metabolismo CAM em temperatura constante de 25 °C e submetida à falta de água (-8,5 MPa). Contudo, nos tratamentos que se associou a falta de água ao termoperíodo, esse metabolismo foi induzido mesmo sob estresse moderado (-1,9 MPa). As análises anatômicas apontam para o parênquima aquífero como importante no armazenamento de água, visto que essa bromélia manteve seu conteúdo hídrico mesmo em todas as situações de estresse. O aumento de carboidratos solúveis esteve relacionado tanto à falta de água como ao termoperíodo, confirmando o papel osmoprotetor dessas substâncias para essa espécie de bromélia, identificado em estudo anterior. Este estudo contribui para identificar a plasticidade de CAM relacionada à temperatura e falta de água, revelando a importância deste mecanismo fisiológico para a resistência de uma bromélia rupícola às alterações ambientais.

Palavras-chave: disponibilidade hídrica, termoperíodo, CAM, osmoproteção, parênquima aquífero.

ABSTRACT

The plant species from rupicolous environment are adapted to the variations of temperature and the low water availability, as is the case of the ornamental species *Alcantarea imperialis* known as imperial bromeliad, originated from Serra dos Órgãos (RJ). They grow on rocky outcrops (inselbergs), shallow and stony soils, being exposed to temperature alternation that can range from 5 to 40 °C in a single day, a situation that may or may not be associated with episodes of scarcity of water. It has been considered that the survival of the native plants of this environment is related to the activation of physiological mechanisms such as the production of carbohydrates for osmoprotection and also the induction of CAM photosynthetic pathway. However, analyses in adult plants of *A. imperialis* showed C3 metabolism, although they presented anatomical characteristics similar to CAM plants. It is possible to suppose that in conditions that associate the lack of water to the thermoperiod this species presents the CAM metabolism, especially in the early stages of development, when they do not present leaves that allow the accumulation of water, forming the tank. This paper aims to identify if occurs this metabolism in young plants of *A. imperialis* kept under reduced water availability, associated or not to the thermoperiod. In addition, anatomical analyses and carbohydrate content were evaluated in order to identify other morphological and functional characteristics of these plants that allow their survival in the required condition. The relative content of water in plant tissues was analysed, as well as photosynthetic pigments, soluble carbohydrate production, phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) enzyme activity, organic acid content and the anatomy of leaf of the *A. imperialis* cultivated *in vitro* under thermoperiod conditions (30 °C light / 15 °C dark), being compared to another batch of plants kept at constant 25 °C. Polyethylene

glycol-6000 (PEG 6000) was added to both batches in order to simulate the effects of the lack of water of the environment (-1.9 MPa and -8.5 MPa), constituting independent treatments. The plants were obtained by seed germination inside Murashigue & Skoog (1962) culture medium with a concentration of macronutrients reduced to half, 30 g L⁻¹ sucrose and 7 g L⁻¹ agar. After 6 months, the plants were transferred to the same medium, without agar and with PEG at concentrations of 7.5% (-1.9 MPa) and 45% (-8.5 MPa) plus another batch of plants kept without PEG (-0.5 MPa). The plants were collected for the analyses, in periods that varied between 7, 15 and 30 days after the transference to the treatments. The results demonstrated that this species can present CAM metabolism at constant temperature of 25 °C and submitted to lack of water (-8.5 MPa). However, in the treatments that associated the lack of water to the thermoperiod, this metabolism was induced even under moderate stress (-1.9 MPa). The anatomical analyses pointed to the aquiferous parenchyma as important in water storage, since this bromeliad maintained its water content in every stress situation. The increase of soluble carbohydrates was related either to lack of water or to the thermoperiod, confirming the osmoprotective role of these substances for this bromeliad species identified in a previous study. This study contributes to identify the plasticity of CAM related to temperature and lack of water, revealing the importance of this physiological mechanism for the resistance to environmental changes of a bromeliad rupicolous.

Key words: water availability, thermoperiod, CAM, osmoprotection, aquiferous parenchyma.

SUMÁRIO

Introdução Geral.....	1
Objetivos	15
Estrutura da tese	16
Referências bibliográficas.....	18
Capítulo 1	26
Introduction	28
Materials and methods	31
Results	36
Discussion	45
References	48
Capítulo 2	57
Introdução	59
Material e métodos	65
Resultados	71
Discussão	81
Referências bibliográficas	87
Considerações finais e perspectivas	93
Referências bibliográficas.....	100
Anexos	103

Introdução Geral

Bromélias no inselbergue

Bromeliaceae é uma família de distribuição neotropical, ocorrendo desde o estado da Virgínia até o Texas, nos EUA, por toda a América Central e América do Sul, sendo citada apenas uma espécie para a costa leste africana, *Pitcairnia feliciana* (A. Chevalier) Harms & Mildbraed. É representada por cerca de 58 gêneros e 3200 espécies (Versieux & Wanderley 2015), subdividida nas subfamílias Bromelioideae, Puyoideae, Pitcairnioideae, Navioideae, Hectioideae, Tillandsioideae, Lindmanioideae, Brocchinioideae (Givnish *et al.* 2011) que apresentam uma enorme biodiversidade e podem ser encontradas em todos os tipos de vegetação, desde ambientes mesofíticos até xéricos (Smith & Downs 1974, Benzing 2000).

No Brasil, ocorrem cerca de 40% das espécies e 73% dos gêneros, sendo que destes, 80% são encontrados na Mata Atlântica (Leme & Marigo 1993) desde o nível do mar até altitudes bastante elevadas. É uma família caracterizada por apresentar espécies epífitas, terrícolas, rupícolas ou saxícolas, sendo que a maior parte de seus representantes possui folhas alterno-espíraladas cujas bainhas imbricadas formam uma roseta (Versieux & Wanderley 2015) ao redor do caule geralmente curto, na qual podem armazenar água da chuva (Figura 1a). Essa sobreposição de bainhas recebe nomes de tanque ou fitotelma (Benzing 2000). A superfície foliar é recoberta por tricomas especializados (escamas foliares) e as margens podem ser inteiras, serrilhadas ou espinescentes, com bainhas geralmente alargadas. As inflorescências são geralmente racemosas, simples ou ramificadas. O escapo pode ser longo até quase sésil, sendo frequentemente cobertas por brácteas foliáceas ou coloridas. As flores são geralmente vistosas (Cronquist 1981, Dahlgren *et al.* 1985), contrastando com as brácteas e os

frutos do tipo cápsula ou bagas com sementes que podem ou não ser apendiculadas (Smith & Downs 1974).

Diversos representantes dessa família vivem em condições consideradas estressantes, sobre rochas, como as existentes em afloramentos rochosos ou como epífitas no dossel de árvores, podendo estar expostas a temperaturas extremas, seca, sol intenso e escassez de nutrientes (Benzing 2000). A ocorrência e adaptação das espécies dessas famílias a diferentes ambientes têm revelado a presença de diversas estratégias metabólicas, incluindo o ajuste osmótico e o Metabolismo Ácido das Crassuláceas (CAM) (Nievola *et al.* 2001, Freschi *et al.* 2007, Castillo *et al.* 2016).

Dentre as espécies rupícolas, há a bromélia *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, pertencente à subfamília Tillandsioideae (Figura 1b, c). Essa espécie é nativa da Serra dos Órgãos (RJ), área com ecossistemas de Floresta Tropical e Campos de Altitude (Leme & Marigo 1993), região que apresenta grande amplitude térmica, e acima de 800 metros possui clima mesotérmico brando, com temperaturas médias de 19 °C, que podem oscilar entre 40 °C (dia) e 5 °C (noite) em um único dia. É uma espécie heliófila, que ocorre entre 800 – 1800 metros acima do nível do mar em afloramentos rochosos de grandes inclinações e em platôs nos campos de altitude (Martinelli 1997).

Esta espécie pode atingir de 3 a 5 m de altura, com folhas dispostas em roseta vistosa de aproximadamente 1,5 m de diâmetro, que permitem que água e nutrientes acumulem-se entre suas folhas, formando um tanque. Tem um ciclo de vida longo, podendo atingir a maturidade em até 40 anos (Versieux & Wanderley 2015). A inflorescência projeta-se, excedendo as folhas, com numerosas flores alvas contrastantes com as brácteas vermelhas (Figura 1c). Apresenta hábito saxícola ou rupícola, crescendo naturalmente sobre rochas ou solos rasos e pedregosos (Figura 1b, d), sendo exposta a alta luminosidade, a escassez de água, pouca disponibilidade de substrato e as

acentuadas variações térmicas (Versieux & Wanderley 2015). É conhecida popularmente como bromélia imperial, uma espécie de grande valor ornamental e, por isso, muito utilizada em projetos de paisagismo e jardinagem (Figura 1c), sendo pela força do extrativismo considerada uma espécie em perigo de extinção, segundo o Programa de Proteção das Espécies Ameaçadas de Extinção da Mata Atlântica Brasileira, da Fundação Biodiversitas, pela avaliação no "Workshop de revisão da lista da Flora Brasileira ameaçada de extinção" de junho de 2005 (Em: <http://www.biodiversitas.org.br/ florabr/ lista_florabr.pdf>. acesso em: 20 de janeiro de 2017)

O ambiente natural da bromélia imperial recebe o nome de inselbergue (Versieux & Wanderley 2015). Esse termo foi introduzido em 1900 pelo geólogo Bornhardt para designar afloramentos rochosos de granitos e gnaisses de origem pré-cambriana (Burke 2002). Inselbergues são montanhas ou grupos de montanhas monolíticas solitárias que emergem acima das planícies que os cercam (Porembski *et al.* 1997, Burke 2002, Porembski 2007).

Os afloramentos rochosos são frequentes na paisagem da região sudeste do Brasil (Porembski *et al.* 1998) e abrigam uma vegetação bastante peculiar (Porembski & Barthlott 2000), podendo comportar floras muito distintas das encontradas na vegetação de seu entorno. Representam uma barreira para muitas espécies, devido à baixa retenção de água e nutrientes, além da dificuldade de fixação de raízes, de sementes e propágulos e a grande exposição aos ventos, à luminosidade e ao calor, em comparação com áreas vizinhas (Larson *et al.* 2000).

As espécies que ocorrem nessas áreas apresentam uma série de características que permitem sua sobrevivência neste ambiente com alta insolação e grande oscilação de temperatura entre o dia e a noite (Porembski *et al.* 1998), e tais condições têm sido fundamentais para a seleção das espécies que aí crescem (Kluge & Brulfert 2000). Na

América do Sul ocorrem principalmente os representantes de Cactaceae, Orchidaceae, Euphorbiaceae, Cyperaceae, Poaceae, Commelinaceae, Fabaceae e Bromeliaceae (Porembski 2007), incluindo a maioria das espécies do gênero *Alcantarea* (Versieux & Wanderley 2015). Vários autores relatam adaptações das espécies dessas famílias a diferentes ambientes e isso tem revelado a presença de estratégias metabólicas variadas, como dito anteriormente, incluindo o Metabolismo Ácido das Crassuláceas (CAM) (Nievola *et al.* 2001, Freschi *et al.* 2007, 2010b, Ribeiro *et al.* 2007).

Há de se considerar que a formação de grandes populações de uma espécie está associada ao sucesso no estabelecimento das plantas jovens (Zotz *et al.* 2011). Em relação às fases de desenvolvimento, no caso das bromélias, é comum a ocorrência de heteroblastia que se refere a uma forma de desenvolvimento da planta, na qual são observadas diferenças substanciais entre as fases juvenis e adultas (Figura 1d e b, respectivamente). Esse termo difere da homoblastia, na qual ocorrem diferenças pequenas e graduais entre as fases de crescimento dos vegetais (Goebel 1898, 1913).

Segundo Zotz *et al.* (2011), a heteroblastia é muito comum em bromélias da subfamília Tillandsioideae, e nessas plantas há uma mudança abrupta das plantas juvenis, com características morfológicas de atmosféricas, isto é, plantas que possuem rosetas não depositárias, com folhas lineares e coberta por tricomas foliares (não armazenam água em tanque) (Figura 1d) para as adultas, maiores, com folhas largas que se sobrepõem formando o tanque para armazenar água, como é o caso de *A. imperialis* (Figura 1a). Segundo Zotz & Thomas (1999) a estratégia juvenil, tolerante à seca muda para a forma de tanque nas adultas, para prevenção à seca.

Porembski (2007) relata que as condições dos inselbergues, onde habita a bromélia imperial, são consideradas severas quanto à disponibilidade hídrica e à ocorrência de variações térmicas durante o mesmo dia. Esse autor comenta que essas

condições abióticas são fatores determinantes na adaptação das espécies encontradas nesses locais. Barbará *et al.* (2009) apontam como sendo frequente a presença de espécies CAM nos inselbergues. Contudo, não foram encontrados relatos que mostrem se o CAM está presente dentre os mecanismos fisiológicos que garantam a adaptação de plantas jovens da bromélia imperial em relação às variações na disponibilidade hídrica associada ou não às variações na temperatura.

Adaptações ao déficit hídrico e alterações de temperatura: ocorrência de CAM

Estresses abióticos podem afetar direta ou indiretamente o estado fisiológico de um organismo, alterando seu metabolismo, crescimento e desenvolvimento (Garg *et al.* 2002). Sendo assim, as plantas têm desenvolvido uma série de processos fisiológicos para superar os danos causados por condições ambientais adversas (Klerk & Pumisetaporn 2008). Dentre eles, é possível citar o Metabolismo Ácido das Crassuláceas (CAM) que é um mecanismo fotossintético concentrador de CO₂, selecionado possivelmente em resposta à aridez de ambientes terrestres e à limitação na disponibilidade de CO₂ em ambientes aquáticos (Keeley 1998).

As plantas CAM se caracterizam pela fixação maciça de CO₂ no período noturno pela ação da enzima citossólica Fosfoenolpiruvato Carboxilase (PEPC), que também realiza funções anapleróticas. O CO₂ fixado é acumulado nos vacúolos na forma de ácido de quatro carbonos, o malato, contribuindo para a acidez celular. Durante o dia, os estômatos se fecham, e o CO₂ é fornecido para o ciclo C₃ por meio da descarboxilação do malato. Durante a noite o amido produzido e acumulado é hidrolisado para a produção de PEP, acumulando-se de dia como produto da fotossíntese e da descarboxilação do malato (Cushman & Borland 2002). Como a fixação do CO₂

atmosférico pela PEPC nas plantas CAM se processa à noite, enquanto a fixação de CO₂ pelo ciclo C₃ ocorre durante o dia, há o aumento da eficiência do uso de água, pois a fixação noturna de CO₂ tem como resultado a diminuição da perda de água uma vez que a diferença de pressão de vapor da água entre as folhas e a atmosfera atinge valores mínimos durante a noite (Cushman & Borland 2002). Por isso o CAM é considerado um mecanismo de tolerância à baixa disponibilidade de água (Osmond & Holtum 1981). Devido à variação no teor de acidez e da atividade da enzima PEPC durante o período de 24 horas, a análise desses fatores é utilizada como parâmetro importante para identificar o metabolismo CAM ocorrente em muitas espécies vegetais, dentre elas *Clusia minor* (Haag-Kerwer *et al.* 1992), *Kalanchoe fedtschenkoi* (Nimmo 2000), e em bromélias como *Tillandsia pohliana* (Tamaki & Mercier 1997) e *Ananas comosus* (Nievola *et al.* 2005). Entretanto, há de se considerar que espécies C₃ também apresentam atividade da PEPC, contudo, não há variação dessa enzima durante o dia e noite, neste caso, apresenta uma função anaplerótica, que é a de abastecimento do Ciclo de Krebs. De todo modo, a diferença de atividade dia/noite é utilizada para identificar CAM (Pozos *et al.* 2007).

Algumas plantas são CAM obrigatórias, apresentando sempre esse mecanismo, enquanto outras, como *Ananas comosus*, *Agave sisalina* e outras espécies de Bromeliaceae e Orchidaceae desenvolvem-se com a via C₃, porém sob estímulo de falta d'água, salinidade, fotoperíodo ou termoperíodo, passam a apresentar o comportamento CAM (Lüttge *et al.* 1996). O exemplo mais estudado de plantas C₃/CAM é *Mesembryanthemum crystallinum*, nativa do deserto da Namíbia e amplamente distribuída em regiões sazonalmente áridas de todo o mundo (Cushman & Borland 2002). Tem sido identificada a presença de metabolismo CAM e C₃, além da ocorrência de C₃/CAM em espécies de bromélias (Martin 1994). Cushman & Borland (2002) citam

que em plantas C₃-CAM facultativas, a limitação hídrica pode intensificar a expressão do CAM, como observado em *Guzmania monostachia*, uma bromélia tanque epífita sujeita a grandes variações ambientais diárias, como quantidade de água e luz (Freschi *et al.* 2007). Esses autores verificaram que esta espécie tem a capacidade de alterar o tipo de fotossíntese de C₃ para CAM quando submetida ao estresse hídrico por falta de água.

Na natureza, a limitação de água geralmente não ocorre isoladamente de outras mudanças ambientais, como elevada energia luminosa e grande amplitude térmica, que tendem a ampliar os efeitos da limitação de água na indução do CAM (Lüttge 2000). Como esta indução requer mobilização de recursos, tanto na maquinaria enzimática quanto em carboidratos para as reações de escuro, a expressão do CAM é geralmente máxima quando a intensidade luminosa não é limitante para a fotossíntese (Cushman & Borland 2002).

De acordo com Dodd *et al.* (2002), há uma expressiva plasticidade genotípica e fenotípica nos padrões de expressão de CAM e essas variações são mediadas em parte por fatores ambientais. O metabolismo CAM tem se constituído uma alternativa metabólica ecologicamente favorável para a sobrevivência de plantas em zonas áridas, não representando um impedimento para o crescimento dos vegetais em locais úmidos de baixa temperatura (Medina 1974). Deve-se considerar que o déficit hídrico não ocorre apenas durante a seca, mas também durante condições de temperaturas baixas com alteração do potencial osmótico da membrana plasmática (Reddy *et al.* 2004). Segundo Ting (1985), a maioria das plantas CAM é encontrada em locais onde ocorrem altas temperaturas diurnas e baixas temperaturas noturnas (como é o caso do ambiente dos inselbergues). Devido a isso, não basta associar o metabolismo CAM à falta de água quando se objetiva identificar a adaptação dos vegetais ao ambiente rupícola. Investigar

o possível efeito das variações térmicas pode ser fundamental para aprofundar essa avaliação. Essa abordagem conjunta não foi encontrada para *Alcantarea imperialis*.

A identificação de CAM em bromélias tem sido verificada por meio de avaliações em plantas cultivadas *in vitro*. Essa condição experimental pode contribuir para melhor controle de fatores como luz, fornecimento de nutrientes e temperatura (Nievola *et al.* 2005, Freschi *et al.* 2007, 2010b). Nievola *et al.* (2005) reportaram que plantas de *Ananas comosus* clonadas e cultivadas *in vitro* apresentavam diminuição no crescimento quando mantidas sob termoperíodos (28 °C claro/15 °C escuro) e maior atividade da PEPC noturna em relação àquelas mantidas a 28 °C constantes, ambas sob fotoperíodo de 12 horas. Esses autores relacionaram esses dados à ocorrências de CAM e C₃, dependendo da temperatura a que as plantas foram expostas. Vale ressaltar que até então, plantas de abacaxizeiro eram consideradas, pela maioria dos autores, obrigatoriamente CAM, ou seja, não apresentavam o metabolismo C₃, independente da situação ambiental ser mais favorável, apontando para a necessidade de aprofundamento dos estudos sobre a modulação da fotossíntese nesse grupo de plantas.

Segundo Crayn *et al.* (2004), as espécies podem ser classificadas como CAM ou C₃ também utilizando o método do Carbono 13 (¹³C), de modo que os valores até -20.0‰ indicam plantas CAM e abaixo de -20.0‰ indicam plantas C₃. Considerando-se esta taxa de isótopos de carbono para uma lista de 1.873 espécies de Bromeliaceae, *Alcantarea imperialis* aparece com a taxa de -24,3‰, indicando ser uma espécie C₃ (Crayn *et al.* 2000). Contudo, não foi encontrado relato sobre a avaliação da acidez titulável nessa espécie, a variação de PEPC ou de ácidos orgânicos, que são considerados importantes parâmetros para identificação de CAM em bromélias. Sendo assim, seria possível supor que em condições de déficit hídrico severo ou de alternância de temperatura, típicos do inselbergue, essa espécie pudesse vir a realizar a fixação do

carbono via PEPC de CAM (Ceusters *et al.* 2010, O’Leary *et al.* 2011, Pereira *et al.* 2013) e ser considerada uma espécie CAM facultativa, ou seja, que apresenta CAM somente na presença de estresses severos ou conjuntos. Análises bioquímicas para identificação desse metabolismo são difíceis de serem realizadas no ambiente natural rochoso. Portanto, o cultivo em condições de laboratório pode ser adequado de modo a simular certas características do ambiente natural da espécie.

Segundo Nelson *et al.* (2005), em geral, plantas CAM se caracterizam por apresentarem folhas espessas e células maiores do que as folhas de plantas C_3 e C_4 . Nievola *et al.* (2005) identificaram diferenças na anatomia das folhas de abacaxizeiro CAM e C_3 , apontando para a importância do estudo anatômico na avaliação da ocorrência de CAM. Folhas das plantas submetidas ao termoperíodo de 28 °C claro/15 °C escuro (indutor de CAM) eram menores, mais espessas e com maior quantidade de parênquima clorofiliano e hipoderme do que as folhas das plantas com 28 °C constantes e fotoperíodo de 12 horas, consideradas C_3 . Heuduk *et al.* (2016) estudaram *Yucca aloifolia* (CAM), *Yucca filamentosa* (C_3) e *Yucca gloriosa* (híbrido) cultivadas em mesmas condições e verificaram diferenças significativas na anatomia foliar de cada espécie na suculência, número de estômatos, tamanho de células, sendo *Yucca gloriosa* de características intermediárias.

De acordo com Kerbaui *et al.* (2012), em orquídeas o metabolismo CAM parece estar associado à suculência, cujas folhas apresentam parênquima clorofiliano mais espesso, que pode ser uma característica importante para aumentar a capacidade de armazenamento de ácidos orgânicos. Em folhas de *Cattleya walkeriana*, uma espécie de orquídea CAM, Rodrigues *et al.* (2013) constataram que a espessura do mesofilo está diretamente relacionada com o metabolismo CAM induzido pela seca. De acordo com estes autores, a folha desta espécie apresentou suculência devido a maior quantidade de

parênquima clorofiliano do que as folhas não suculentas de *Oncidium* 'Aloha' (C₃). Aoyama (2010) verificou, por meio de estudos fisiológicos, que plantas cultivadas *in vitro* de *Alcantarea imperialis* apresentavam suculência foliar e as análises anatômicas demonstraram que o parênquima clorofiliano localizava-se entre o parênquima aquífero presente em ambas as faces da folha jovem. Por outro lado, nas folhas das plantas adultas provenientes da casa de vegetação, o parênquima clorofiliano estava presente ao redor dos canais de aeração e em contato com as células braciformes. Contudo, a relação entre os caracteres anatômicos (parênquimas clorofiliano e aquífero) e a situação de déficit hídrico associado à alternância de temperatura não tinha ainda sido investigada para a bromélia imperial com a intenção de verificar a ocorrência de CAM.

Além da presença de CAM associado às características anatômicas, a sobrevivência a estresses climáticos, como verões quentes e secos ou invernos frios e a salinidade, pode estar relacionada ao acúmulo de açúcares e outros solutos compatíveis que servem como osmoprotetores e, em alguns casos, estabilizam as biomoléculas sob condições de estresse, como compostos de baixo peso molecular como a trealose (Garg *et al.* 2002, Klerk & Pumisutapon 2008). A trealose é um dissacarídeo não redutor de glicose que funciona como um soluto compatível na estabilização das estruturas biológicas sob estresse abiótico em bactérias, fungos e invertebrados (Garg *et al.* 2002). Glicose, frutose e sacarose também são açúcares citados como protetores contra estresses abióticos, agindo como osmoprotetores e/ou conferindo tolerância contra o frio (Renaut *et al.* 2005, Gupta & Kaur 2005, Yamazaki *et al.* 2009).

Segundo Fernandez *et al.* (2010), soluto-compatíveis são moléculas não tóxicas, capazes de serem acumuladas em altas concentrações no citoplasma. Elas participam da manutenção do turgor e da proteção celular. Em muitos organismos, a trealose foi descrita como melhor estabilizador do que outros açúcares por proteger membranas e

biomoléculas. Dois mecanismos adicionais indicam que a trealose é um apropriado estabilizador de membranas e moléculas: reabastecimento de água, estabelecendo pontes de hidrogênio com a membrana ou macromoléculas durante a desidratação ou congelamento, e formação de um estado “vítreo” (trelose é o único açúcar capaz de se manter neste estado e prevenir a desnaturação de biomoléculas durante a desidratação, permitindo que sua atividade funcional seja retomada quando reidratada). Essas funções poderiam estar relacionadas à tolerância tanto à falta de água como às fortes alterações térmicas entre dia e noite. De fato, a função precisa da trelose ainda não está clara. Contudo, Fernandez *et al.* (2010) indicam que tem função protetora durante estresses abióticos como a falta de água ou proteção ao frio. Níveis maiores de trelose e outros carboidratos foram detectados nos tecidos de plantas da bromélia imperial cultivadas em temperaturas alternadas (15 °C escuro/30 °C claro) e 15 °C constantes quando comparados com o lote de plantas mantido a 30 °C constantes, mostrando a influência dessas substâncias na proteção ao frio para essa espécie (Mollo *et al.* 2011).

***Alcantarea imperialis*: modelo para o estudo**

Estudos têm sido realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais do Instituto de Botânica de São Paulo, utilizando plantas obtidas a partir da germinação de sementes de *A. imperialis* cultivadas *in vitro* (Figuras 1d, e, f). A otimização da produção dessa espécie de bromélia foi estabelecida por Aoyama *et al.* (2012). A investigação das respostas de *A. imperialis* aos fatores de estresse foi relatada por Oliveira *et al.* (2009) que mostram que plantas cultivadas *in vitro* por 12 meses e, após este tempo, submetidas a estresse hídrico severo por 24 dias, não pereceram, apresentando apenas algumas folhas mortas após este período, o que indica adaptação à falta de água. Adicionalmente, Mollo *et al.*

(2011) verificaram que *A. imperialis* cultivadas *in vitro* a 15 °C ou em termoperíodo (30 °C claro/15 °C escuro) não sofreram redução na porcentagem de germinação das sementes e tiveram crescimento reduzido sem que isso alterasse a morfologia em relação as plantas que ocorrem na natureza. Ainda segundo Mollo *et al.* (2011), *A. imperialis* submetidas a temperaturas baixas apresentam alteração em seu metabolismo de carboidratos passando a produzir maiores quantidades de açúcares solúveis, além da trealose que é um carboidrato que apresenta funções relacionadas à proteção ao frio e demais estresses, como no caso de desidratação (Goddijn *et al.* 1997).



Figura 1. Heteroblastia associada às fases jovem a adulta de *Alcantarea imperialis*. **(a)** Vista geral mostrando o tanque. **(b, d)** Planta adulta e juvenil, respectivamente, em seu habitat natural (inselbergue) na Serra dos Órgãos, RJ. **(c)** Planta adulta no Jardim Botânico de São Paulo. **(e)** Cultivo *in vitro*. **(f)** Planta oriunda do cultivo *in vitro*. A figura ilustra indivíduos adultos com formação de tanque (a, b, c) e jovens atmosféricos sem tanque (d, e, f).

Este trabalho baseou-se na seguinte hipótese: plantas jovens de *A. imperialis* são capazes de desenvolver o metabolismo CAM no seu habitat natural, no qual pode ocorrer a falta de água associada ou não ao termoperíodo (noites mais frias), fatores considerados indutores do metabolismo CAM (Lüttge *et al.* 1996, Reddy *et al.* 2004). Conforme mencionado anteriormente, estudos fisiológicos realizados por Aoyama (2010) mostraram que essa espécie apresenta suculência, que poderia indicar uma capacidade para desenvolver CAM. Entretanto, a determinação do metabolismo fotossintético no ambiente natural é limitada pelo fato de muitos dos exemplares estarem em rochas em elevadas altitudes, dificultando a coleta de amostras para avaliações enzimáticas, necessárias à identificação de CAM. Outro parâmetro comumente utilizado para plantas em geral é a abertura estomática. Todavia, no caso das bromélias, algumas espécies fecham os estômatos durante o dia e durante a noite sob estresse (Freschi *et al.* 2010a), não permitindo que essas análises sejam suficientes para determinação do CAM. Sendo assim, o uso de plantas cultivadas *in vitro* sob condições controladas, com a possibilidade de simular falta de água e alternância de temperatura, pode ser adequado à identificação da capacidade da bromélia imperial desenvolver o metabolismo CAM.

Análises preliminares de medida da acidez titulável ao longo do período de 24 horas em plantas de *Alcantarea imperialis*, realizadas no primeiro semestre de 2012, no Laboratório de Cultura de Tecidos do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais (NPPO) do IBt, sugeriram que esta espécie apresenta fotossíntese C₃ tanto quando cultivadas *in vitro* como quando mantidas nos jardins do Instituto de Botânica de São Paulo. Contudo, há necessidade de verificar outros parâmetros que indiquem a ocorrência desse metabolismo ou da possibilidade de vir a desenvolver CAM em condições características do ambiente rupícola.

O fato de *A. imperialis* apresentar acúmulo de carboidratos, responsáveis pelo ajustamento osmótico durante o frio (Mollo *et al.* 2011) poderia ocorrer também em plantas submetidas à reduzida disponibilidade hídrica. Resta saber se, na condição de deficiência hídrica ambiental, associada às variações térmicas, essa espécie utilizaria o metabolismo CAM como forma de tolerar essas condições ou se apenas as alterações bioquímicas (acúmulo de carboidratos) e anatômicas bastariam para garantir a sobrevivência em situações semelhantes àquelas que essas plantas enfrentam crescendo em inselbergues.

Portanto, neste contexto, este trabalho visou avaliar as adaptações fisiológicas e anatômicas de *Alcantarea imperialis* na fase atmosférica “juvenil” à sobrevivência às condições semelhantes às existentes no ambiente rupícola, o qual ela habita naturalmente, estando sujeita a pouca disponibilidade de água e as variações térmicas, a fim de aprofundar e ampliar o conhecimento sobre a espécie em questão e o metabolismo fotossintético de Bromeliaceae.

Objetivos

O objetivo deste trabalho foi avaliar os fatores fisiológicos envolvidos na adaptação de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* em sua fase atmosférica “juvenil” à condição de falta de água e termoperíodo, relacionados à ocorrência ou não da fotossíntese CAM e a participação de carboidratos solúveis como osmoprotetores. Adicionalmente, objetivou-se acompanhar as características anatômicas associadas à adaptação a estas condições.

Estrutura da Tese

Esta tese foi estruturada em dois capítulos, sendo o primeiro referente ao estudo relacionado aos efeitos da falta de água, que se encontra no formato original em que será submetido à análise para a publicação em revista científica (Journal of Plant Physiology) e o segundo referente ao estudo que associa os efeitos da falta de água ao termoperíodo.

A figura 2 apresenta o fluxograma das atividades experimentais desenvolvidas, destacando as que originaram os dois capítulos apresentados.

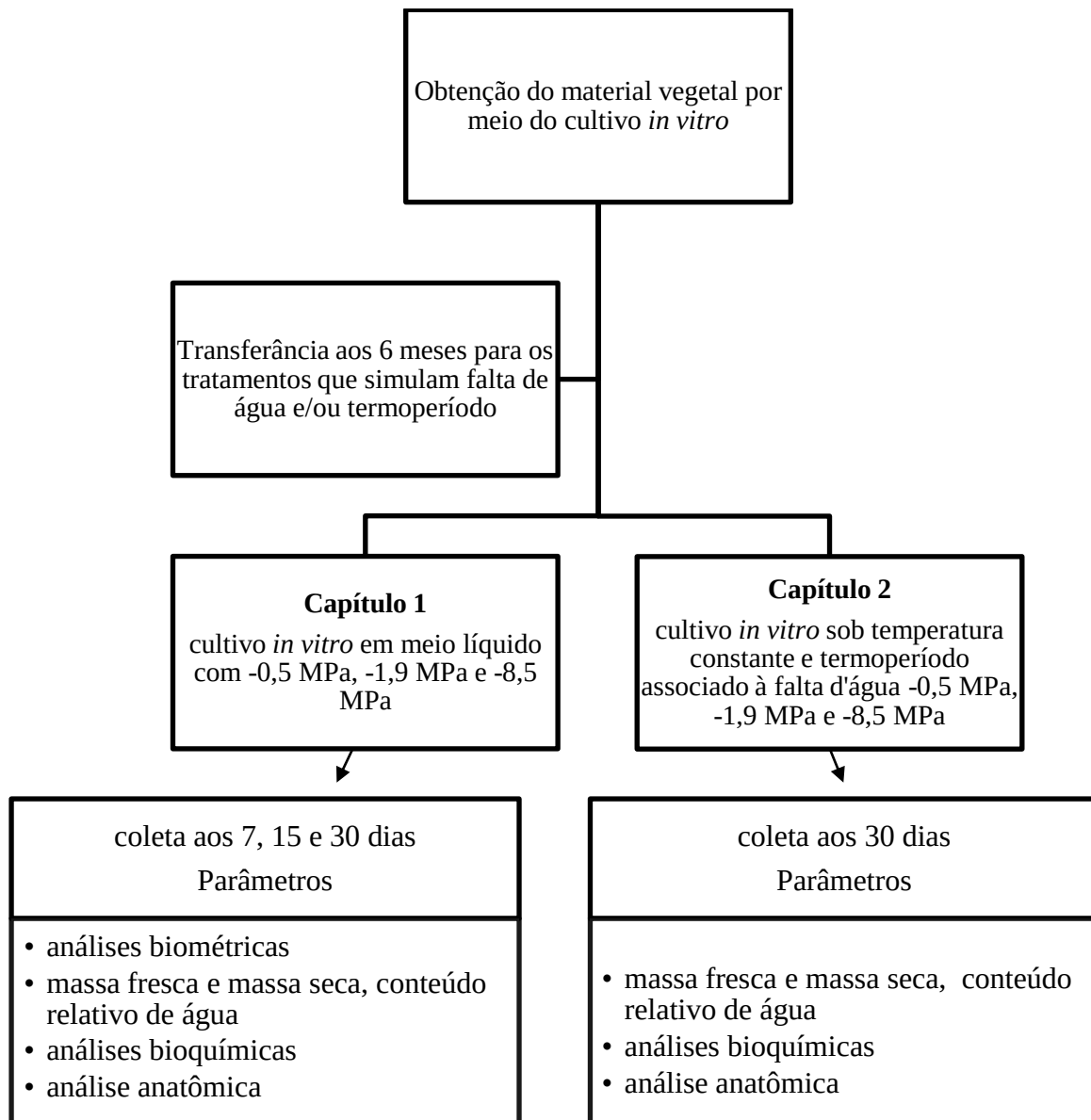


Figura 2: Atividades experimentais realizadas para obtenção dos resultados dos capítulos apresentados.

O detalhamento das atividades experimentais encontra-se em cada capítulo apresentado. Ao final do capítulo 2, encontra-se o item “considerações gerais” no qual é apresentada uma síntese dos principais resultados observados e citados alguns experimentos preliminares que foram realizados no decorrer do desenvolvimento da tese de modo a orientarem o melhor tratamento para realização das análises bioquímicas de indução de CAM. É mostrado, também, o nível máximo de estresse suportado pela bromélia imperial em relação aos parâmetros avaliados nesta tese. Esses dados, bem como a análise anatômica das plantas do inselbergue foram apresentados no item “Apêndices”, ao final da tese.

Os resultados apresentados neste trabalho mostram a modulação do CAM frente à dois fatores abióticos (disponibilidade hídrica e temperatura), considerando que as espécies CAM facultativas serão ainda mais relevantes agora que as novas tecnologias de sequenciamento facilitam o mapeamento dos genomas e o rastreamento dos padrões de expressão de múltiplos genes. Essas tecnologias e sistemas de CAM facultativos, quando unidos, deverão contribuir de forma significativa para nosso objetivo de compreender a essência de CAM (Winter & Holtum 2014).

Referências Bibliográficas

- Aoyama, E.M.** 2010. Propagação *in vitro* e em estufa de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms (Bromeliaceae) a partir de sementes. Tese de Doutorado, Instituto de Botânica.
- Aoyama, E.M., Versieux, L.M., Nievola, C.C. & Mazzoni-Viveiros, S.C.** 2012. Avaliação da eficiência da propagação de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms (Bromeliaceae) cultivada *in vitro* e *ex vitro*. *Rodriguésia* 63: 321-331.
- Barbará, T., Martinelli, G., Palma-Silva, C., Fay, M.F., Mayo, S. & Lexer, C.** 2009. Genetic relationships and variation in reproductive strategies in four closely related bromeliads adapted to neotropical ‘inselbergs’: *Alcantarea glaziouana*, *A. regina*, *A. geniculata* and *A. imperialis* (Bromeliaceae). *Annals of Botany* 103: 65-77.
- Benzing, D.H.** 2000. Vegetative structure. *In*: D.H. Benzing (ed.) *Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 19-77.
- Burke, A.** 2002. Island-matrix relationships in Nama Karoo inselberg landscapes Part I: Do inselbergs provide a refuge for matrix species? *Plant Ecology* 160: 79-90.
- Castillo, R.J., Cervera, C. & Navarro-Alberto, J.** 2016. Drought and extreme temperature tolerance for *Tillandsia dasylyriifolia*, an epiphytic bromeliad from the northern coastal dune scrubland in Yucatan, Mexico. *Botanical Sciences* 94: 121-126.
- Cesteurs, J., Borland, A.M., Ceusters, N., Verdoodt, V., Godts, C. & De Proft, M.P.** 2010. Seasonal influences on carbohydrate metabolism in the CAM bromeliad *Aechmea* ‘Maya’: Consequences for the carbohydrate partitioning and growth. *Annals of Botany* 105: 301-309.
- Crayn, D.M., Winter, K. & Smith, J.A.C.** 2000. Carbon-isotope values for Bromeliaceae. List of carbon-isotope ratios for 1873 species of Bromeliaceae,

together with voucher information. Disponível em:

<http://www.plants.ox.ac.uk/bromeliaceae/carbon.pdf>. Acesso em: 20-IX-2012.

- Crayn, D.M., Winter, K. & Smith J.A.C.** 2004. Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the Neotropical family Bromeliaceae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 3703-3708.
- Cronquist, A.** 1981. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. Columbia University Press, New York.
- Cushman, J.C. & Borland, A.M.** 2002. Induction of Crassulacean acid metabolism by water limitation. *Plant, Cell and Environment* 25: 295-310.
- Dahlgren, R.M.T., Clifford, H.T. & Yeo, P.F.** 1985. The families of the monocotyledons: Bromeliaceae. *Evolution* 28: 677-686.
- Dodd, A.N., Borland, A.M., Haslam, R.P., Griffiths, H. & Maxwell, K.** 2002. Crassulacean acid metabolism: plastic, fantastic. *Journal of Experimental Botany* 53: 569-580.
- Fernandez, O., Bethencourt, L., Quero, A., Sangwan, R.S. & Clement, C.** 2010. Trehalose and plant stress responses: friend or foe? *Trends in Plant Science* 15: 409-417.
- Freschi, L., Azevedo, L.V.G., Purgatto, E. & Mercier, H.** 2007. Sinalização hormonal da indução da fotossíntese CAM em bromélia epífita C₃-CAM facultativa submetida ao estresse hídrico. *Revista Brasileira de Biociências* 5: 468-470.
- Freschi, L., Rodrigues, M.A., Tine, M.A.S. & Mercier, H.** 2010b. Correlation between citric acid and nitrate metabolisms during CAM cycle in the atmospheric bromeliad *Tillandsia pohliana*. *Journal of Plant Physiology* 167: 1577-83.

- Freschi, L., Takahashi, C.A., Cambui, C.A., Semprebom, T.R., Cruz, A.B., Mito, P.T., Versieux, L.M., Calvente, A., Latansio-Aidar, S.R., Aidar, M.P.M. & Mercier, H.** 2010a. Specific leaf areas of the tank bromeliad *Guzmania monostachia* perform distinct functions in response to water shortage. *Journal of Plant Physiology* 167: 526-533.
- Garg, A.K., Kon Kim, J., Owens, T.G., Ranwala, A.P., Choi, Y.D., Kochian, L.V. & Wu, R.J.** 2002. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *PNAS* 99: 15898-15903.
- Givnish, T.J., Barfuss, M.H.J., Ee, B.J., Riina, R., Schulte, K., Horres, H., Gonsiska, P.A., Jabaily, R.S., Crayn, D.M., Smith, A.C., Winter, K., Brown, G.K., Evans, T.M., Holst, B.K., Luther, H., Till, W., Zizka, G., Berry, P.E. & System, K.J.** 2011. Phylogeny, adaptative radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *American Journal of Botany* 98: 872-895.
- Goddijn, O.J.M., Verwoerd, T.C., Voogd, E., Krutwagen, R.W.H.H., Graaf, P.T.H.M., Poels, J., Van Dun, K., Ponstein, A.S., Damm, B. & Pen, J.** 1997. Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Physiology* 113: 181-190.
- Goebel, K.** 1898. *Organography of plants. Part 1.* Clarendon Press, Oxford.
- Goebel, K.** 1913. *Organographie der Pflanzen. 1. Teil: Allgemeine Organographie.* Jena, Gustav Fischer.
- Gupta, A.K. & Kaur, N.** 2005. Sugar signaling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *Journal of Biosciences* 30: 761-776.

- Haag-Kerwer, A., Franco, A.C. & Lüttge, U.** 1992. The effect of temperature and light on gas exchange and acid accumulation in the C₃-CAM plant *Clusia minor* L. *Journal Experimental Botany* 43: 345-352.
- Heyduk, K., Burrell, N., Lalani, F. & Leebens-Mack, J.** 2016. Gas exchange and leaf anatomy of a C₃-CAM hybrid, *Yucca gloriosa* (Asparagaceae). *Journal of Experimental Botany* 67: 1369-1379.
- http://www.biodiversitas.org.br/florabr/lista_florabr.pdf . Acesso em 20 de janeiro de 2017.
- Keeley, J.E.** 1998. CAM photosynthesis in submerged aquatic plants. *Botanical Review* 64: 121-175.
- Kerbaudy, G.B., Takahashi, C.A., Lopez, A.M., Matsumura, A.T., Hamachi, L., Félix, L.M., Pereira, P.N., Freshi, L. and Mercier, H.** 2012. Crassulacean acid metabolism in epiphytic orchids: current knowledge, future perspectives. *In: M.M. Najafpour (ed.). Applied Photosynthesis. InTech, Rijeka, pp.81-104.*
- Klerk, G.J. & Pumisitapon, P.** 2008. Protection of *in vitro* grown *Arabidopsis* seedlings against abiotic stresses. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 95: 149-154.
- Kluge, M. & Brulfert, J.** 2000. Ecophysiology of vascular plants on inselbergs. *In: S. Porembski & W. Barthlott (eds.). Inselbergs: biotic diversity of isolated rock outcrops in tropical and temperate regions. Springer-Verlag, Berlin, pp. 143-176.*
- Larson, D.W., Matthes, U. & Kelly, P.E.** 2000. Cliff ecology: pattern and process in cliff ecosystems. *Cambridge Studies in Ecology. Cambridge University Press, Cambridge.*
- Leme, E.M.C & Marigo, L.C.** 1993. Bromélias na natureza. Marigo Comunicação Visual, Rio de Janeiro.

- Lüttge, U.** 2000. Light stress and crassulacean acid metabolism. *Phyton* 40: 65-82.
- Lüttge, U., Kluge, M. & Bauer, G.** 1996. *Botanique. Traité fondamental*. Tradução de V.A. Sieffert. Lavoisier, Tec & Doc, Paris.
- Martin, C.E.** 1994. Physiological ecology of the Bromeliaceae. *Botanical Review* 60 (1): 1-82.
- Martinelli, G.** 1997. Biologia reprodutiva de Bromeliácea na Reserva Ecológica de Macaé de Cima. In: H.C. Lima & R.R. Guedes-Bruni (eds.) *Serra de Macaé de Cima: diversidade florística e conservação em Mata Atlântica*. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, pp. 213-250.
- Medina, E.** 1974. Dark CO₂ fixation, habitat preference and evolution within the Bromeliaceae. *Evolution* 28: 677-686.
- Mollo, L., Martins, M.M.C., Oliveira, V.F., Nievola, C.C. & Figueiredo-Ribeiro R.C.L.** 2011. Effects of low temperature on growth and non-structural carbohydrates in the Imperial Bromeliad *Alcantarea imperialis* cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 107: 141-149.
- Murashige, T. & Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nelson, E.A., Sage, T.L. & Sage, R.F.** 2005. Functional leaf anatomy of plants with crassulacean acid metabolism. *Functional Plant Biology* 32: 409-419.
- Nievola, C.C., Mercier, H. & Majerowicz, N.** 2001. Levels of nitrogen assimilation in bromeliads with different growth habits. *Journal of Plant Nutrition* 24: 1387-1398.
- Nievola, C.C., Kraus, J.E., Freschi, L., Souza, B.M. & Mercier, H.** 2005. Temperature determines the occurrence of CAM or C₃ photosynthesis in pineapple plantlets grown *in vitro*. *In Vitro Plant Cellular & Developmental Biology* 41: 832-837.

- Nimmo, H.G.** 2000. The regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in CAM plants. *Trends in Plant Science* 5: 75-80.
- O'Leary, B., Park, J. & Plaxton, W.C.** 2011. The remarkable diversity of plant PEPC (phosphoenolpyruvatecarboxylase): recent insights into the physiological functions and post-translational controls of non-photosynthetic PEPCs. *Biochemical Journal* 436: 15-34.
- Oliveira, V.F., Garcia, P.M.A., Aoyama, E.M., Tamaki, V. & Nievola, C.C.** 2009. Variações no conteúdo de carboidratos em *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms submetidas a diferentes potenciais hídricos. *Anais do III Congresso Latino Americano de Ecologia*, São Lourenço.
- Osmond, C.B. & Holtum, J.A.M.** 1981. Crassulacean acid metabolism. *In*: M.D. Hatch & N.K. Boardman (eds.) *Photosynthesis: the biochemistry of plants*, a comprehensive treatise. Academic Press, New York, v.8, pp. 283-328.
- Pereira, P.N., Purgatto, E. & Mercier, H.** 2013. Spatial division of phosphoenolpyruvate carboxylase and nitrate reductase activity and its regulation by cytokinins in CAM-induced leaves of *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae). *Journal of Plant Physiology* 170: 1067-1074.
- Porembski, S.** 2007. Tropical inselbergs: habitat types, adaptive strategies and diversity patterns. *Revista Brasileira de Botânica* 30: 579-586.
- Porembski, S. & Barthlott, W.** 2000. Granitic and gneissic outcrops (inselbergs) as centers of diversity for desiccation-tolerant vascular plants. *Plant Ecology* 151: 19-28.
- Porembski, S., Reine, R. & Barthlott, W.** 1997. Inselberg vegetation and the biodiversity of granite outcrops. *Journal of the Royal Society of Western Australia* 80: 193-199.

- Porembski, S., Martinelli, G., Ohlemuller, R. & Barthlott, W.** 1998. Diversity and ecology of saxicolous vegetation mats on inselbergs in the Brazilian Atlantic rainforest. *Diversity and Distributions* 4: 107-119.
- Pozos, R.L., García, J.L.A. & Hernández, A.B.** 2007. La enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa en el metabolismo central de los vegetales. *Temas de Ciencia y Tecnología* 11: 23-31.
- Reddy, A.R., Chaitanya, K.V. & Vivekanandan, M.** 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology* 161: 1189-1202.
- Renaut, J., Hoffmann, L. & Hausman J.F.** 2005. Biochemical and physiological mechanisms related to cold acclimation and enhanced freezing tolerance in poplar plantlets. *Physiologia Plantarum* 125: 82-94.
- Ribeiro, K.T., Medina, B.M.O. & Scarano, F.R.** 2007. Species composition and biogeographic relations of the rock outcrop flora on the high plateau of Itatiaia, SE-Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* 30: 623-639.
- Rodrigues, M.A., Matiz, A., Cruz, A.B., Matsumura, A.T., Takahashi, C.A., Hamachi, L., Félix, L.M., Pereira, P.N., Lantansio-Aidar, S.R., Aidar, M.P., Demarco, D., Freshi, L. Mercier, H. and Kerbaudy, G.B.** 2013. Spatial patterns of photosynthesis in thin- and thick-leaved epiphytic orchids: unravelling C₃-CAM plasticity in an organ-compartmented way. *Annals of Botany* 112: 17-29.
- Smith, L.B. & Downs, R.J.** 1974. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica* 14: 1-658
- Tamaki, V. & Mercier, H.** 1997. Variações diurnas na acidez vacuolar e na atividade da PEP-carboxilase em *Tillandsia pohliana* Mez (Bromeliaceae) cultivada *in vitro*. *Revista da Sociedade Brasileira de Bromélias* 4: 16-23.

- Ting, I.P.** 1985. Crassulacean acid metabolism. Annual Review of Plant Physiology 36: 595-622.
- Versieux, L.M. & Wanderley, M.G.L.** 2015. Bromélias - gigantes do Brasil. Offset Editora, Natal.
- Winter, K. & Holtum, J.A.H.** 2014. Facultative crassulacean acid metabolism (CAM) plants: powerful tools for unravelling the functional elements of CAM photosynthesis. Journal of Experimental Botany 65: 3425-3441.
- Yamazaki, H., Ayabe, K., Ishii, R. & Kuriyama, A.** 2009. Desiccation and cryopreservation of actively-growing cultured plant cells and protoplasts. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 97: 151-158.
- Zotz, G. & Thomas, V.** 1999. How much water is in the tank? Model calculations for two epiphytic bromeliads. Annals of Botany 83: 183-192.
- Zotz, G., Wilhelm, K. & Becker, A.** 2011. Heteroblasty - a review. Botanical Review 77: 103-151.

CAPÍTULO 1 .

Juvenile plants of *Alcantarea imperialis*: do these bromeliads use different metabolic strategies in order to survive under drought conditions?

Luciana Mollo^A; Adriana Hissae Hayashi^B; Paula Natália Pereira^C; Adriana Vieira Jorge^A; Catarina Carvalho Nievola^A

^AResearch Nucleus on Ornamental Plants, Instituto de Botânica, CEP 04301-902, São Paulo, SP, Brazil. ccnievola@uol.com.br

^BResearch Nucleus in Anatomy, Instituto de Botânica, CEP 04301-902, São Paulo, SP, Brazil.

^CDepartment of Botany, Institute of Biosciences, Universidade de São Paulo, CEP 05508-090, São Paulo, SP, Brazil.

ABSTRACT

Alcantarea imperialis is a rupicolous bromeliad subjected to the low availability of water in the inselbergs. This species is heteroblastic presenting an overlapping of big leaves forming a water reservoir (tank) when adult but is atmospheric in juvenile form, without this reservoir and then, has other mechanisms to survive in this environment. Adult plants perform C₃ photosynthesis but there are no reports about the kind of photosynthesis in juvenile plants. Considering that drought events may be frequently in rupicolous environments and this condition can be related to CAM induction, this work aimed to investigate the capacity of juvenile plants of *A. imperialis* to exhibit this photosynthetic pathway in response to water deficit. We verified if carbohydrate composition and anatomical characteristics, like succulence, could be associated with water maintenance. Six month old *A. imperialis* plants obtained by *in vitro* seed culture were kept under 7.5 or 45% polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) to simulate drought

conditions (- 1,9 MPa and -8,5 MPa, respectively) during 7, 15 and 30 days. After that period, phosphoenolpyruvate carboxylase activity (PEPC) throughout diurnal cycle, nocturnal malic acid quantification, carbohydrate, chlorophyll contents and morphometric parameters (thickness of leaf blade, upper and lower epidermis and chlorophyll and aquiferous parenchyma) were analyzed in the leaves of young individuals of this bromeliad species. Our results showed that young *A. imperialis* is able to perform CAM photosynthesis under higher PEG concentration (45%). Based on these findings, young *A. imperialis* seems to be able to induce the CAM pathway in the leaves under higher water deficit conditions (45% PEG). However, under lower concentrations of PEG (7.5%), these bromeliad species performs C₃ photosynthesis and the leaves showed greater thickness, perhaps due to the higher concentration of carbohydrates for the osmoprotection. Succulence of aquiferous parenchyma in this treatment shows higher capacity of water accumulation than CAM plants. So depending on stress intensity, this species uses sugar accumulation to provide osmotic adjustment or perform CAM. These biochemical adjustments may be useful to better understand the plants' resilience to drought.

Keywords: Crassulacean acid metabolism (CAM), inselberg, osmoprotection, soluble sugar, succulence, leaf anatomy.

Abbreviations: Crassulacean acid metabolism (CAM), Dry weight (DW), phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC), Polyethylene Glycol 6000 (PEG 6000), Relative Water Content (RWC).

Introduction

Bromeliaceae has over 3300 species that occupy a great variety of habitats (Luther, 2012; Crayn et al., 2015). Among the habitats, bromeliad species can be found as rupicolous, in rocky outcrops (Benzing, 1980, 2000; Smith et al., 1986). Members of this family exhibit anatomical, metabolic and biochemical innovations associated with their great variety of habitats that allow them survive in adverse environmental conditions, such as drought, cold, high intensity light and low availability of nutrients (Smith et al., 1986; Maxwell et al., 1994; Pereira et al., 2013; Rodrigues et al. 2014). Among the adaptations used by bromeliads to survive drought conditions are Crassulacean Acid Metabolism (CAM) and osmotic adjustment to maintain tissue water (Bajji et al., 2001; Carvalho et al. 2017)

Alcantarea imperialis (Carrière) Harms is a rupicolous endemic ornamental bromeliad considered endangered (Martinelli 1997). It occurs in rocky outcrops of great slope and plateaus in the altitude fields of Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro State, Brazil (Martinelli, 1997), called inselbergs where form microclimatically and dry growth sites that support a highly specialized vegetation (Porembski, 2007). This inselbergs are considered to be stressful environments (Porembski, 2007), which presents lower availability of water and nutrients (Benzing, 2000). When adults, these plants have an overlapping of big leaves forming a water reservoir named tank or phytotelm where is possible to store several liters of water keeping the plant hydrated for long time (Versieux & Wanderley, 2015). Juvenile form of this species is atmospheric, without a tank to store water. Zotz et al. (2011) classified this bromeliad as a heteroblastic species because of substantial changes in the habit and morphology during the development. In rupicolous scenario it is necessary to have strategies to survive during drought periods.

No references were found about how *A. imperialis* juvenile plants can survive the drought.

Heyduk al. (2016) report that ~6% of angiosperms have adapted to carbon limitation as a result of water deficit by employing a modified form of photosynthesis known as Crassulacean acid metabolism (CAM). This photosynthetic pathway is characterized by conserving water, since the atmospheric CO₂ is taken up predominantly at night, when the air humidity is higher than during the day, and fixed by phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) enzyme in the form of organic acids, mainly malic acid that is storage in the vacuole at night (Matiz et al., 2013). During the following light period, the stomata are closed, organic acids are released to the cytosol and decarboxylated by malic enzyme (ME) or phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) depending on the species, and the CO₂ is reduced in the Calvin cycle (C₃) (Lüttge, 2004; Crayn et al., 2004; Herrera, 2009; Borland et al., 2011; Rainha et al., 2016). Within the family Bromeliaceae, some species are able to switch from C₃ to CAM pathway under adverse environmental conditions, such as drought, in order to reduce water loss during the light period (Maxwell et al., 1994; Freschi et al., 2010; Pereira et al., 2013). Adult plants of *A. imperialis* were classified as a C₃ species based on carbon isotope ratios of photosynthetic pathway (Crayn et al., 2015). Nevertheless, the leaves succulence verified by Aoyama et al. (2010) in juvenile plants of this bromeliad suggests the possibility of this species change this photosynthetic metabolism to CAM like others bromeliads species (Carvalho et al., 2017). According to Nelson et al. (2005), in general, CAM plants are characterized by succulence leaves. The smaller size of younger plants predisposes them to more desiccation under drought conditions than adult plants that have more adaptations to avoid dehydration, such as the tank (Benzing, 2000; Bader et al., 2009).

Regarding the metabolic innovations, increased production of carbohydrates has played a role in the tolerance to drought, cold and high-salinity stress conditions (Muller et al., 2001; Mahajan and Tuteja, 2005; Klerk and Pumisutapon, 2008; Ceusters et al., 2009a; Xoconostle-Cázares et al., 2011). These carbohydrates can include soluble sugar such as fructans (Van Den Ende and Van Laere, 1996) or trehaloses (Mollo et al., 2011) which are involved in the regulation of cellular osmotic potential and protection of cell membranes in the plants (Ceusters et al., 2009a; Ruelland et al., 2009; Mollo et al., 2011; Carvalho et al., 2013), improving the water status and cell volume (Hinch et al., 2006; Klerk and Pumisutapon, 2008).

According to Bajji et al. (2001), water deficit increased soluble sugar concentrations and contributed to osmotic adjustment in wheat. The bromeliad *Aechmea* ‘Maya’ presented a decrease in the starch accumulation in the leaves after 50 days under water stress (Ceusters et al., 2009a). There was a change in the sugar compound used to provide carbon skeletons for the CO₂ fixation, with starch being used in shorter period of water deficit and sucrose in higher periods of drought (Ceusters et al., 2009a). The flexibility of using different carbohydrate reserve might be associated to optimal growth and/or survival under different environmental conditions (Ceusters et al., 2009a).

In this study we investigated the possibility of juvenile plants of *A. imperialis* perform CAM or accumulate carbohydrates under drought conditions simulated by use of PEG-6000 besides analysing morphometric parameters related to leaves succulence as strategies involved in the adaptation of this bromeliad in juvenile phase to adverse environmental condition.

Materials and Methods

In vitro culture

Seeds of *A. imperialis* (Carrière) Harms (SP382063, col. Versieux, L.M. 214, 31/X/2005) were obtained from the collection of bromeliads at the Institute of Botany (São Paulo, Brazil), according to Mollo et al. (2011) with minor modifications. The basal and apical appendages were removed and seeds' surfaces were sterilized by immersion in 70% (v/v) ethanol for 5 min and in the fungicide Benomyl 0.1% (w/v) for an additional 20 min. Subsequently, the seeds were immersed in 2.5% commercial solution of sodium hypochlorite (v/v) containing 5 drops of Tween 20 for 1 h under continuous shaking. After disinfection, the seeds were rinsed twice in sterile water and placed in 250 mL glass flasks (20 seeds per glass flasks) containing 40 mL of Murashige and Skoog medium (MS) (Murashige and Skoog, 1962) with the final concentration of macronutrients reduced to half strength, 3% (w/v) sucrose, 0.1 mg L⁻¹ thiamine-HCl and 7 g L⁻¹ agar (MS/2) and pH 5.8. Subsequently, the glass flasks were placed in growth chamber at 26°C ± 2°C with 12 hours of photoperiod for 6 months. After this period, the plants in the glass flasks were transferred to a new MS medium having the same composition described above, without agar (liquid medium), adjusted to pH 5.8 (HCl), containing different concentrations of polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) to induce the water deficit (Carpita et al., 1979; Gao et al., 2010; Pereira et al., 2013) in *A. imperialis*. Plants of this bromeliad species were kept under 0%PEG ($\psi_w = -0.5$ MPa) (control) or under water deficit treatments: 7.5% PEG ($\psi_w = -1.9$ MPa) and 45% PEG ($\psi_w = -8.5$ MPa).

For each treatment and the control, 4 glass flasks containing 20 plants per flask were used. After 7 days, one-third of the plants were collected from each flask, washed in distilled water and of those, a sample of 18 plants was used for growth analysis. The

remaining plants collected were frozen in liquid nitrogen, kept at -80°C and subsequently used for the biochemical assays. The remaining plants from each flask were collected after 15 and 30 days of water deficit treatments, always with the same procedures described above.

Relative Water content (RWC)

The relative water content was calculated according to Martin e Schmitt (1989) and Freschi et al. (2010).

Growth analysis

Numbers of leafs and roots, fresh and dry Weight, leaf length and length of the longest root were the parameters used for growth measurements. Dry weight (DW) was determined by drying leaf samples in an oven at 60°C until constant weight as described by Freschi et al. (2010).

Chlorophylls and carotenoid contents

Composite samples of each water deficit treatment and control with at least 0.3 g of fresh mass (leaves) were frozen at -20°C and used to determine the chlorophylls and carotenoid contents, according to the technique described by Lichtenthaler (1987) with minor modifications. Pigments were extracted from fresh leaves with 100% acetone at 4°C. Extracts were filtered and absorbances were measured on a espectrophotometer (Quimis, Brazil) at wavelengths of 662, 645 and 470 nm for chlorophyll *a*, *b* and carotenoids respectively. The pigment concentrations were expressed as mg.g dry mass⁻¹ (Lichtenthaler, 1987).

Leaf anatomy

Anatomical analyses were performed in five plants cultivated *in vitro* for 30 days of each PEG 6000 treatment (7,5% and 45% PEG) and the control, using the

fourth leaf from the apex of the stem axis. Samples of the middle leaf were fixed in Karnovsky's solution (Karnovsky 1965). Afterwards, the samples were dehydrated in ascending grades of ethanol and embedded in plastic resin (Leica Histo-resin). The blocks were sectioned (7 μm thick) in a rotary microtome (Leica RM2245). Cross-sections were stained with 0.05% toluidine blue (Sakai, 1973) in phosphate-citrate buffer at pH 4.5 (McIlvaine, 1921) and permanent slides were mounted with synthetic resin.

The digital images of the permanent slides were taken with an Olympus BX53 microscope coupled with an Olympus Q-Color 5 camera, using the software Image-Pro Express 6.3 (Media Cybernetics).

Measurements were made on the leaf thickness, epidermis thickness (adaxial and abaxial surfaces) and mesophyll thickness (chlorophyll and aquiferous parenchyma), using an image analysis software ImageJ 1.4.3.67.

PEPC Activity

PEPC extraction and assay were performed according to Pereira et al. (2013) with minor modifications. Leaf samples (1.0 g) were collected every 3 hours during the day/night cycle. After collecting, the samples were ground in liquid nitrogen and extracted in five volumes (v/w) of buffer containing 200 mM hydroxymethyl-aminomethane hydrochloride (TRIS-HCl) (pH 8.0 adjusted with HCl), 1 mM ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA), 5 mM dithiothreitol (DTT), 10 mM MgCl_2 , 10% (v/v) glycerol and 0.5% (w/v) bovine serum albumin. The homogenate was centrifuged at 15.000 g for 10 min. The PEPC activity was assayed in a 2 mL reaction medium containing 50 mM of Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM DTT, 10 mM MgCl_2 , 10 mM NaHCO_3 , 200 M Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and 3 mM phosphoenolpyruvate. The reaction was started by adding 200 μL of leaf extract. For

PEPC activity determination, the change in absorbance was continuously measured at 340 nm after adding the leaf extract. PEPC assay was performed at 30°C. PEPC activities were expressed as $\mu\text{mol NADH per minute per gram of dry weight}$ ($\mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{DW}$). Measurements were made in triplicates.

Nocturnal malic acid quantification

To determine the dawn-dusk variation of the malate (Δmalate), the leaves' samples were harvested at half an hour before dawn and half an hour before dusk and analysed as described by Pereira et al. (2017) with minor modifications. Leaf tissue frozen at -20°C was ground with liquid N_2 , and 100 mg were homogenized in 500 μL of methanol:chloroform:water (12:5:1, v/v/v). Samples were kept at 60°C for 30 min. Samples were centrifuged at 16.000g, at 4°C for 10 min. An aliquot of 100 μL of the extracted sample was transferred to vials and vacuum dried (Labonco, Kansas City, MO). The dried sample was re-suspended in 25 μL of pyridine and *N*-tert-butyltrimethylsilyl-*N*-methyltrifluoroacetamide (Sigma-Aldrich) and incubated at 92°C for 60 min. An aliquot of 1 μL of the incubated samples was used to quantify acid malic by gas chromatography coupled with a chromatographic system (Shimadzu-QP2010SE, Kyoto, Japan), an Agilent DB5MS column (30m, D.I. 0.25mm, I.T. 0.5 μM), with helium as a carrier gas in a 1ml min^{-1} flux and an auto sampler (Shimadzu AOC-20i) as previously described by Pereira et al. (2017). The endogenous malic acid concentration was obtained by comparing the peak areas of the chromatograms with a commercial Salicylic acid (1mg / mL in methanol) (Sigma-Aldrich). The nocturnal malate accumulation (Δmalate) was assessed by subtracting the malic acid content obtained at dawn from that at dusk with results expressed as $\mu\text{mol malate g}^{-1} \text{DW}$. Measurements were made in triplicates.

Soluble sugar quantification

For soluble sugar quantification, leaves were harvested and analysed using a mass spectrometric (GC/MS) coupled gas chromatograph (Shimadzu-QP2010SE, Kyoto, Japan) as described by Pereira (2016) with minor modifications. Leaf tissue frozen at -20°C was ground with liquid N₂, and 100 mg were homogenized in 500 µL of methanol:chloroform:water (12:5:1, v/v/v). The samples were kept at 60°C for 30 min. The samples were centrifuged at 16000g, at 4°C for 10 min. An aliquot of 100 µL of the sample extracted was transferred to vials and vacuum dried (Labonco, Kansas City, MO). The dried samples were re-suspended in 25 µL of pyridine and N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) (Sigma-Aldrich) and incubated at 75°C for 60 min. An aliquot of 1 µL of the incubated samples was used to quantify soluble sugar by gas chromatography coupled with a chromatographic system, an Agilent DB5MS column (30m, D.I. 0.25mm, I.T. 0.5 µM), with helium as a carrier gas in a 1ml min⁻¹ flux and an auto sampler (Shimadzu AOC-20i). The column remained at 100°C for 5 min, the temperature ramp from 100°C to 320°C at a rate of 8°C min⁻¹. The injector temperature was 275°C, total flow of 19.8 mL min⁻¹ and linear velocity of 46.0 cm s⁻¹. To determine the concentrations of soluble sugars in the samples, the standard fructose, glucose, sucrose and trehalose curves were used. The results were expressed as µmol soluble sugar g⁻¹ DW. Measurements were made in triplicates.

Statistical analysis

The experiments were carried out with a completely randomized design with three replicates per treatment. Each replicate consisted of six plantlets (n= 18) for the growth analysis and for photosynthetic pigments. A total of 130 plantlets were harvested at each PEG 6000 treatment (7.5% and 45%) and the control for malate and soluble sugar quantifications, other 130 plantlets were used for the analysis of PEPC

activity. Significant differences among the water deficit treatments (7.5 and 45% PEG) and the control were tested using the Tukey–Kramer test at $P < 5\%$ using JMP 5.01 software (SAS Institute 2002). The difference among the time of treatment (7, 15 or 30 days) under the same water treatment was tested by Student's t-test at 5% significance ($P < 5\%$). For the anatomical analyses 5 plants of each treatment were used and 3 sections of each plant were randomly chosen among 30 sections for the quantitative analyses.

Results

Relative water content (RWC)

The relative water content of a leaf is a measure that shows its state of hydration in relation to its maximum water retention (total turgidity capacity). RWC provides a measure of the "water deficit" of the leaf and may indicate a degree of stress. RWC integrates leaf water potential (ψ , useful estimate of plant water status) with the effect of osmotic adjustment (a powerful mechanism of cell hydration conservation) as a measure of plant water status. After 30 days of cultivation there was no change in the RWC, which would have compromised the life of the plants. The shoot did not present a significant difference in the RWC under 0, 7.5 or 45% PEG (Fig. 1). The roots exhibited a slight decrease in the RWC under 45% PEG compared to 0%PEG (Fig. 1). On the other hand, the plant kept under 7.5% PEG showed a decrease in the RWC when compared to 0% PEG. However, under 45% PEG, no significant differences were observed in the RWC of the plants when compared to 0% PEG (Fig. 1).

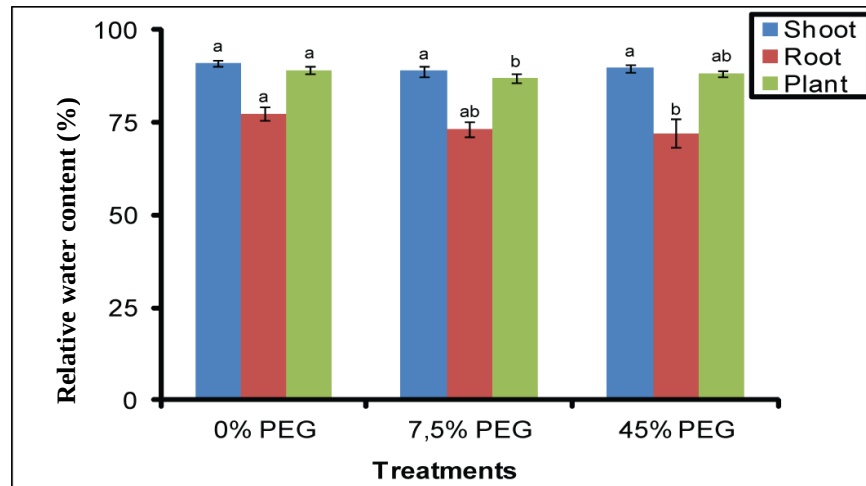


Fig. 1. Relative water content (RWC) of root, shoot and total of *Alcantarea imperialis* plants grown for 30 days at -0.5 MPa (without PEG), -1.9 MPa (7.5% PEG) and -8.5 MPa (45% PEG) at 25°C temperature and 12 hour photoperiod (+SD). Different lower case letters indicate averages significant differences among same parameter in different PEG concentration ($P < 5\%$; Tukey-Kramer's test).

Biometric analyses

Only plants grown for 30 days under 45% PEG ($\psi_w = -8.5$ MPa) showed smaller leaf lengths (Table 1), while in plants grown without PEG, it was observed the maintenance of growth and leaf length increase. For plants grown under 7.5% PEG ($\psi_w = -1.9$ MPa) the length of leaves was not changed (Table 1). Plants grown under 0% PEG ($\psi_w = -0.5$ MPa) or 7.5% PEG showed a gradual increase of dry weight over time in shoot. On the other hand, plants grown under 45% PEG showed a dry weight increase during 15 days of treatment and a decrease of this parameter after this period (Table 1). It was verified that after 30 days the plants grown under 45% of PEG showed a decrease on their roots dry weight, causing an increase in the value of dry weight of shoots: roots ratios, indicating a higher allocation of biomass in the aerial part (Table 1).

Table 1. Length of leaves, dry weight of shoots and shoot dry weight to root dry weight ratios of *Alcantarea imperialis* grown without PEG (control) , 7.5% PEG or 45% PEG for 7, 15 and 30 days. Different capital letters indicate averages significantly different among the treatments (horizontal) ($P < 5\%$; Tukey-Kramer's test). Different lower case letters indicate averages significantly different among the days in the same PEG concentration ($P < 5\%$; Tukey-Kramer's test).

		7 days		15 days		30 days	
Length of leaves	0% PEG	6.18 ± 0.42	Bb	7.48 ± 0.82	ABa	9.33 ± 1.58	Aa
	7.5% PEG	10.65 ± 1.35	Aa	8.28 ± 0.80	Bb	9.98 ± 1.11	ABb
	45% PEG	9.75 ± 1.32	Aa	9.63 ± 0.42	Aa	7.23 ± 1.08	Bb
Dry weight of shoot	0% PEG	0.011 ± 0.002	Cb	0.015 ± 0.002	Bb	0.026 ± 0.002	Aa
	7.5% PEG	0.016 ± 0.003	Aa	0.016 ± 0.003	Ab	0.020 ± 0.003	Ab
	45% PEG	0.013 ± 0.002	Bab	0.035 ± 0.006	Aa	0.017 ± 0.002	Bb
Shoots/roots ratio	0% PEG	3.62 ± 1.16	Aa	3.52 ± 0.26	Aa	2.56 ± 0.12	Ca
	7.5% PEG	4.14 ± 2.56	Aa	3.12 ± 0.57	Aa	2.74 ± 0.47	Ba
	45% PEG	3.61 ± 0.18	Aa	3.19 ± 0.46	Aa	4.81 ± 1.80	Aa

Chlorophylls and carotenoid contents

Regarding to photosynthetic pigments, the results show that the concentrations of chlorophyll *a*, *b* and carotenoids are maintained in similar proportions in 30 days of 0% PEG (control) or 7.5% PEG (Table 2). Chlorophyll *a* contents are higher than chlorophyll *b* (higher than double) in all PEG treatments, while carotenoids content is lower than chlorophyll *a* and *b* content (Table 2). It is observed that when submitted to a higher water deficit condition (45% PEG) the plant produces higher levels of all pigments.

Table 2. Concentration of photosynthetic pigments (chlorophyll and carotenoids) per milligram of fresh mass of *Alcantarea imperialis* grown for 30 days without PEG (control) or in different concentrations of PEG (7.5% and 45%) and chlorophyll *a/b* ratios. Different capital letters indicate averages significantly different among the pigments ($P < 5\%$; Tukey-Kramer's test). Different lower case letters indicate averages significantly different in the same PEG concentration ($P < 5\%$; Tukey-Kramer's test).

	without PEG		7.5% PEG		45% PEG	
Chlorophyll <i>a</i> (µg/gFM)	1.50 ± 0.40	Ab	2.76 ± 0.22	Aa	2.69 ± 0.15	Aa
Chlorophyll <i>b</i> (µg/gFM)	0.77 ± 0.32	ABb	1.06 ± 0.08	Bb	4.63 ± 0.75	Ba
Carotenoids (µg/gFM)	0.32 ± 0.09	Bb	0.47 ± 0.04	Cb	1.24 ± 0.11	Ca
Chlorophyll <i>a</i> /Chlorophyll <i>b</i> ratio	1.94± 0.32	a	2.60± 0.41	a	0.58± 0.06	b

Anatomical analyses

Leaves of *A. imperialis* plants cultivated under 0% PEG (control) or different PEG treatments (7.5% or 45% PEG) showed similar structural organization of tissues (Fig. 2) but differentiated in relation to tissue thickness (Table 3). Upper and lower epidermis are uniseriate (Fig. 2) but lower epidermis is thicker in plants grown under 45% PEG when compared to plants under 0% and 7.5% PEG (Table 3). There was no significant difference in upper epidermis thickness between PEG treatments and control (Table 3). The mesophyll is composed of upper aquiferous parenchyma, followed by a chlorophyll parenchyma both with rounded cells and lower aquiferous parenchyma with cells also rounded, but smaller than those of the upper one (Fig. 2). In all PEG treatments, aquiferous parenchyma cells of the central region of the leaf showed more sinuous walls than those cells of the leaf margin, being more accentuated under 45% PEG treatment (Fig. 2E-F). The leaf thickness was higher under 7.5% PEG due mainly to thicker of aquiferous parenchyma (Table 3). The chlorophyll parenchyma is thinner in plants grown under 45% PEG (Table 3). The aquiferous/chlorophyll parenchyma ratios were higher in plants grown under 7.5% PEG (Table 3). Vascular bundles are collateral and organized in single series, where the larger ones alternate with the smaller ones (Fig. 2).

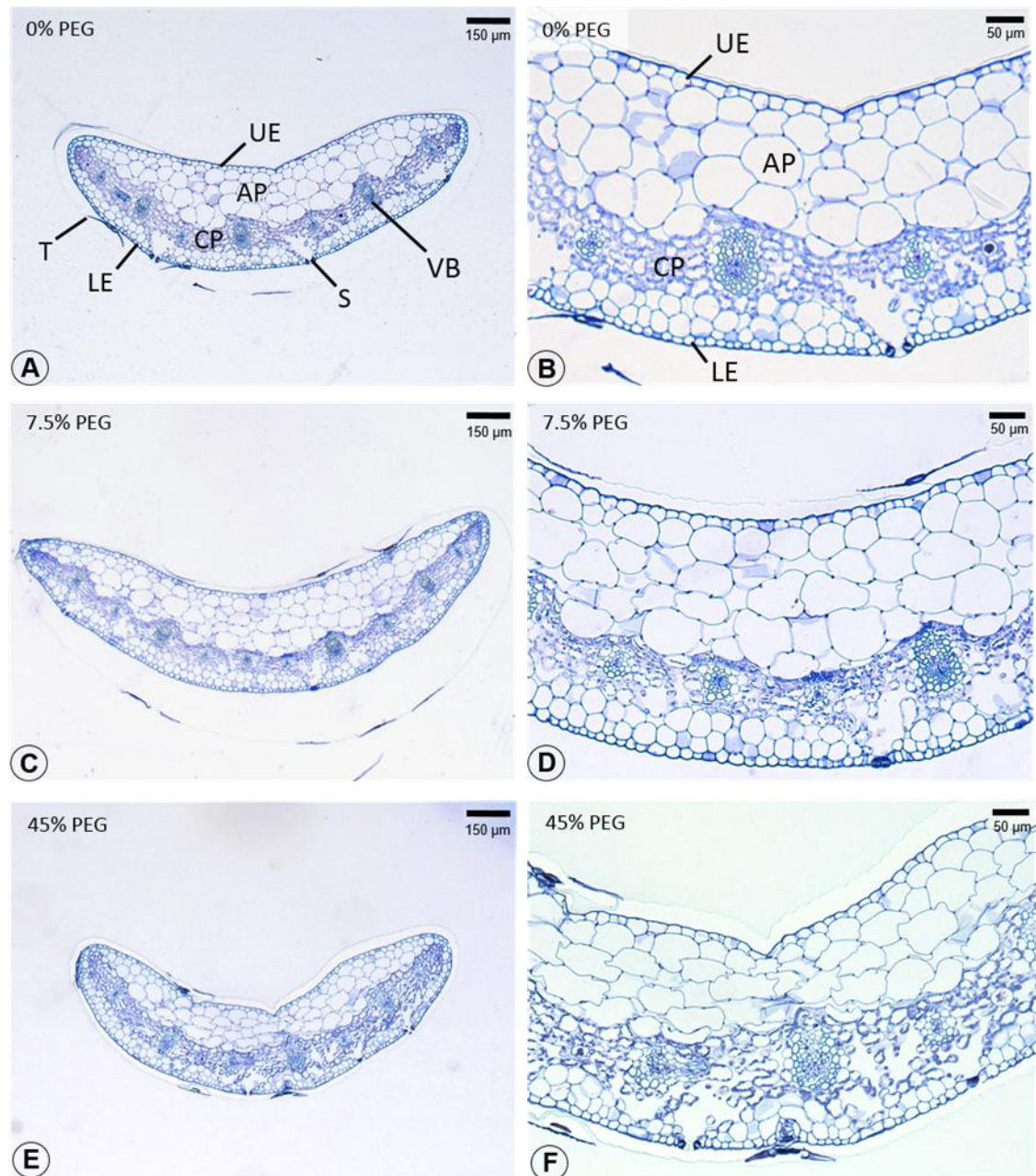


Fig. 2. Leaf cross sections of *Alcantarea imperialis* cultivated *in vitro* for 6 months under 0% PEG (control) (A, B), 7.5% PEG (C, D) and 45% PEG (E, F). AP = aeriferous parenchyma, CP = chlorophyll parenchyma, LE = lower epidermis, S = stoma, T = trichome, UE = upper epidermis, VB = vascular bundle.

Table 3. The average thickness of leaf tissue of *Alcantarea imperialis* plants cultivated *in vitro* for 6 months and posteriorly transferred to liquid medium for 1 month with 0% PEG, 7.5% PEG and 45% PEG. Means with the same letter within the same column per culture period are not significantly different at 5% (n = 15).

Treatment	Upper epidermis (μm)	Lower epidermis (μm)	Upper aquiferous parenchyma (μm)	Chlorophyll parenchyma (μm)	Lower aquiferous parenchyma (μm)	Leaf thickness (μm)	Aquiferous: Chlorophyll Ratio
0% PEG	14.81 a	11.62 b	169.99 b	80.41 a	48.05 ab	327.54 b	2.71c
7.5% PEG	17.42 a	12.70 b	197.98 a	78.28 a	55.99 a	365.76 a	3.24a
45% PEG	15.49 a	16.35 a	143.97 b	62.11 b	41.24 b	289.25 c	2.98b

PEPC activity

In order to characterize the possibility of CAM induction in the leaves of *A. imperialis* plants subject to water deficit by PEG 6000, PEPC activities were evaluated throughout the day/night cycle in the leaves of *A. imperialis* plants maintained under either 0%, 7.5% or 45% of PEG 6000 for 30 days (Fig. 3). Plants kept under different concentrations of PEG showed their highest PEPC activities during the dark period (Fig. 3). When we compared the different concentrations of PEG 6000 and the control (0% PEG), the leaves of the plants kept under 45% of PEG 6000 showed a greater PEPC activity than those kept under 0 % or 7.5% in the most of the dark period (Fig. 3). The plants kept under 0% PEG exhibited one peak in its PEPC activities at 23rd hour (Fig. 3). Instead, the plants kept under 7.5% PEG showed higher PEPC activities either at the beginning of the dark and light periods (17th and 20th at dark and 08th hours at light period) and also at the end of the light time (17th hour) (Fig. 3). On the other hand, under 45% PEG a decrease in PEPC activities were observed after the 5th hour of the cycle (end of the dark time), and the lowest values of activities for this enzyme were shown during the light period (Fig. 3).

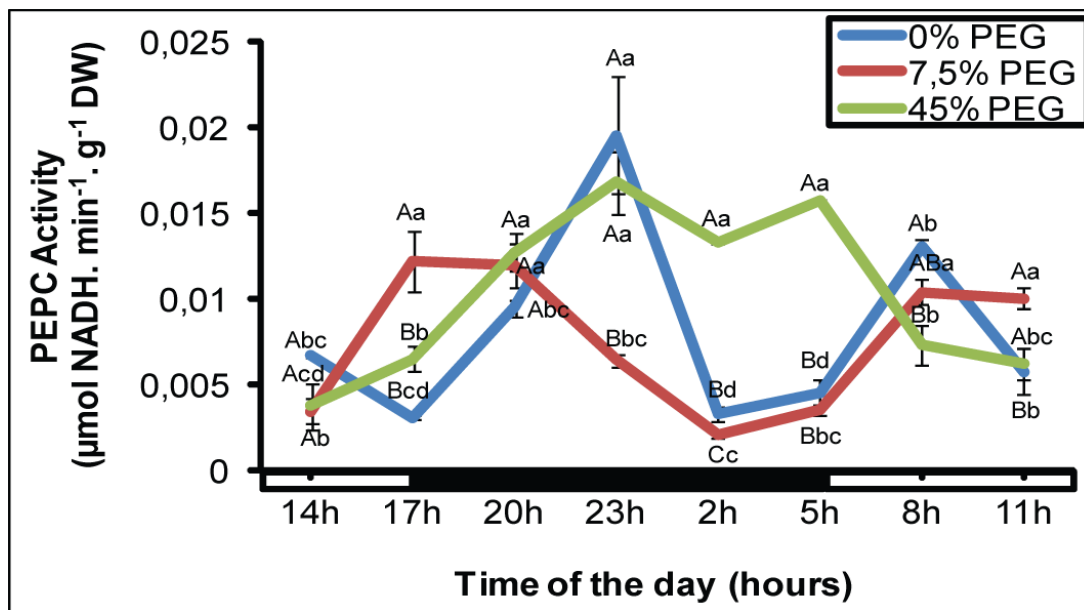


Fig. 3. Diel variation in the PEPC activity in leaves of *Alcantarea imperialis* plants kept under 0% PEG (control) or different concentrations of PEG 6000 (7.5% or 45%) for 30 days. The black horizontal bar indicates the dark period. Data are expressed as the mean of three replicate samples. Different capital letters indicate averages significantly different among the treatments and the days ($P < 5\%$; Tukey-Kramer's test). Different lower case letters indicate averages significantly different among the days in the same PEG concentration or control ($P < 5\%$; Tukey-Kramer's test).

Nocturnal malate accumulation

In addition to PEPC activities, malate nocturnal accumulation (Δ malic acid) was quantified in order to investigate the CAM induction on *A. imperialis* leaves. Plants kept in 0% PEG (control) for 7, 15 and 30 days as well as plants cultivated in 7.5% PEG for 7 and 15 days presented a diurnal accumulation of malate in their leaves (Fig. 4). On the other hand, the nocturnal accumulation of malate was observed in the plants kept in 7.5% PEG for 30 days and 45% PEG for 7, 15 and 30 days (Fig. 4). As the number of days the plants kept in the highest PEG concentration (45% PEG) increased, there was also an increase in the nocturnal malate accumulation in the leaves of this bromeliad species (Fig. 4). The malic acid accumulated during the night in the leaves of the plants kept under 45% PEG for 30 days was 3.3 times and 7.5 times higher than in the leaves of the plants cultivated in 45% PEG for 15 and 7 days, respectively (Fig. 4).

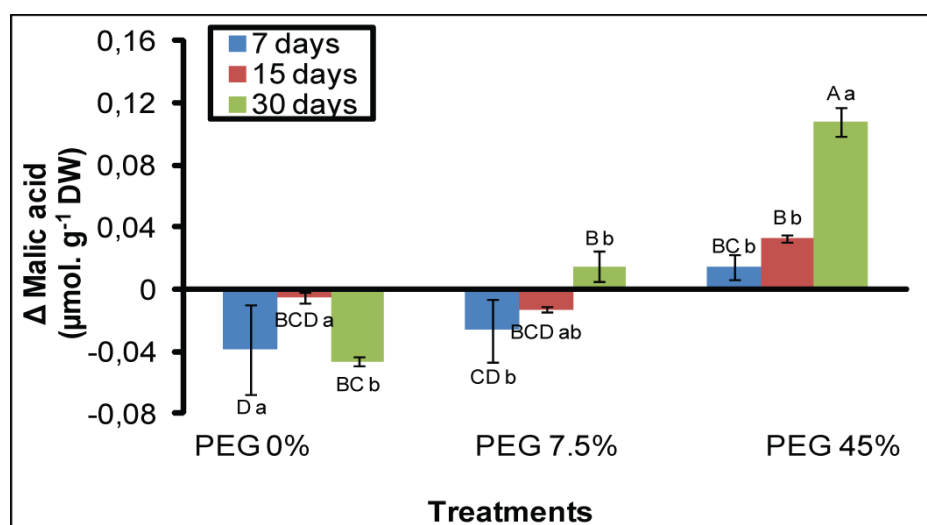


Fig. 4. Nocturnal accumulation of malic acid in leaves of *Alcantarea imperialis* plants kept under 0% PEG (control) or different concentrations of PEG 6000 (7.5% or 45%) for 7, 15 and 30 days. Data are expressed as the mean ($\pm$ SD) of three replicate samples. Different capital letters indicate averages significantly different among the treatments and the days ($P < 5\%$; Tukey-Kramer's test). Different lower case letters indicate averages significantly different among the days in the same PEG concentration ($P < 5\%$; Tukey-Kramer's test).

Soluble sugar content

The soluble sugar content in *A. imperialis* leaves was obtained from the quantification of the accumulation of fructose, glucose, sucrose and trehalose during the beginning of the day in the leaves of this bromeliad species (Fig. 5). The highest level of these soluble sugars was verified when the plants were kept in 7.5% PEG (Fig. 5). Fructose was the most accumulated carbohydrate, followed by glucose and sucrose (Fig. 5). Plants kept under 7.5% PEG presented the highest levels of all soluble sugar when compared to 0% PEG or 45% PEG, while plants cultivated under 45% PEG exhibited the lowest levels of these soluble carbohydrates when compared to 0% PEG or 7.5% PEG (Fig. 5).

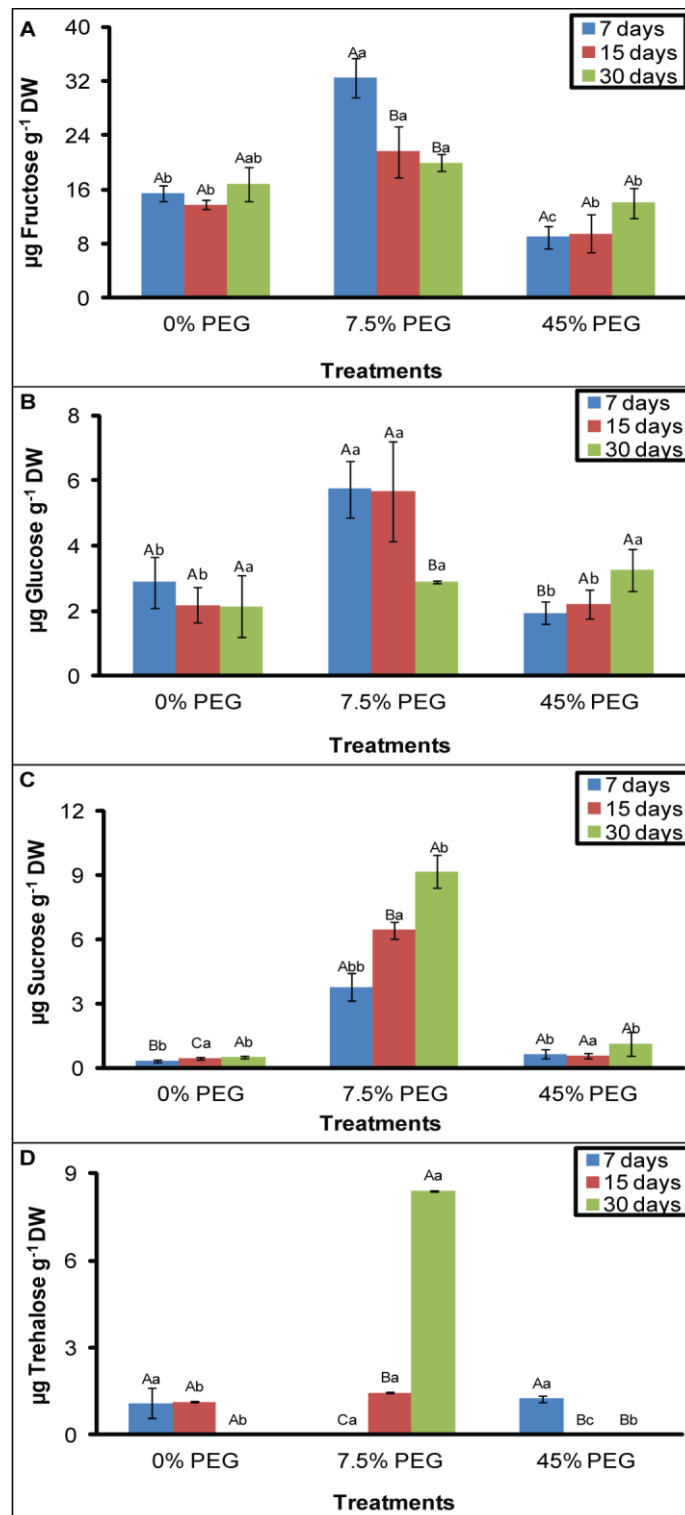


Fig. 5. Fructose, glucose, sucrose and trehalose contents in the leaves of *Alcantarea imperialis* plants kept under 0% PEG (control) or different concentrations of PEG 6000 (7.5% or 45% PEG) for 7, 15 and 30 days. Data are expressed as the mean ($\pm$ SD) of three replicate samples. Different capital letters indicate averages significantly different among the treatments and the days ($P < 5\%$; Tukey-Kramer's test). Different lower case letters indicate averages significantly different among the days in the same PEG concentration ($P < 5\%$; Tukey-Kramer's test).

Discussion

Environmental changes such as periods of drought can induce plants to switch between C₃ and CAM photosynthesis (Borland et al., 2011). This photosynthetic strategy has been related to the survival and tolerance to extreme environmental conditions for these plants (Endres and Mercier, 2000). In this work, juvenile plants of *A. imperialis* can perform CAM when cultivated under -8.5 MPa. However when the intensity of drought stress is lower (-1.9 MPa), these plants accumulate carbohydrates.

In all PEG treatments, the RWC in the shoot did not change (Fig. 1), although maintaining RCW in the roots at levels close to the control (without PEG), there was a slight reduction in plants cultivated with 7.5% PEG and one Even greater reduction in plants grown with 45% PEG. Despite this, biochemical strategies were different to ensure plant survival to the intensity of drought stress. Our results show that in 7.5% PEG treatment the carbohydrate content is the highest, which may be related to the water conserving function in the tissues for the survival of plants to stress. The accumulation of sugars and other compatible solutes serves as osmoprotectants and, in some cases, stabilize the biomolecules (Garg et al., 2002; Klerk & Pumisutapon, 2008; Iturriaga et al., 2009). Juvenile plants of *A. imperialis* showed the increase of soluble carbohydrates content, such as fructose, glucose, sucrose and trehalose, indicating that they seem to be involved in the protection against dehydration in the leaves of this bromeliad when kept under 7.5% PEG, rather than to perform CAM. In other words, CAM photosynthesis seems to be induced under higher water stress (45% PEG).

CAM was determined by higher nocturnal activity of PEPC, the greater nocturnal accumulation of malate in plants kept in 45% PEG in relation to control, and those cultivated in 7.5% PEG for 30 days. These results corroborate previous studies performed with C₃-CAM facultative bromeliad species (Ceusters et al., 2009a; Freschi

et al., 2010; Pereira et al., 2013), which in general change the photosynthetic pathway (C_3 to CAM) in order to save water and energy under unfavorable environmental conditions, such as drought. *Clusia minor* plants when exposed to drought (or dry season in nature) up-regulate CAM activity (Borland et al. 1992, 1998, Winter et al. 2008, Roberts et al. 1998), indicating that CAM can be controlled by the environment.

According to Ceusteurs et al. (2009b), CAM requires a large investment of resources in storage carbohydrates to explain the nocturnal absorption of CO_2 , thus restricting the partition of carbohydrates to other metabolic activities, including dark respiration, growth and acclimatization to abiotic stress. Flexible modulation of carbon flux for different functions under conditions of environmental change is considered a determinant factor for the growth, productivity and ecological success of the CAM pathway. Carnal and Black (1988) verified in bromeliad *Ananas comosus*, that the soluble sugars, especially glucose and fructose carbohydrates serve as reserves for these CAM plants. They also explain that nocturnal acidification of CAM is supported by the glycolytic conversion of large amounts of reserve carbohydrates into PEP and which is carboxylated to form the oxaloacetate that is reduced to form the malic acid that accumulates at night in the vacuoles from cells of CAM plants that contain chloroplasts. During the day the malic acid is remobilized from the vacuole and decarboxylated and the CO_2 generated is fixed by the reductive pentose phosphate pathway, forming the PEP or pyruvate, which is converted to carbohydrate, replenishing the reserve pools. In our study, we suppose in moderate stress (-1.9 MPa) *A. imperialis* accumulate carbohydrates for osmoprotection and this substances may be useful to prepare to perform CAM when stress increases.

The degree of succulence in the leaves of bromeliad species is relevant characteristic in the family (Males, 2016). Succulent leaves present high water contents,

elastic cell walls and apoplastic polysaccharides that allow the plants avoid low water potential even after drought conditions (Martin, 1994). The plants kept in 7.5% PEG had a greater accumulation of dry mass and greater thickness (aquiferous parenchyma), indicating a greater possibility of water storage while CAM was not necessary for the survival of the plants in moderate stress. Juvenile plants of *A. imperialis* under -8.5 MPa (45% PEG) presents lower leave thickness maybe for energy costs of CAM. Carnal and Black (1988) discuss that CAM plants compromise between 5 and 17% of their dry mass for the CAM cycle, about 20 to 170 times longer than respiratory energy requirements.

Based on these results, we have showed that juvenile plants of *A. imperialis* are able to perform CAM photosynthesis under severe water deficit (- 8.5 MPa). However, under moderate stress (- 1.9 MPa) this species does not perform this photosynthetic pathway (CAM), instead, increase soluble sugar content in the leaves as a biochemical strategy to increase the tolerance of their leaves to the drought, possibly by osmotic adjustment. We conclude that *A. imperialis* is a species that presents great plasticity to adapt to environmental water deficit condition, presenting a high ability to survive even when submitted to situations of different water availability. To our knowledge, this is the first study that provides information on how juvenile rupicolous bromeliads adjust the biochemical process to survive to drought. These adjustments may be useful for research on plants' resilience to drought that is an environmental condition predicted to potentially worsen in the future due climate change.

Acknowledgments

The authors acknowledge the Instituto de Botânica of São Paulo and the Instituto de Biociências of the University of São Paulo for the use of the laboratories and Professor Helenice Mercier for the collaboration for the accomplishment of this work. We also thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the scholarship awarded to Luciana Mollo (142033/2013-8).

References

- Ali, I.A., Kafkafi, I., Yamaguchi, Y., Sugimoto, Y., Inanaga, S., 1996. Effects of low root temperature on sap flow rate, soluble carbohydrates, nitrate contents and on cytokinin and gibberellin levels in root xylem exudate of sand-grown tomato. *J. Plant Nutr.* 19, 619–634.
- Aoyama, E.M., 2010. Propagação *in vitro* e em estufa de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms (Bromeliaceae) a partir de sementes. PhD Thesis, Instituto de Botânica, São Paulo SP, Brazil.
- Bader, M.Y., Menke, G., Zotz, G., 2009. Pronounced drought tolerance characterizes the early life stages of the epiphytic bromeliad *Tillandsia flexuosa*. *Funct. Ecol.* 23, 472e479. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2435.2009.01547.x>
- Bajji, M., Lutts, S., Kinet, J.M., 2001. Water deficit effects on solute contribution osmotic adjustment as a function of leaf ageing in three durum wheat cultivars performing differently in arid conditions. *Plant Sci.* 160, 669–681.
- Benzing, D.H., 1980. *Biology of the Bromeliads*. Mad River Press, Eureka, California.
- Benzing, D.H., 2000. *Bromeliaceae: Profile of an Adaptive Radiation*. Cambridge University Press, New York.

- Borland, A.M., Griffiths, H., Maxwell, C., Broadmeadow, M.S., Griffiths, N.M., & Barnes, J., 1992. On the ecophysiology of the Clusiaceae in Trinidad: expression of CAM in *Clusia minor* L. during the transition from wet to dry season and characterization of three endemic species. *New Phytol.* 122, 349–357.
- Borland, A.M., Técsi, L.I., Leegood, R.C., & Walker, R.P., 1998. Inducibility of Crassulacean Acid Metabolism (CAM) in *Clusia* species; physiological/biochemical characterization and intercellular localization of carboxylation and decarboxylation processes in three species which exhibit different degrees of CAM. *Planta* 205, 342–351.
- Borland, A.M., Zambrano, V.A.B., Ceusters, J., Schorrock, K., 2011. The photosynthetic plasticity of crassulacean acid metabolism: an evolutionary innovation for sustainable productivity in a changing world. *New Phytol.* 191, 619–633.
- Borland, A.M., Hartwell, J., Weston, D.J., Schlauch, K.A., Tschaplinski, T.J., Tuskan, G.A., Yang, X., Cushman, J.C., 2014. Engineering crassulacean acid metabolism to improve water-use efficiency. *Trends Plant Sci.* 19, 327–338.
- Browse, J., Xin, Z., 2001. Temperature sensing and cold acclimation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 241–246.
- Carnal, N.W., Black, C.C., 1989. Soluble sugars as the carbohydrate reserve for CAM in pineapple leaves: implications for the role of pyrophosphate:6-phosphofructokinase in glycolysis. *Plant Physiol.* 90, 91–100.
- Carpita, N.C., Sabulase, D., Montezinos, D., Delmer, D.P., 1979. Determination of pore size of cell walls of living plant cells. *Science* 205, 1141–1147.

- 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 bromeliad *Nidularium minutum* to low temperatures. *Plant Physiol. Biochem.* 71, 144–154.
- Castillo, R.J., Cervera, J.C., Navarro-Alberto, J., 2016. Drought and extreme temperature tolerance for *Tillandsia dasyleriifolia*, an epiphytic bromeliad from the northern coastal dune scrubland in Yucatan, Mexico. *Bot. Sci.* 94, 121–126.
- Ceusters, J., Borland, A.M., De Proft, M.P., 2009a. Drought adaptation in plants with crassulacean acid metabolism involves the flexible use of different storage carbohydrate pools. *Plant Sig. Behav.* 4, 212–214.
- Ceusters, J., Borland, A.M., Londers, E., Verdoodt, V., Godts, C., De Proft, M.P., 2009b. Differential usage of storage carbohydrates in the CAM bromeliad *Aechmea* ‘Maya’ during acclimation to drought and recovery from dehydration. *Physiol. Plant.* 135, 174–184.
- Christopher, J.T., Holtum, J.A.M., 1998. Carbohydrate portioning in the leaves of Bromeliaceae performing C₃ photosynthesis or crassulacean acid metabolism. *Aust. J. Plant Physiol.* 25, 371–376.
- Crayn, D.M., Winter, K., Smith, J.A.C., 2000. Carbon-isotope values for Bromeliaceae. List of carbon-isotope ratios for 1873 species of Bromeliaceae, together with voucher information. <http://www.plants.ox.ac.uk/bromeliaceae/carbon.pdf/> (accessed 20.09.12).
- Crayn, D.M., Winter, K., Smith, J.A.C., 2004. Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the Neotropical family Bromeliaceae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 3703–3708.

- Crayn, D.M., Winter, K., Schulte, K., Smith, J.A.C., 2015. Photosynthetic pathways in Bromeliaceae: phylogenetic and ecological significance of CAM and C₃ based on carbon isotope ratios for 1893 species. *Bot. J. Linnean Soc.* 178, 169–221.
- De Paula, C.C., 1998. Cultivo de bromélias para fins comerciais ou hobby. CTP, Viçosa.
- Endres, L., Mercier, H., 2000. Ammonium and urea as nitrogen sources for bromeliads. *J. Plant Physiol.* 15, 205–212.
- Endres, L., Mercier, H., 2003. Amino acid uptake and profile in bromeliads with different habits cultivated *in vitro*. *Plant Physiol. Biochem.* 41, 181–187.
- Freschi, L., Takahashi, C.A., Cambuí, C.A., Semprebom, T.R., Cruz, A.B., Mito, P.T., Versieux, L.M., Calvente, A., Latansio-Aidar, S.R., Aidar, M.P.M., Mercier, H., 2010. Specific leaf areas of the tank bromeliad *Guzmania monostachia* perform distinct functions in response to water shortage. *J. Plant Physiol.* 167, 526–533.
- Gao, Y., Li, Y., Yang, X., Li, H., Shen, Q., Guo, S., 2010. Ammonium nutrition increases water absorption in rice seedlings (*Oryza sativa* L.) under water stress. *Plant Soil* 331, 193–201.
- Griffiths, H., Smith, J.A.C., 1983. Photosynthetic pathways in the Bromeliaceae of Trinidad: relations between life-forms, habitat preference and the occurrence of CAM. *Oecologia* 60, 176–184.
- Gupta, A.K., Kaur, N., 2005. Sugar signaling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *J. Biosci.* 30, 761–776.
- Herrera, A., 2009. Crassulacean acid metabolism and fitness under deficit stress: if not for carbon gain, what is facultative CAM good for? *Ann. Bot.* 103, 645–653.

- Heyduk, K., Burrell, N., Lalani, F., Leebens-Mack, J., 2016. Gas exchange and leaf anatomy of a C₃-CAM hybrid, *Yucca gloriosa* (Asparagaceae). J. Exp. Bot. 67, 1369–1379.
- Hincha, D.K., Popova, A.V., Cacela, A., 2006. Effects of sugars on the stability of lipids membranes during drying. in: Leitmannova, L.A. (Ed.), Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes. Elsevier, Amsterdam, pp. 189–217.
- Iturriaga, G., Suarés, R., Nova-Franco, B., 2009. Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling. Int. J. Mol. Sci. 10, 3793–3810.
- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. J. Cell Biol. 27:137-138.
- Kerbaudy, G.B., Takahashi, C.A., Lopez, A.M., Matsumura, A.T., Hamachi, L., Félix, L.M., Pereira, P.N., Freschi, L., Mercier, H., 2012. Crassulacean acid metabolism in epiphytic orchids: current knowledge, future perspectives. in: Najafpour, M.M. (Ed.), Applied Photosynthesis. InTech, Rijeka, pp. 81–104.
- Klerk, G.J., Pumisitapon, P., 2008. Protection of *in vitro* grown *Arabidopsis* seedlings against abiotic stresses. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 95, 149–154.
- Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods Enzymol. 148, 350–382.
- Luther, H.E., 2012. An alphabetical list of bromeliad binomials, 13th ed. Marie Selby Botanical Gardens/Bromeliad Society International, Sarasota.
- Lüttge, U., 2004. Ecophysiology of Crassulacean acid metabolism (CAM). Ann. Bot. 93, 629–652.
- Mahajan, S., Tuteja, N., 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. Arch. Biochem. Biophys. 444, 139–158.

- Males, J., 2016. Think tank: water relations of Bromeliaceae in their evolutionary context. *Bot. J. Linnean Soc.* 181, 415–440.
- Martin, C.E., 1994. Physiological ecology of the Bromeliaceae. *Bot. Rev.* 60, 1–82.
- Martin, C.E., Schmitt, A.K., 1989. Unusual water relations in the CAM atmospheric epiphyte *Tillandsia usneoides* L. (Bromeliaceae). *Bot. Gaz.* 150, 1–8.
- Martinelli, G., 2007. Mountain biodiversity in Brazil. *Rev. Bras. Bot.* 30, 587–597.
- Matiz, A., Miotto, P.T., Mayorga, A.Y., Freshi, L., Mercier, H., 2013. CAM photosynthesis in bromeliads and agaves: what can we learn from these plants? in: Dubinsky, Z. (Ed.), *Photosynthesis*. InTech, DOI: 10.5772/56219. Available from: <https://www.intechopen.com/books/photosynthesis/cam-photosynthesis-in-bromeliads-and-agaves-what-can-we-learn-from-these-plants->
- Maxwell, C., Griffiths, H., Young, A.J., 1994. Photosynthetic acclimation to light regime and water stress by the C₃-CAM epiphyte *Guzmania monostachia*: gas-exchange characteristics, photochemical efficiency and the xanthophyll cycle. *Funct. Ecol.* 8, 746–754.
- McIlvaine, T.C. 1921. A buffer solution for colorimetric comparison. *J. Biol. Chem.* 49, 183–186.
- 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 Tiss. Organ Cult.* 107, 141–149.
- Mullan, D.M., Pietragalla, J., 2012. Leaf relative water content. In: Pask, A.J.D., Pietragalla, J., Mullan, D.M., Reynolds, M.P. (Eds.) *Physiological Breeding II: A Field Guide to Wheat Phenotyping*. CIMMYT, Mexico, pp. 25–27.

- Muller, J., Aeschbacher, R.A., Wingler, A., Boller, T., Wiemken, A., 2001. Trehalose and trehalase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 125, 1086–1093.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–497.
- Nelson, E.A., Sage, T.L., Sage, R.F. 2005. Functional leaf anatomy of plants with crassulacean acid metabolism. *Funct. Plant Biol.* 32, 409–419.
- Nievola, C.C., Mercier, H., 1996. The importance of leaf and root systems in nitrate assimilation in *Vriesea fosteriana*. *Bromelia* 3, 14–18.
- Nievola, C.C., Mercier, H., Majerowicz, N., 2001. Levels of nitrogen assimilation in bromeliads with different growth habits. *J. Plant Nutr.* 24, 1387–1398.
- Nievola, C.C., Kraus, J.E., Freschi, L., Souza, B.M., Mercier, H., 2005. Temperature determines the occurrence of CAM or C₃ photosynthesis in pineapple plantlets grown *in vitro*. *In Vitro Cell. Develop. Biol. Plant* 41, 832–837.
- Pereira, P.N., 2016. Influência das fontes de N e do déficit hídrico sobre a expressão de aquaporinas e/ou transporte de ácidos orgânicos em plantas CAM. PhD Thesis, Instituto de Biociências, São Paulo SP, Brazil.
- Pereira, P.N., Purgatto, E., Mercier, H., 2013. Spatial division of phosphoenolpyruvate carboxylase and nitrate reductase activity and its regulation by cytokinins in CAM-induced leaves of *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae). *J. Plant Physiol.* 170, 1067–1074.
- Pereira, P.N., Smith, J.A.C, Mercier, H., 2017. Nitrate enhancement of CAM activity in two *Kalanchoë* species is associated with increased vacuolar proton transport capacity. *Physiol. Plant.* doi: 10.1111/ppl.12578.
- Porembski, S., 2007. Tropical inselbergs: habitat types, adaptive strategies and diversity patterns. *Rev. Bras. Bot.* 30, 579–586.

- Rainha, N., Medeiros, V.P., Ferreira, C., Raposo, A., Leite, J.P., Cruz, C., Pacheco, C.A., Ponte, D., Silva, A.B., 2016. Leaf malate and succinate are out of phase throughout the development of the CAM plant *Ananas comosus*. *Plant Physiol. Biochem.* 100, 47–51.
- Roberts, A., Borland, A.M, Maxwell, K., Griffiths, H., 1998. Ecophysiology of the C₃-CAM intermediate *Clusia minor* L. in Trinidad: seasonal and short-term photosynthetic characteristics of sun and shade leaves. *J. Exp. Bot.* 49, 1563–1573.
- Rodrigues, M.A., Matiz, A., Cruz, A.B., Matsumura, A.T., Takahashi, C.A., Hamachi, L., Félix, L.M., Pereira, P.N., Lantansio-Aidar, S.R., Aidar, M.P., Demarco, D., Freshi, L. Mercier, H. and Kerbauy, G.B.** 2013. Spatial patterns of photosynthesis in thin- and thick-leaved epiphytic orchids: unravelling C₃-CAM plasticity in an organ-compartmented way. *Annals of Botany* 112: 17-29.
- Rodrigues, M.A., Freschi, L., Pereira, P.N., Mercier, H., 2014. Interactions between nutrients and crassulacean acid metabolism. *Prog. Bot.* 75, 167e186.
- Ruelland, E., Vaultier, M.N., Zachowski, A., Hurry, V., 2009. Cold signaling and cold acclimation in plants. *Adv. Bot. Res.* 49, 35–150.
- Sakai, W.S. 1973. Simple method for differential staining of parafin embedded plant material using toluidine blue. *Stain Technol.* 48: 247-249.
- Silvera, K., Lasso, E., 2016. Ecophysiology and crassulacean acid metabolism of tropical epiphytes. in: Goldstein, G., Santiago, L.S. (Eds.), *Tropical Tree Physiology: Adaptations and Responses in a Changing Environment*. Springer, New York, pp. 25–43.
- Smith, J.A.C., Griffiths, H., Lüttge, U., 1986. Comparative ecophysiology of CAM and C₃ bromeliads. I. The ecology of the Bromeliaceae in Trinidad. *Plant Cell Environ.* 9, 359–376.

- Van Den Ende, W., Van Laere, A., 1996. Fructan synthesizing and degrading activities in chicory roots (*Cichorium intybus* L.) during field-growth, storage and forcing. J Plant Physiol. 149, 43–50.
- Winter, K, Garcia, M., Holtum, J.A.M., 2008. On the nature of facultative and constitutive CAM: environmental and developmental control of CAM expression during early growth of *Clusia*, *Kalanchoë*, and *Opuntia*. J. Exp. Bot. 59, 1829–1840.
- Xoconostle-Cázares, B., Ramires-Ortega, F.A., Flores-Elenes, L., Ruiz-Medrano, R., 2011. Drought tolerance in crop plants. Am. J. Plant Physiol. 5, 241–256.
- Yancey, P.H., 2005. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. J. Exp. Biol. 208, 2819–2830.
- Zotz, G., Wilhelm, K., Becker, A., 2011. Heteroblasty - a review. Bot. Rev. 77, 109–151.

CAPÍTULO 2 .

Termoperíodo e falta de água intensificam o CAM e induzem alterações no conteúdo de açúcares solúveis em plantas jovens de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms (Bromeliaceae) cultivadas *in vitro*

Resumo

As espécies de plantas nativas de ambientes rupícolas são adaptadas à intensa amplitude térmica e episódios de seca, como é o caso da bromélia ornamental *Alcantarea imperialis*. Em estudos anteriores, verificou-se que a produção de carboidratos solúveis acumulados por essa espécie está associada à adaptação ao termoperíodo. Há estudos que mostram a ativação de outros processos fisiológicos nessa condição como a fotossíntese CAM, que também pode ser induzida por variações na disponibilidade hídrica. Embora esses dois fatores ambientais ocorram no ambiente rupícola, não foram encontrados relatos sobre a ocorrência de CAM na bromélia imperial. Este trabalho teve como objetivo investigar se *A. imperialis* tem potencial para desenvolver CAM em resposta à amplitude térmica associada à falta de água, visto que as características anatômicas dessa bromélia são compatíveis ao funcionamento de plantas CAM (suculência devida ao parênquima aquífero). Visa também mostrar o envolvimento dos carboidratos nessa adaptação. As plantas de seis meses de idade, obtidas por germinação *in vitro*, foram transferidas para condições que simularam o termoperíodo (30°C claro/15°C escuro) e a temperatura constante (25°C), em câmaras de germinação (tipo BOD). As plantas obtidas foram submetidas à análise de parâmetros que indicam a ocorrência de CAM, como a atividade de FosfoenolpiruvatoCarboxilase (PEPC) ao longo do ciclo diurno, conteúdo de ácidos orgânicos, bem como do teor de

carboidratos durante o tempo de experimento, além da análise anatômica foliar que foi realizada para o tratamento de 45% de PEG (-8,5 MPa) em temperatura constante e termoperíodo, associando os fatores de mais intensa falta de água e alternância de temperatura. Os resultados mostraram folhas com espessura reduzida e células menos túrgidas na condição termoperiódica, indicando a perda de água no parênquima aquífero adaxial em relação às plantas mantidas na temperatura constante. Verificamos que *A. imperialis* é capaz de realizar a fotossíntese CAM sob termoperíodo associado à simulação de falta de água com utilização de PEG6000 (-1,9 MPa em 7,5% de PEG e -8,5 MPa em 45% de PEG) de modo a simular a falta de água. No entanto, uma condição de estresse moderada (-1,9 MPa) em temperaturas constantes, faz com que a planta acumule açúcares solúveis que podem aumentar a tolerância das plantas, possivelmente pelo ajuste osmótico. Apesar da diminuição da espessura do parênquima aquífero no tratamento indutor de CAM, essas plantas não apresentam diferenças significativas no conteúdo relativo hídrico foliar.

Palavras-chave: Metabolismo Ácido das Crassuláceas, açúcares solúveis, plantas rupícolas, Inselbergs, osmoproteção, parênquima aquífero.

Introdução

A temperatura é um fator muito importante para a vida de todos os seres vivos, exercendo grande influência em todas as atividades fisiológicas, por controlar as taxas das reações metabólicas nas células. Especialmente para os vegetais, seres sésseis, as adaptações às alterações de temperatura devem ser rápidas e eficientes para garantir sua sobrevivência (Browse & Xin 2001).

Calor e frio são estados termodinâmicos, caracterizados pela alta ou baixa energia cinética das moléculas. O calor acelera o movimento das moléculas, enfraquecendo as ligações entre elas e tornando as camadas lipídicas das biomembranas mais fluidas. A redução da temperatura leva a uma diminuição da velocidade de reações químicas vitais das plantas, além de tornar as biomembranas mais rígidas aumentando a permeabilidade e reduzindo a seletividade, além de aumentar o valor da energia de ativação das enzimas ligadas a elas (Larcher 2006). Este fator influencia a fisiologia de vários órgãos e tecidos das plantas, como por exemplo, foi citado por Majada et al. (2000), em relação às folhas, que embora as características anatômicas sejam determinadas geneticamente, as condições ambientais têm forte influência sobre a estrutura destas. Nelson & Sage (2008) comentam que o aumento do tamanho das células, aumento da suculência foliar, redução do espaço aéreo intercelular (EAI) e redução da superfície do mesofilo exposto ao EAI são características associadas à via fotossintética CAM. Heyduk et al. (2016) citam que algumas espécies CAM facultativas só manifestam esse metabolismo sob estresses abióticos e que a anatomia ótima de CAM incluiria células grandes e um decréscimo da quantidade de EAI.

Luttge (2004) salientou que temperaturas noturnas mais baixas e diurnas mais elevadas são favoráveis ao CAM. Do mesmo modo, Haag-Kerwer et al. (1992) verificaram que as alterações de C3 para CAM são aumentadas quando as diferenças de

temperatura dia/noite são aumentadas, sendo que essa transição é menos sensível à temperaturas absolutas.

Em 85% das Angiospermas, a fixação do carbono em compostos orgânicos ocorre pela via C3. Este ciclo C3 é plenamente ativo em presença de luz e inativo no escuro (Majerowicz, 2008). C4 são plantas predominantemente tropicais e subtropicais ocorrendo em menos de 1% das Angiospermas (Smith 1998 apud Majerowicz 2008), como milho, sorgo e cana-de-açúcar, entre outras culturas. CAM é um mecanismo fotossintético concentrador de CO₂ e foi selecionado possivelmente em resposta à aridez de ambientes terrestres e à limitação na disponibilidade de CO₂ em ambientes aquáticos. Bromeliaceae e Orchidaceae epífitas de ecossistemas áridos ou de florestas tropicais apresentam numerosos representantes com metabolismo CAM (Majerowicz, 2008).

As plantas CAM são caracterizadas pela fixação maciça de CO₂ no período noturno o qual é acumulado nos vacúolos na forma de malato, contribuindo para a acidez celular. Durante o dia, os estômatos se fecham, e o CO₂ para o ciclo C₃ passa a ser fornecido pela descarboxilação do malato. Durante a noite o amido produzido e acumulado é hidrolisado para a produção de PEP, acumulando-se de dia como produto da fotossíntese e da descarboxilação do malato (Majerowicz, 2008).

A fixação do CO₂ atmosférico pela PEPC nas plantas CAM se processa à noite, enquanto a fixação de CO₂ pelo ciclo C₃ ocorre durante o dia, para fornecer compostos de três carbonos para o ciclo de Krebs (Pozoz et al. 2007). Isso aumenta a eficiência do uso de água, pois a fixação noturna de CO₂ tem como resultado a diminuição da perda de água uma vez que a diferença de pressão de vapor da água entre as folhas e a atmosfera atinge valores mínimos durante a noite (Majerowicz, 2008).

Lüttge (2004) relata que os fatores ambientais mais importantes para indução de CAM são: CO₂, água, luz, temperatura, salinidade e nutrientes, sendo que esses fatores representam uma rede fechada, onde estão direta ou indiretamente ligados. A temperatura muitas vezes pode não ser decisiva por si na indução do CAM, mas age modulando o impacto de outros fatores (Kluge & Ting 1978 apud Lüttge (2004). Nievola et al. (2005) verificaram que alterações na temperatura podem determinar a ocorrência da fotossíntese C3 ou CAM em plantas de *Ananas comosus* cultivadas *in vitro*, sendo o termoperíodo responsável pela indução do CAM nessa espécie. Então, quanto menor o intervalo de tempo com temperaturas noturna menores e diurnas maiores, mais favorável a ativação do CAM (Lüttge 2004).

Coutinho & Schrage (1970) já salientavam o possível significado das temperaturas noturnas sobre a distribuição geográfica e ecológica de grande parte de espécies de Bromeliaceae, cujos representantes rupícolas, por exemplo, estão expostos a grande luminosidade diurna e apresentam facilidade de perder calor durante o período noturno. Com isso, essas plantas são expostas a um nítido e pronunciado termoperíodo entre dia e noite, sendo essa queda de temperatura noturna um fator que favorece a assimilação de CO₂. Assim, é possível entender melhor a grande diversidade em espécies e gêneros dessa família em regiões de clima úmido e mais frio, como acontece na Floresta Atlântica do sul do Brasil, nas zonas de maior altitude, ou de clima semiárido com noites frias.

Algumas espécies se adaptam às variações sazonais de temperatura ajustando o seu metabolismo, aumentando o seu conteúdo de compostos crioprotetores para maximizar a sua tolerância ao frio (Janska et al. 2010). Espécies de plantas de clima temperado aclimatam-se durante o outono, reorientando seu metabolismo para a síntese de moléculas protetoras contra o frio, tais como açúcares solúveis (sacarose, estaquiose,

trealose), açúcares alcoólicos (sorbitol, ribitol, inositol) e compostos nitrogenados de baixo peso molecular (prolina, glicina, betaína) (Janska et al. 2009).

A tolerância ao frio é importante para plantas de locais onde há um frio sazonal e aclimação a temperaturas sub-congelantes no inverno. Isto envolve mecanismos bioquímicos e biofísicos em nível celular, isto é, acumulação de açúcares (hexoses e sacarose) para a osmorregulação que controla a desidratação por congelamento e como crioprotetores e solutos compatíveis (Lüttge, 2004).

Segundo Nelson *et al.* (2005), em geral, plantas CAM se caracterizam anatomicamente por apresentar folhas espessas e células maiores do que as folhas de plantas C₃ e C₄. Nievola *et al.* (2005) identificaram diferenças na anatomia das folhas de abacaxizeiro CAM e C₃, apontando para a importância do estudo anatômico na avaliação da ocorrência de CAM. Folhas das plantas submetidas ao termoperíodo de 28 °C claro/15°C escuro (indutor de CAM) eram menores, mais espessas e com maior quantidade de parênquima clorofiliano e hipoderme do que as folhas das plantas com 28 °C constantes efotoperíodo de 12 horas. Em folhas de *Cattleya walkeriana*, uma espécie de orquídea CAM, Rodrigues *et al.* (2013) constataram que a espessura do mesofilo está diretamente relacionada com o metabolismo CAM induzido pela seca.

Alcantarea imperialis é um representante de Bromeliaceae, subfamília Tillandsioideae, endêmica dos antigos afloramentos rochosos (inselbergues) de grande altitude na mata atlântica do sudeste do Brasil, como a Serra dos Órgãos, Rio do Janeiro (Barbará et al. 2008). “Inselbergues” são afloramentos rochosos de milhões de anos, que emergem acima das planícies que os cercam, sendo de estrutura granítica e gnáissica que ocorrem ao longo de um amplo espectro de zonas climáticas. Formam sítios de crescimento que apresentam microclima seco e sustentam uma vegetação altamente especializada (Porembski, 2007). Esta planta ornamental cresce naturalmente em

altitudes de cerca de 800 metros em regiões com clima mesotérmico brando, com temperaturas médias anuais de 19°C que podem variar de até 40°C a 5°C em um único dia (Mollo et al. 2011). Nestas encostas rochosas, a temperatura do ar e a insolação atingem regularmente valores que são consideravelmente mais elevados do que os valores médios nos tipos de vegetação circundante (Porembski, 2007). Nestas condições, estas plantas devem desenvolver mecanismos fisiológicos, morfológicos ou anatômicos que as permitam sobreviver nestes ambientes.

Como *Alcantarea imperialis* é endêmica dos inselbergues da região da Serra dos Órgãos, RJ, está adaptada a se estabelecer naquele ambiente. A semente se estabelece sobre a rocha e em sua fase atmosférica ou juvenil, vence a amplitude térmica daquele local. Para isso, podemos supor que estas adaptações à amplitude térmica estejam relacionadas à capacidade utilizar a osmoproteção, de realizar o CAM ou alguma outra estratégia metabólica. A maioria das plantas CAM é encontrada em locais onde ocorrem altas temperaturas diurnas e baixas temperaturas noturnas (Ting, 1985) que favorecem esse tipo de fotossíntese, como é o caso do ambiente dos inselbergs.

Além do metabolismo CAM, ocorre a produção de osmoprotetores contra o dessecamento imposto pela perda da capacidade seletiva induzida pela baixa energia cinética das membranas celulares (Larcher, 2006). Foi observado por Mollo et al. (2011), no estudo da influência do termoperíodo em *Alcantarea imperialis* o aumento da produção de carboidratos solúveis, como a trealose, como proteção ao frio em longos períodos (9 meses).

Nos sistemas que são governados por uma rede de fatores de estresse interativos que exigem respostas versáteis e não sistemas em que um único fator de estresse prevalece fortemente, os domínios de CAM são maiores. CAM é uma estratégia

variável e plástica para as plantas e isso constitui a vantagem ecofisiológica de CAM (Lüttge 2004).

O maior benefício de CAM para as plantas rupícolas, terrícolas ou epífitas, seria o aumento da eficiência do uso da água, porque a abertura estomática durante o período escuro provoca uma perda de água transpiratória muito menor do que a abertura durante o período de luz (Lüttge 2004). Por isso, CAM é um importante mecanismo de tolerância à seca, que acumula de ácidos orgânicos (como o malato) no período noturno, característico dessas plantas (Lüttge, 2004; Crayn et al. 2004; Herrera 2009; Borland et al. 2011; Rainha et al. 2016).

Este trabalho teve como objetivo investigar se *A. imperialis* tem potencial para desenvolver CAM em resposta à amplitude térmica, associada ou não à falta de água, visto que as características anatômicas dessa bromélia são compatíveis ao funcionamento de plantas CAM (suculência devida ao parênquima aquífero). Visa também avaliar o envolvimento dos carboidratos nessa adaptação.

Materiais e Métodos

Estabelecimento do cultivo *in vitro*

Sementes de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms foram obtidas de indivíduos da Coleção de Bromélias do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais do Instituto de Botânica. Os apêndices plumosos foram removidos e as sementes desinfestadas por imersão em etanol 70% durante 5 min, seguida de imersão em solução fungicida de benomyl (Benlat ®) a 0,1% por 20 min e, posteriormente, em solução comercial de hipoclorito de sódio a 2,5%, contendo 5 gotas de Twin® 20 por uma hora, sempre com agitação contínua.

Após a desinfestação, as sementes foram enxaguadas em câmara de fluxo laminar com água destilada e colocadas para germinar em frascos (20 sementes por frasco) contendo 40 mL de meio de cultura Murashige & Skoog (1962), esterilizado em autoclave, contendo a concentração de micronutrientes original e de macronutrientes reduzida à metade, adicionando 30 g/L de sacarose e 7 g/L de ágar (Difco), pH ajustado para 5,8, conforme descrito em Mollo *et al.* (2011) para estabelecimento do cultivo *in vitro*. Posteriormente, os frascos foram acondicionados em sala de cultura a 26 °C ± 2 °C, sob fotoperíodo de 12 horas, sendo mantidos nestas condições por 6 meses, quando então, as plantas foram transferidas para diferentes tratamentos que visaram simular o termoperíodo e o termoperíodo associado ao déficit hídrico. Este período foi definido por Aoyama *et al.* (2012) como sendo o período ideal para a permanência das plântulas nos meios nutritivos, estabelecendo importante relação custo-benefício para sua produção.

As plantas com 6 meses foram submetidas aos seguintes tratamentos:

a) Temperatura: as plantas foram transferidas para novo meio de cultura M&S com macronutrientes reduzidos à metade, de composição idêntica ao anterior e

acondicionadas em câmaras de germinação do tipo BOD (FANEM) com as temperaturas controladas em dois tratamentos: o primeiro a 30 °C claro/ 15 °C escuro (termoperíodo) e o segundo em temperatura constante de 25 °C, com fotoperíodo de 12h. Para cada tratamento foram utilizadas 13 repetições (frascos) contendo 10 plantas por frasco. Após 30 dias, as plantas foram coletadas, lavadas em água destilada e congeladas em nitrogênio líquido, mantidas a uma temperatura de -70 °C para, posteriormente, serem submetidas às análises bioquímicas.

b) Falta de água x Temperatura: plantas de 6 meses de idade foram mantidas nas mesmas condições térmicas citadas no item a (temperatura), mas com meio de cultura M&S com macronutrientes reduzidos à metade, sem ágar (meio líquido), pH ajustado para 5,8 contendo diferentes concentrações de polietilenoglicol 6000 (PEG), compondo os 3 diferentes tratamentos: T1 = controle (sem PEG) ($w = -0,5$ MPa); T2 = 7,5% de PEG ($w = -1,9$ MPa); T3 = 45% de PEG ($w = -8,5$ MPa). Para cada tratamento foram utilizadas 4 repetições (frascos) contendo 10 plantas por frasco. Todas as plantas foram mantidas em BOD a 25 °C e fotoperíodo de 12h. Após 30 dias, as plantas foram coletadas, lavadas em água destilada e destas, uma amostragem de 10 plantas foi utilizada para análises biométricas e as demais foram congeladas em nitrogênio líquido, mantidas a -70 °C para, posteriormente, serem submetidas às análises bioquímicas.

Conteúdo relativo de água (CRA)

O conteúdo relativo de água foi calculado com base da massa, sendo utilizada a fórmula: $CRA = (MF - MS) * 100 / MF$ (Fleta-Soriano et al. 2015).

Sendo MF = massa fresca e MS = massa seca.

A massa fresca foi pesada no momento da coleta e a massa seca (MS) foi determinada pela secagem das amostras de folhas em forno a 60°C até peso constante.

Anatomia foliar

As análises anatômicas foram realizadas em plantas cultivadas *in vitro* descritas para o tratamento temperatura, ou seja, em meio M&S/2 durante 6 meses e posteriormente, mantidas por 30 dias em meio líquido contendo 45% de PEG 6000 em temperatura constante de 25°C ou termoperíodo de 30°C claro / 15°C escuro, ambas com fotoperíodo de 12 horas. As amostras do terço médio da 4ª folha a partir do ápice de 5 plantas de cada tratamento foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky 1965). Posteriormente, foram desidratadas em concentrações ascendentes de etanol e incluídas em resina plástica (LeicaHistoresin®). Os blocos foram seccionados (7 µm de espessura) em micrótomo rotativo (Leica RM2245). As secções transversais foram coradas com azul de toluidina a 0,05% (Sakai, 1973) em tampão fosfato-citrato a pH 4,5 (McIlvaine, 1921) e as lâminas permanentes foram montadas com resina sintética.

As imagens digitais das lâminas permanentes foram capturadas com microscópio Olympus BX53 acoplado a câmera Olympus Q-Color 5, usando o software Image-Pro Express 6.3 (Media Cybernetics).

Os seguintes parâmetros foram medidos: espessura foliar, espessura da epiderme (superfícies adaxial e abaxial) e espessura do mesofilo (parênquimas clorofiliano e aquífero), utilizando - se o software de análise de imagens ImageJ (versão 1.4.3.67).

Atividade PEPC

O ensaio da PEPC foi realizado de acordo com Pereira et al. (2013) com pequenas modificações. Amostras de folhas (1,0 g) foram coletadas às 2 horas e às 14h. Após a coleta, as amostras foram trituradas em nitrogênio líquido e extraídas em cinco

volumes (v / p) de tampão contendo hidroximetilaminometano cloridrato (TRIS-HCl) 200 mM (pH 8,0 ajustado com HCl), ácido etilenodiaminotetraacético 1 mM (EDTA), 5 mM de ditioneitol (DTT), 10 mM de MgCl₂, 10% (v / v) de glicerol e 0,5% (p / v) de soro de albumina bovina. O homogeneizado foi centrifugado durante 10 min a 15.000 x g. A atividade de PEPC foi ensaiada num meio reacional de 2 mL contendo 50 mM de Tris-HCl (pH 8,0), DTT 1 mM, MgCl₂ 10 mM, NaHCO₃ 10 mM, dinucleotídeo de nicotinamida adenina 200 µmol (NADH) e fosfoenolpiruvato 3 mM. A reação foi iniciada pela adição de 200 µL de extrato foliar. Para a determinação da atividade de PEPC, a alteração na absorbância foi medida continuamente a 340 nm após adição do extrato das folhas. O ensaio PEPC foi realizado a 30°C. As atividades PEPC foram expressas em µmol de NADH por minuto por grama de peso seco. As medições foram feitas em triplicatas.

Quantificação de ácidos orgânicos

Para determinar a variação entre o período noturno e diurno de malato (Δ do malato), as folhas de todos os tratamentos foram coletadas meia hora antes do amanhecer e meia hora antes de anoitecer e analisadas utilizando um cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massa (GC / MS) tal como descrito por Pereira (2016), com pequenas modificações. O tecido foliar congelado a -20 ° C foi macerado com nitrogênio líquido e 100 mg foram homogeneizados em 500 µL de metanol: clorofórmio: água (12: 5: 1, v / v / v). A mistura foi mantida a 60 ° C durante 30 min. Em seguida, foram adicionados 500 µL de água e a mistura foi centrifugada a 16.000 x g, 4° C durante 10 min. Uma alíquota de 100 µL do extrato foi transferida para frascos e seca sob vácuo. O resíduo remanescente foi dissolvido em 25 µL de piridina e

derivatizado a 92°C durante 60 minutos com N-terc-butildimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamida (Sigma-Aldrich). Analisaram-se amostras de um µL dos extratos derivatizados num GC/MS (Shimadzu QP2010SE). A condição de funcionamento inicial foi de 100°C durante 6 min, seguida por um gradiente até 300°C a 6°C min⁻¹. A coluna utilizada para a separação foi um Agilent DB-5MS (30 m, I.D. 0,25 mm, 0,50 µm) com hélio como gás transportador a um caudal de 1 mL min⁻¹. A concentração endógena de ácido málico foi obtida por comparação das áreas de pico dos cromatogramas com um ácido salicílico comercial (1 mg / mL em metanol) (Sigma-Aldrich). Foi usado como padrão interno o ácido salicílico. O Δ do malato foi avaliado subtraindo o teor de ácido málico obtido ao amanhecer do teor ao anoitecer com resultados expressos como µmol de malato g⁻¹MS. As medições foram feitas em triplicatas.

Quantificação de açúcar solúvel

Para a quantificação de açúcar solúvel, as folhas de todos os tratamentos foram coletadas e analisadas utilizando um cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massa (GC/MS) como descrito por Pereira (2016), com pequenas modificações. O tecido foliar congelado a -20°C foi macerado com nitrogênio líquido e 100 mg foram homogeneizados em 500 µL de metanol: clorofórmio: água (12: 5: 1, v / v / v). A mistura foi mantida a 60 ° C durante 30 min. Em seguida, foram adicionados 500 µL de água e a mistura foi centrifugada a 16000 g, 4°C durante 10 min. Uma alíquota de 100 µL do extrato foi transferida para frascos e seca sob vácuo. O resíduo remanescente foi dissolvido em 25 µL de piridina e derivatizado a 92°C durante 60 min. com BSTFA (N, O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida) (Sigma-Aldrich). Utilizou-se GC / MS

(Shimadzu-QP2010SE) para analisar uma alíquota de 1 uL de amostra. A coluna permaneceu a 100° C durante 5 min, a rampa de temperatura de 100° C a 320° C a uma taxa de 8° C min⁻¹. A temperatura do injetor foi de 275°C, fluxo total de 19,8 mL min⁻¹ e velocidade linear de 46,0 cm s⁻¹. Para determinar as concentrações de açúcares solúveis nas amostras, utilizaram-se as curvas padrão de açúcar solúvel.

Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos com delineamento inteiramente casualizado com três repetições por tratamento. Cada repetição consistiu de seis plântulas (n = 18) para a análise de crescimento e o mesmo número de plântulas para pigmentos fotossintéticos. Um total de 130 mudas foi coletado para cada tratamento PEG 6000 para análise de ácidos orgânicos e carboidratos solúveis, outras 130 mudas foram utilizadas para a análise da atividade de PEPC, comparando os resultados com o teste de Tukey-Kramer a 5% de probabilidade. Para as análises anatômicas, foram utilizadas 5 plantas de cada tratamento (temperatura constante de 25°C ou termoperíodo de 30°C claro/15°C escuro) e 3 repetições.

Resultados

Temperatura constante (25°C) x termoperíodo (30/15°C)

Esta parte do experimento teve como finalidade verificar a influência da temperatura nas alterações do metabolismo de *A. imperialis*.

Conteúdo relativo de água

As análises das plantas mantidas na ausência de PEG, nas duas condições de temperatura mostraram não haver diferenças significativas do conteúdo relativo de água nos dois tratamentos térmicos, 25°C constantes ou no termoperíodo, 30/15°C (figura 1).

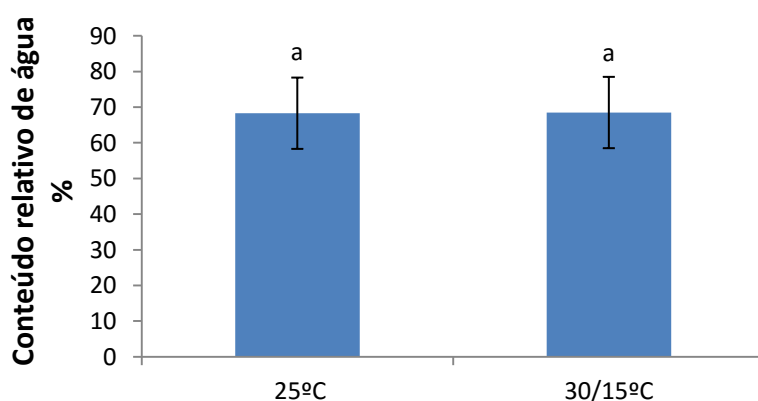


Fig.1. Conteúdo relativo de água em plantas de *Alcantarea imperialis* de 6 meses, cultivadas *in vitro* por 30 dias em meio M&S/2 em temperatura constante de 25°C e alternante 30/15°C. Letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre os tratamentos. ($P < 0,05$, teste de Tukey-Kramer).

Atividade da PEPC

Verifica-se na figura 2 que em temperatura constante não houve diferença nem aumento da atividade da PEPC, enquanto em termoperíodo existiu uma maior atividade da PEPC noturna comparada com a diurna, porém nas duas situações a atividade da PEPC foi maior em termoperíodo do que em temperaturas constantes, revelando potencial para produção de ácidos orgânicos durante o período noturno.

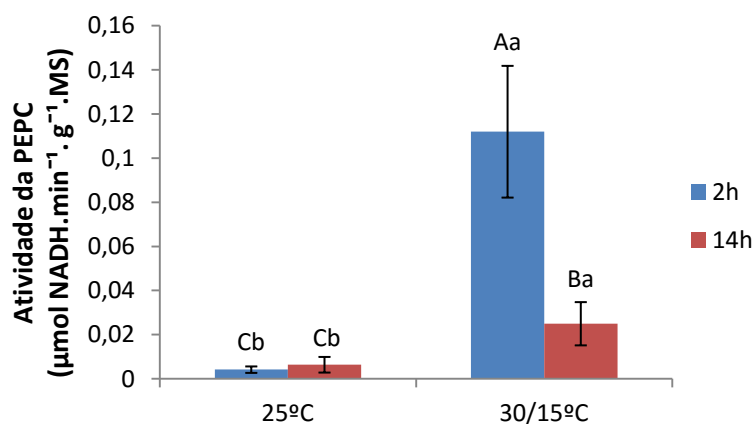


Fig.2.Atividade da PEPC em folhas de plantas de *Alcantarea imperialis* mantidas em temperatura constante de 25°C e alternante de 30/15°C por 30 dias e coletadas às 2h e às 14h.Os dados são expressos como a média de três amostras de repetição. Diferentes letras maiúsculas indicam médias significativamente diferentes entre os horários de coleta e diferentes letras minúsculas indicam médias significativamente diferentes entre diferentes concentrações no mesmo horário de coleta ($P < 0,05$, teste de Tukey-Kramer).

Conteúdo de Ácidos Orgânicos

As plantas mantidas tanto em temperaturas constantes quanto em termoperíodo por 30 dias não apresentaram acúmulo noturno de malato (Fig.3), apesar de apresentarem maior atividade da PEPC noturna (Fig. 2).

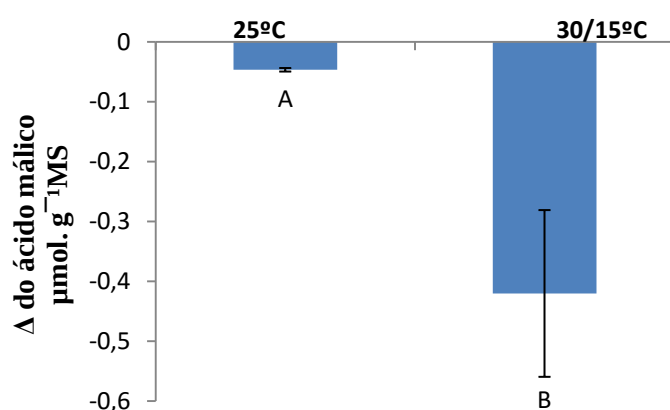


Fig.3.Acúmulo noturno de ácido málico em folhas de plantas de *Alcantarea imperialis* mantidas por 30 dias em temperaturas constantes de 25°C e alternantes de 30/15°C. Os dados são expressos como a média ($\pm$ DP) de três amostras de repetição. Diferentes letras indicam médias significativamente diferentes entre os tratamentos ($P < 0,05$, teste de Tukey-Kramer).

Conteúdo de carboidratos

A figura 4 mostra que as concentrações de frutose, glicose e sacarose foram maiores em termoperíodo e apenas a trealose neste experimento mostrou concentração menor. De modo geral, em temperaturas alternantes ocorreu aumento na concentração de açúcares solúveis em plantas jovens de *A. imperialis*.

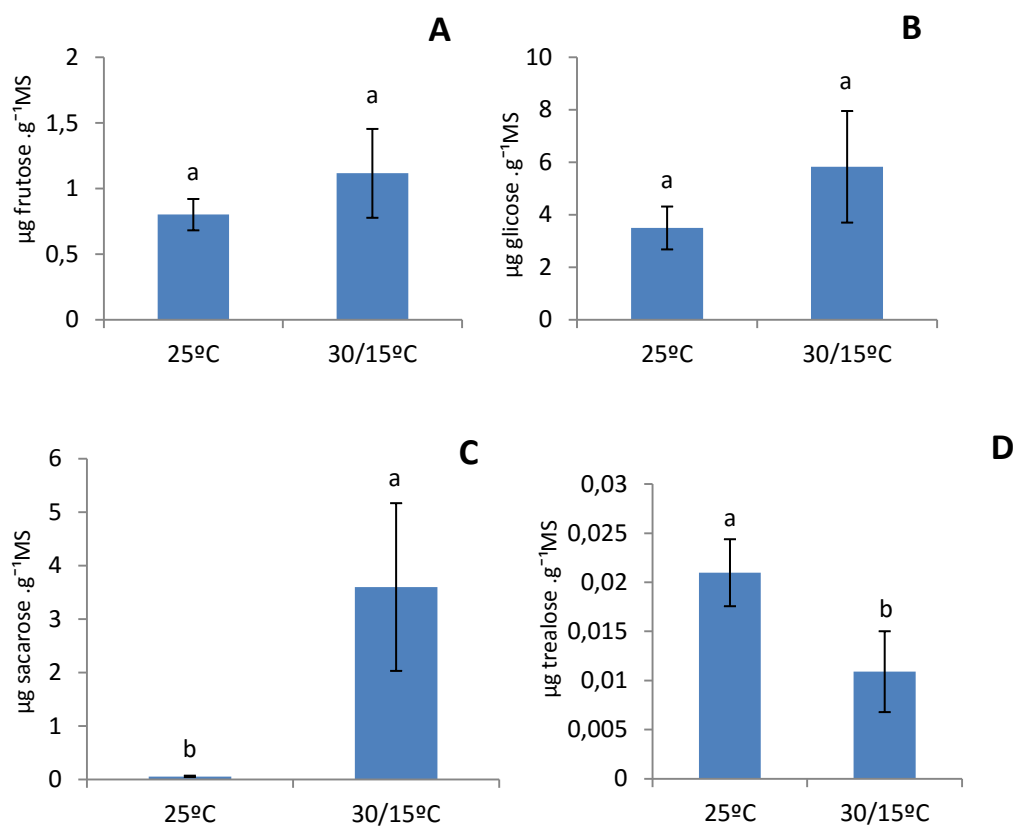


Fig. 4. Teor de açúcar solúvel: frutose (A), glicose (B), sacarose (C) e trealose (D) em folhas de plantas de *Alcantarea imperialis* mantidas em 25°C constantes e 30/15°C alternantes com fotoperíodo de 12h. Os dados são expressos como a média ($\pm$ DP) de três amostras de repetição. Diferentes letras indicam médias significativamente diferentes entre os tratamentos de temperatura ($P < 0,05$, teste de Tukey-Kramer).

Temperatura (25°C e 30/15°C) e simulação de falta de água por PEG

Conteúdo Relativo de água (CRA)

As plantas cultivadas por 30 dias nos diferentes tratamentos (com potenciais osmóticos de -0,5 MPa, -1,9 MPa e -8,5 MPa, em temperatura constante 25°C ou termoperíodo 30/15°C), não apresentaram diferença significativa no conteúdo relativo de água, apesar de ocorrer um leve decréscimo nas plantas mantidas em termoperíodo. Na figura 5 verificou-se que as plantas cultivadas sem PEG ou com 45% de PEG apresentaram o mesmo CRA tanto em temperatura constante quanto em termoperíodo.

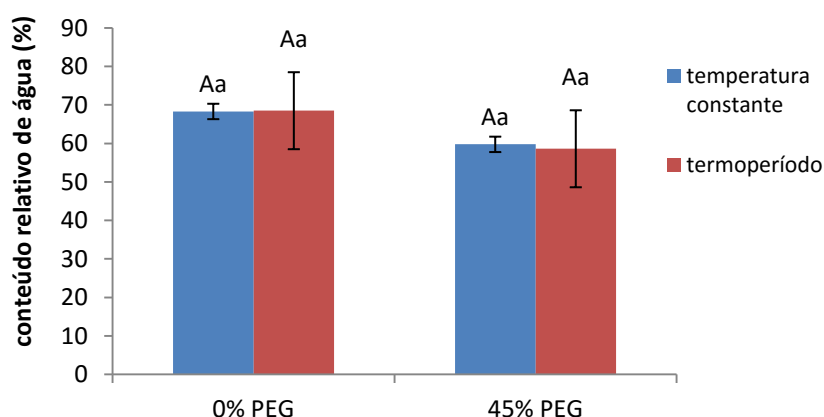


Fig.5. Conteúdo relativo de água em plantas de *Alcantarea imperialis* de 6 meses, cultivadas *in vitro* por 30 dias em meio M&S/2 sem PEG e com 45% de PEG, em temperatura constante de 25°C e termoperíodo 30/15°C. Letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre os tratamentos. ($P < 0,05$, teste de Tukey-Kramer).

Análise Anatômica

As folhas das plantas de *Alcantarea imperialis* (fig.6) cultivadas em meio M&S/2 com PEG 45% e termoperíodo 30/15 °C apresentaram menor espessura foliar em decorrência da menor espessura do parênquima aquífero e da epiderme de ambas as superfícies (adaxial e abaxial), quando comparadas com a espessura das folhas de

temperatura constante de 25°C (tabela 1). Em ambos os tratamentos, as células do parênquima aquífero, principalmente às da região central da folha, apresentaram contorno sinuoso em relação às células da região do bordo, sendo mais acentuado no tratamento de termoperíodo. No entanto, o parênquima clorofiliano de ambos os tratamentos não apresentou diferenças significativas (tabela 1).

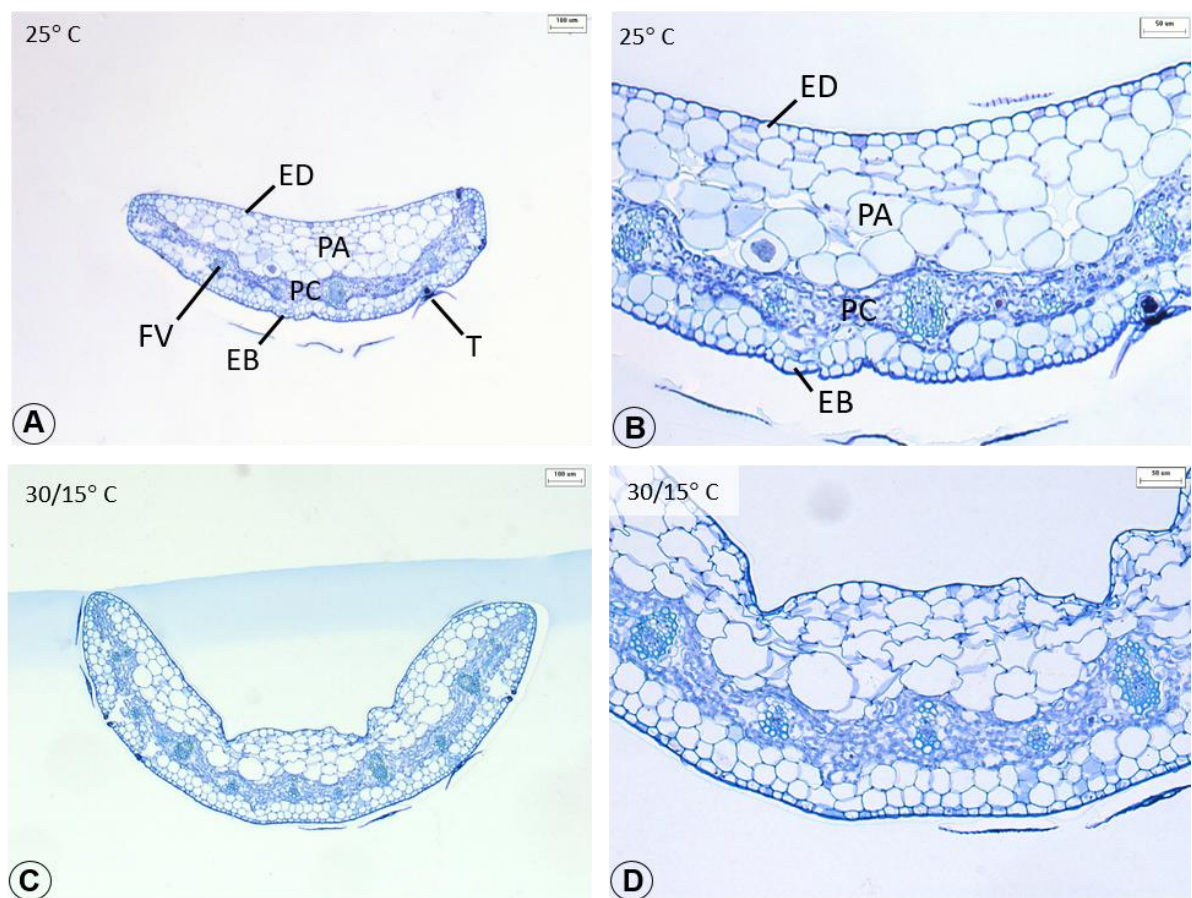


Fig. 6 Secções transversais do terço médio de folhas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* por 6 meses em meio M&S/2 e transferidas por 30 dias para meio M&S/2 sem ágar, nos tratamentos 45% de PEG com (A e B) temperatura constante (25°C) e (C e D) termoperíodo (30/15°C). EB = epiderme da superfície abaxial, ED = epiderme da superfície adaxial, FV = feixe vascular, PA = parênquima aquífero, PC = parênquima clorofiliano, T = tricoma.

Tabela 1. Espessura média do tecido foliar de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* durante 6 meses e transferidas para meio líquido durante 1 mês com PEG a 45% em temperatura constante 25°C e termoperíodo 30/15°C . Letras iguais na mesma coluna não são significativamente diferentes entre os tratamentos em nível de 5% (n = 15). (P<0,05, teste de Tukey-Kramer).

Tratamento	Epiderme da superfície adaxial (µm)	Epiderme da superfície abaxial (µm)	Parênquima aquífero adaxial (µm)	Parênquima clorofiliano (µm)	Parênquima aquífero abaxial (µm)	Espessura da folha(µm)	Razão parênquima aquífero/ clorofiliano
25°C	15,51 a	15,58 a	132,60 a	68,40 a	38,00 a	281,18 a	2,49
30/15°C	8,93 b	7,28 b	68,75 b	48,53 a	26,87 a	165,17 b	1,97

Atividade da PEPC

A atividade da PEPC foi avaliada em dois pontos: 2h (escuro) e 14h (claro) nas folhas de plantas de *A. imperialis* mantidas sob sem PEG, 7,5% ou 45% de PEG 6000 durante 30 dias (Figura 7). As plantas mantidas sob condição de temperatura constante (25°C) mostraram maiores atividades da PEPC em maiores concentrações de PEG 6000 (45% de PEG) no período noturno, enquanto sem PEG e 7,5% de PEG a maior atividade foi diurna. Em condição de termoperíodo (30/15°C) a maior atividade da PEPC foi noturna em todos os tratamentos de PEG, indicando que apenas o termoperíodo já é capaz de induzir uma maior atividade de PEPC no período noturno.

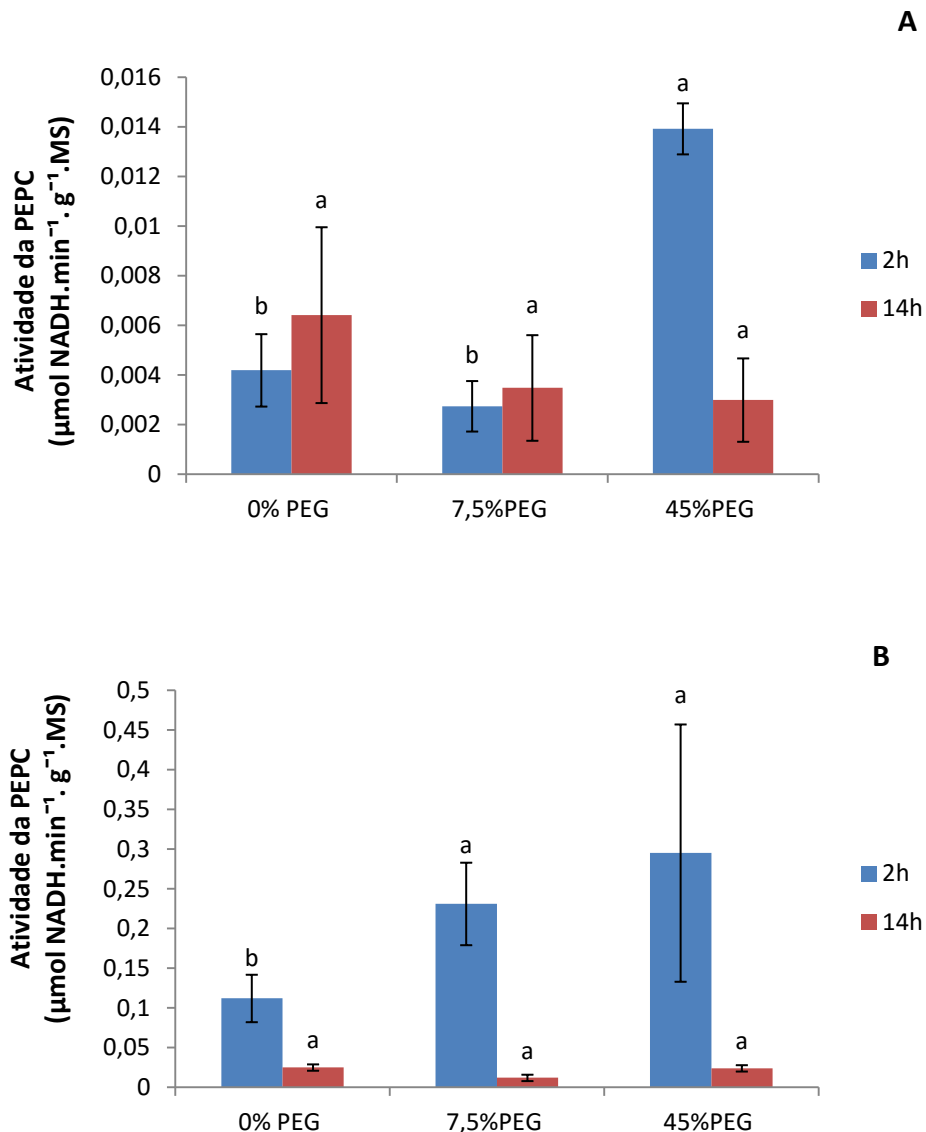


Fig.7. Atividade da PEPC em folhas de plantas de *Alcantarea imperialis* mantidas em diferentes concentrações de PEG 6000 (sem PEG, 7,5% e 45%) por 30 dias. **(A)** temperatura constante (25°C) e **(B)** termoperíodo (30/15 °C). Os dados são expressos como a média de três amostras de repetição. Diferentes letras minúsculas indicam médias significativamente diferentes entre diferentes concentrações de PEG no mesmo horário ($P < 0,05$, teste de Tukey-Kramer).

Ácidos Orgânicos

As plantas mantidas sem PEG durante 30 dias apresentaram acúmulo diurno de malato nas folhas (Fig. 8). Por outro lado, o acúmulo de malato foi observado durante o

período noturno para os tratamentos de 7,5% e 45% de PEG (Fig. 8). Nas plantas mantidas sob a associação das duas condições estudadas, simulação de falta de água e termoperíodo o acúmulo noturno é maior em 7,5% de PEG e reduzido em 45% de PEG, enquanto em temperatura constante, quanto maior a concentração de PEG maior o acúmulo noturno de malato.

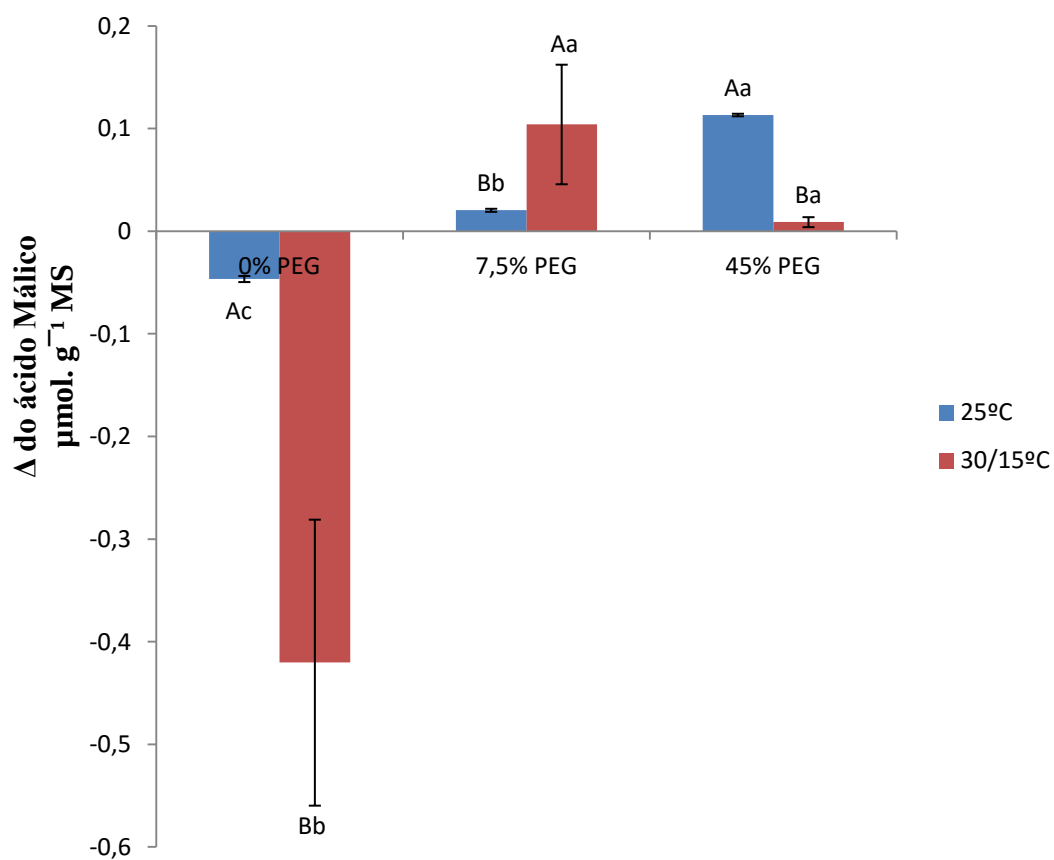


Fig.8. Acúmulo noturno de ácido málico em folhas de plantas de *Alcantarea imperialis* mantidas em diferentes concentrações de PEG 6000 (sem PEG, 7,5% e 45%) por 30 dias. Os dados são expressos como a média ($\pm$ DP) de três amostras de repetição. Diferentes letras maiúsculas indicam médias significativamente diferentes entre os mesmos tratamentos de PEG em condições de temperatura diferentes ($P < 0,05$, teste de Tukey-Kramer). Diferentes letras minúsculas indicam médias significativamente diferentes entre as diferentes concentrações de PEG nas mesmas condições de temperatura ($P < 0,05$, teste de Tukey-Kramer).

Conteúdo de citrato e fumarato

Além do ácido málico, foi observada a presença de outros ácidos orgânicos (Tabela 2), sendo bastante frequentes o citrato e o fumarato, que aparecem em concentrações mais altas em alguns tratamentos, como o citrato em 45% de PEG em temperatura constante no claro (período diurno) e 7,5% de PEG em temperatura constante no escuro (período noturno) e o fumarato em 45% de PEG em temperatura constante e 7,5% de PEG em temperatura constante, ambos no claro (período diurno). Também pode ser percebido esse fato na (figura 2), onde existe elevada atividade da PEP noturna e pouco acúmulo de malato.

Tabela 2. Conteúdo de citrato e fumarato (em $\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{MS}$) em folhas de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* em temperaturas constante (25°C) e em termoperíodo (30/15°C) nos tratamentos sem PEG, com 7,5% PEG e 45% PEG por 30 dias, $\pm$ DP. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as concentrações de PEG por tratamento de temperatura ($P < 0.05$; teste de Tukey-Kramer). Letras minúsculas diferentes indicam valores significativamente diferentes entre o tempo de cultivo no mesmo tratamento de PEG ($P < 0.05$; teste de Tukey-Kramer).

Período de coleta		Diurno			Noturno		
		sem PEG	7,5% de PEG	45% de PEG	sem PEG	7,5% de PEG	45% de PEG
citrato	25°C	0,043 $\pm$ 0,027A	0,011 $\pm$ 0,003B	0,029 $\pm$ 0,015AB	0,009 $\pm$ 0,000B	0,077 $\pm$ 0,068A	0,012 $\pm$ 0,014B
	30/15°C	0,047 $\pm$ 0,001B	0,002 $\pm$ 0,000C	0,100 $\pm$ 0,009A	0,011 $\pm$ 0,002B	0,020 $\pm$ 0,003A	0,031 $\pm$ 0,004A
fumarato	25°C	0,114 $\pm$ 0,000B	0,039 $\pm$ 0,026C	0,215 $\pm$ 0,126A	0,021 $\pm$ 0,002C	0,323 $\pm$ 0,210A	0,085 $\pm$ 0,010B
	30/15°C	0,090 $\pm$ 0,068A	0,000 $\pm$ 0,000B	0,062 $\pm$ 0,036A	0,005 $\pm$ 0,004B	0,005 $\pm$ 0,000B	0,028 $\pm$ 0,020A

Conteúdo de Carboidratos

A figura 9 mostra maior concentração de açúcares solúveis nas plantas que foram cultivadas na associação dos dois fatores estudados, simulação de falta de água e termoperíodo. Frutose e glicose apareceram em maiores concentrações nos tratamentos de termoperíodo em meio sem PEG e com 7,5% de PEG e em menor concentração no tratamento de termoperíodo e 45% de PEG. A sacarose apareceu em maiores concentrações em todos os tratamentos em termoperíodo e a trealose foi aumentando a concentração na medida em que foi aumentando a intensidade dos tratamentos impostos.

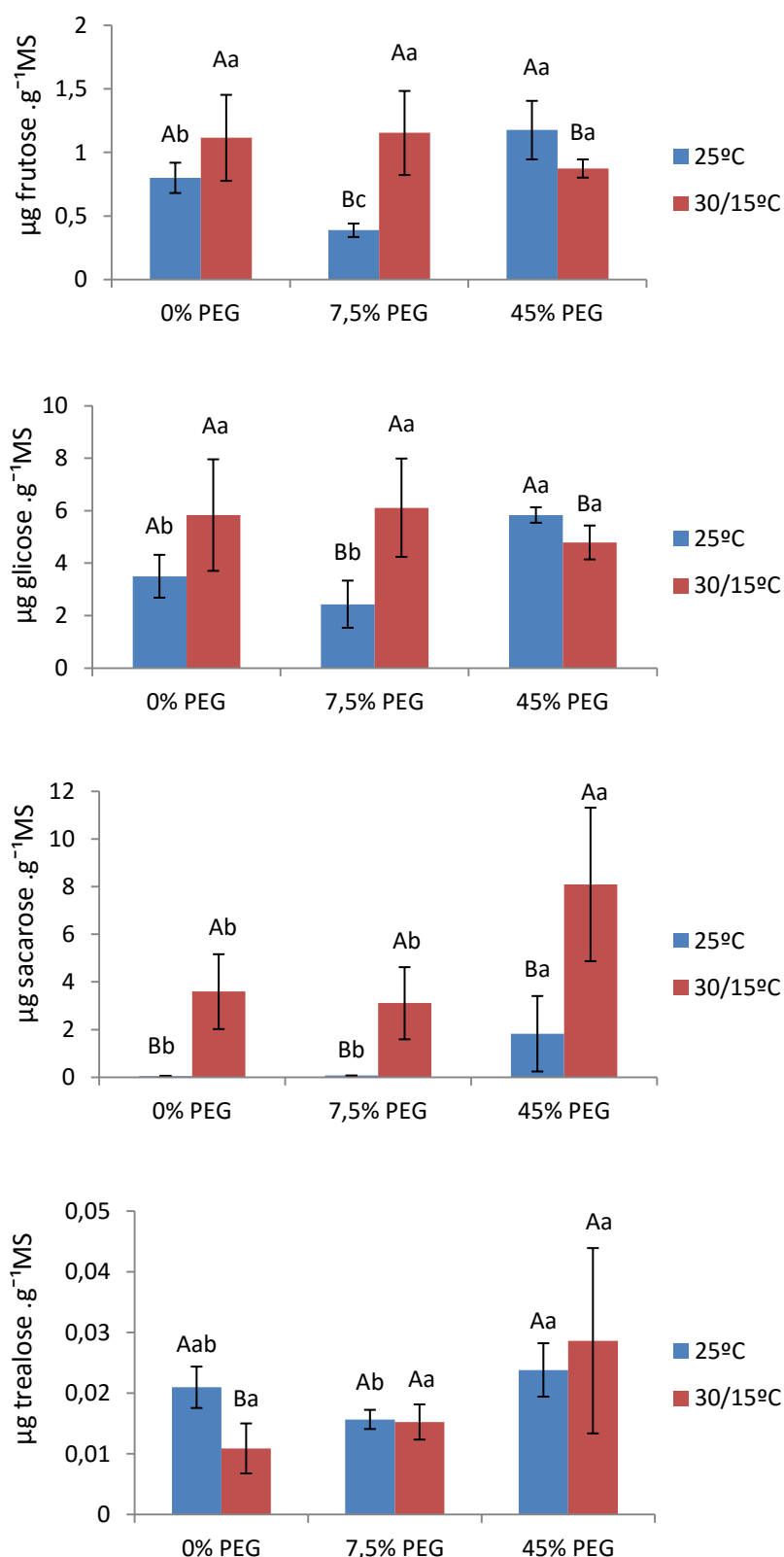


Fig.9. Teor de açúcar solúvel (frutose, glicose, sacarose e trealose) em folhas de plantas de *A. imperialis* mantidas em diferentes concentrações de PEG durante 30 dias. Os dados são expressos como a média ($\pm$ DP) de três amostras de repetição. Diferentes letras maiúsculas indicam médias significativamente diferentes entre os tratamentos de temperatura pela concentração de PEG ($P < 0,05$, teste de Tukey-Kramer). Diferentes letras minúsculas indicam médias significativamente diferentes entre as mesmas concentração de PEG no mesmo tratamento térmico ($P < 0,05$, teste de Tukey-Kramer).

Discussão

O objetivo do desenvolvimento deste trabalho foi levantar aspectos bioquímicos e/ou metabólicos que façam parte da estratégia de sobrevivência/ estabelecimento de plantas jovens de *Alcantarea imperialis* no ambiente rupícola da Serra dos Órgãos, até terem a capacidade de formar o tanque para armazenar a água.

Verificou-se que o conteúdo relativo de água nas folhas das plantas cultivadas *in vitro* por 30 dias em meio M&S/2 em temperatura constante de 25°C e termoperíodo 30/15°C (Fig. 1) se mantem iguais, não há redução e em meio M&S/2 sem ágar e com 45% de PEG (fig. 5) com o potencial osmótico de -8,5 MPa, apresente tendência a redução (não há diferença significativa), indicando que possivelmente mecanismos osmorreguladores estejam evitando a perda de água das células (Larcher 2006), da mesma forma que foi citado por Castillo et al. (2016) para a atmosférica *Tillandsia ionantha*, depois de 6 meses de seca, mantendo constantes níveis de água e potencial osmótico.

A característica anatômica mais representativa de CAM é a suculência, promovida por células do mesofilo grandes e indiferenciadas com vacúolos largos para armazenar ácidos, favorecendo o aumento da espessura foliar de CAM (Nelson et al 2005). Rodrigues et al. (2013), também compararam a espessura foliar do mesofilo de *Cattleya walkeriana* CAM que é maior, induzida pela seca, com *Oncidium* ‘Aloha’, não succulenta C₃. Aoyama (2010) já mostrou o grande parênquima aquífero de indivíduos jovens de *Alcantarea imperialis*, indicando a capacidade de armazenamento de água nesta espécie, o que poderia mostrar a capacidade de desenvolver o CAM.

Plantas CAM apresentam parênquima aquífero bem desenvolvido onde é armazenada água, porém este tecido não participa das funções metabólicas de CAM (Lüttge 2004). Nele existem solutos compatíveis, como carboidratos solúveis que

podem fazer a osmoproteção. Quando existe frio associado à falta de água, o CAM é ativado e aumenta a concentração de carboidratos solúveis.

Nos resultados deste trabalho se percebe que no tratamento de 45% de PEG em termoperíodo a planta tem sutilmente diminuída sua quantidade relativa de água, o que pode ser confirmado pelas análises anatômicas que indicaram que as plantas cultivadas em 45% de PEG em termoperíodo tem menor espessura foliar, de epiderme, de parênquima clorofiliano, de parênquimas aquíferos do que aquelas cultivadas em 45% de PEG com temperaturas constantes, além das células do parênquima aquífero adaxial apresentarem menor turgor, que indica menor quantidade de água (Bajji et al. 2001), nos mostrando que neste estresse severo (Ronchi et al. 2005) talvez o metabolismo da planta já não está conseguindo manter o CAM, voltando a acumular carboidratos, provavelmente para alterar a sua estratégia de sobrevivência, uma vez que o CAM é muito dispendioso energeticamente.

Analisando os resultados da influência da temperatura constante e termoperíodo, notamos que as plantas apresentam um aumento na produção de carboidratos solúveis, indicando que elas responderam ao fator temperatura, estas oscilações entre frio e calor em curto período de tempo fazem com que elas tenham a necessidade de se adaptarem rapidamente, portanto a osmorregulação parece ser um mecanismo eficiente neste caso (Bajji et al. 2001), então elas não desenvolvem o CAM nestas condições, não apresentam o acúmulo de malato noturno, porém apresentam um aumento da quantidade de outros ácidos orgânicos, como o citrato e o fumarato. No entanto verificamos que as plantas cultivadas sobre termoperíodo demonstraram um aumento da atividade da PEPC, que pode estar indicando uma alteração no metabolismo, mesmo que dissociado de CAM, por exemplo, com função anaplerótica (Pozoz et al. 2007).

Um dos tipos de compostos relacionados à osmoproteção são os carboidratos solúveis, como as hexoses e sacarose (Lüttge 2004). Mollo *et al.* (2011) verificaram que *A. imperialis* cultivadas *in vitro*, submetidas a temperaturas baixas apresentam alteração em seu metabolismo de carboidratos, diminuindo a reserva de amido e passando a produzir maiores quantidades de açúcares solúveis (Mollo et al 2011), como a trealose que é um carboidrato que apresenta funções relacionadas à proteção ao frio e demais estresses, como no caso de desidratação (Goddijn *et al.*, 1997). Em geral, o conteúdo de açúcares parece aumentar a tolerância ao frio e à seca, regulando o potencial osmótico e a proteção das membranas celulares (Ceusters *et al.* 2009; Ruelland *et al.* 2009; Carvalho *et al.* 2013). Foi demonstrado por Mollo *et al.* (2011) que, em termoperíodo, a quantidade de açúcares solúveis em plantas de *Alcantarea imperialis* com 9 meses de cultivo *in vitro* era maior do que em temperaturas baixas constantes (15°C) e em temperaturas altas constantes (30°C) e neste estudo, este fato se repetiu, sendo em termoperíodo a quantidade de açúcares solúveis maior.

De um modo geral a quantidade de carboidratos solúveis foi maior em plantas cultivadas em termoperíodo em comparação com as cultivadas em temperaturas constantes. A quantidade de Frutose e Glicose foi maior em termoperíodo tanto no tratamento sem PEG, quanto em 7,5% de PEG, mas em 45% de PEG em temperatura constante foi sensivelmente maior. Sacarose foi significativamente maior em todas as concentrações de PEG na condição de termoperíodo e a Trealose foi aumentando conforme aumentou a concentração de PEG também em termoperíodo. Podemos supor que quanto maior o estresse imposto maior a produção de carboidratos, a fim de proteger a planta contra a desidratação, da mesma forma como citado por Renaut *et al.* (2005) para *Populus tremula* e *Populus tremuloides*.

Neste trabalho foram demonstrados os resultados para o ácido málico (fig 8), citrato e fumarato (tabela 2). O Δ do Malato foi indicado pela subtração da quantidade de malato noturno pelo diurno. No cálculo do Δ do Malato, o resultado positivo no gráfico indica a acidez noturna deste tecido, revelando o CAM. Foi verificado que tanto em temperatura constante quanto termoperíodo, sem a adição de PEG a planta não apresenta acúmulo noturno de malato, indicando ser C3, já em 7,5% de PEG ou 45% de PEG, em temperatura constante ou termoperíodo, existe o acúmulo noturno de Malato, indicando que a planta desenvolveu o CAM. Porém em condição de termoperíodo e 45% de PEG houve um acúmulo menor de Malato noturno, podendo este fato estar relacionada ao estresse mais intenso a que a planta foi submetida, pois como já demonstramos, com 45% de PEG e termoperíodo, a planta apresenta menor espessura das folhas, menor turgor das células do parênquima aquífero adaxial e menor quantidade de glicose e frutose. Talvez neste tratamento os mecanismos de adaptação ao estresse não estejam sendo suficientes para a manutenção da planta e ela deva modificar seu metabolismo para poder sobreviver.

Outros tipos de ácidos orgânicos muito frequentes nas plantas CAM, que foram encontrados em praticamente todos os tratamentos relacionando temperatura e PEG, são o citrato e o fumarato (tabela 2), que apesar de não estarem relacionados às funções metabólicas de CAM (Lüttge 2004), são relacionados com outras funções do metabolismo como ciclo de Krebs, fechamento estomático, redução do nitrato, crescimento e outros (Araújo et al 2011).

Foi verificada a atividade da PEPC em dois pontos, um no período noturno (2h) e outro no período diurno (14h), nas plantas cultivadas em temperaturas constantes e em termoperíodo e nas 3 condições de PEG 6000 (sem PEG, 7,5% e 45%). Nas plantas CAM, o CO₂ é fixado no período noturno pela ação da PEPC e fixado nos vacúolos

como ácido málico (Cushman& Borland, 2002). Portanto em plantas CAM, existe maior atividade da PEPC no período noturno, no nosso caso a coleta das 2h.

Nas plantas cultivadas em temperatura constante de 25°C, observamos que sem PEG, existe maior atividade da PEPC às 14h, em 7,5% de PEG, a diferença entre a atividade da PEPC diurna e noturna vai diminuindo e em 45% de PEG se inverte, havendo maior atividade no período noturno. Já nas plantas cultivadas em termoperíodo, a maior atividade da PEPC sempre ocorre no período noturno. Apontando que desde o controle (sem PEG) já existe atividade noturna de PEPC induzida pelo termoperíodo, que vai sendo intensificada com o aumento da concentração de PEG. Assim, os dois fatores abióticos temperatura alternante e falta de água intensificam ou modificam as respostas da planta ao estresse (Prasch & Sonnewald 2015).

Pode-se interpretar após a verificação dos resultados obtidos que *Alcantarea imperialis* é uma espécie que apresenta muita plasticidade e quando se encontra em seu estado juvenil, atmosférico (sem formação de tanque), consegue se estabelecer de acordo com o ambiente em que se encontra alterando seu metabolismo. Em condições de temperaturas constantes ou de termoperíodo (amplitudes térmicas) e sem falta de água estabelece o mecanismo fotossintético C₃, em condições de pouco estresse, como falta de água moderada, -1,9MPa (Ronchi et al. 2005), e/ou termoperíodo, usa o mecanismo osmoprotetor, com maior produção de açúcares solúveis, como maneira de evitar a perda de água e manter integras as membranas celulares e consegue se manter assim, mas em condições de estresse severo, pela simulação de falta de água de -8,5 MPa (Ronchi et al 2005) mesmo com temperaturas constantes de 25°C ou termoperíodo, ou ainda em falta de água moderada de -1,9 MPa com termoperíodo, desenvolve o CAM, como mecanismo para se manter, mas na condição de 45% de PEG adicionado

ao termoperíodo, existe ainda o CAM, mas em menor intensidade e a planta parece tentar mudar novamente seu metabolismo, voltando a produzir maiores quantidades de carboidratos solúveis.

Estes resultados indicam que a temperatura ambiental pode não ser decisiva por si na indução do CAM, mas age intensificando o impacto de outros fatores (Lüttge 2004), como a simulação de falta de água demonstrada neste trabalho.

Referências bibliográficas

- Aoyama, E. M. 2010. Propagação *in vitro* e em estufa de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms (Bromeliaceae) apartir de sementes. Tese apresentada ao Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente, SP.
- Aoyama, E. M., Versieux, L. M., Nievola, C. C., Mazzoni-Viveiros, S. C. 2012. Avaliação da eficiência da propagação de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms (Bromeliaceae) cultivada *in vitro* e *ex vitro*. Rodriguésia 63(2): 321-331.
- Araújo, W.L., Nunes-Nesi, A., Fernie, A. R. 2011. Fumarate: Multiple functions of a simple metabolite. Phytochemistry, vol 72, Issue 9, pg 838-843.
- Bajji, M., Lutts, S., Kinet, J.M., 2001. Water deficit effects on solute contribution osmotic adjustment as a function of leaf ageing in three durum wheat cultivars performing differently in arid conditions. Plant Sci. 160(4), 669-681.
- Barbará, T., Lexer, C., Martinelli, G., Mayo, S., Fay, M.F., Heuertz, M. 2008. Within-population spatial genetic structure in four naturally fragmented species of a neotropical inselberg radiation, *Alcantarea imperialis*, *A. geniculata*, *A. glaziouana* and *A. regina* (Bromeliaceae) Heredity 101, 285–296 & 2008 Macmillan Publishers Limited.
- Borland, A.M., Zambrano, V.A.B., Ceusters, J., Schorrock, K., 2011. The photosynthetic plasticity of crassulacean acid metabolism: an evolutionary innovation for sustainable productivity in a changing world. New Phytol. 619-633.
- Browse, J. & Xin, Z. 2001. Temperature sensing and cold acclimation. Current Opinion in Plant Biology 4: 241-246.

- 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 temperature. *Plant Physiology and Biochemistry* 71:144-154.
- Castillo, R.J., Cervera, J.C. and Navarro-Alberto, J. 2016. Drought and extreme temperature tolerance for *Tillandsia dasyliriifolia*, an epiphytic bromeliad from the northern coastal dune scrubland in Yucatan, Mexico. *Botanical Sciences* 94 (1): 121-126.
- Ceusters, J., Borland, A.M., De Proft, M.P., 2009. Drought adaptation in plants with crassulacean acid metabolism involves the flexible use of different storage carbohydrate pools. *Plant Signal Behav.* 4(3), 212-214.
- Coutinho, L. M. & Schrage, C. A. F. 1970. Sobre o efeito da temperatura na ocorrência de fixação noturna de CO₂ em Orquídeas e Bromélias. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 42 (4): 843-849.
- Crayn DM, Winter K, Smith JAC. 2004. Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the Neotropical family Bromeliaceae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 3703-3708.
- Cushman, J. C. & Borland, A. M. 2002. Induction of Crassulacean acid metabolism by water limitation. *Plant, Cell and Environment* 25,295–310.
- Fleta-Soriano,E., Pintó-Marijuan, M., Munné-Bosch, S. 2015. Evidence of Drought Stress Memory in the Facultative CAM, *Aptenia cordifolia*: Possible Role of Phytohormones. *PLOS ONE journal*.pone.0135391 August 14, 2015
- Goddijn, O.J.M., Verwoerd, T.C., Voogd, E., Krutwagen, R.W.H.H., Graaf, P.T.H.M., Poels, J., Van Dun, K., Ponstein, A.S., Damm, B., Pen, J. 1997. Inhibition of

- Trehalase Activity Enhances Trehalose Accumulation in Transgenic Plants. *Plant Physiology* 113:181-190.
- Haag-Kerwer, A.; Franco, A. C.; Lüttge, U. 1992. The effect of temperature and light on gas exchange and acid accumulation in the C3-CAM plant *Clusia minor* L. *J. Exp. Bot.* 43:345–352.
- Herrera, A., 2009. Crassulacean acid metabolism and fitness under deficit stress: if not for carbon gain, what is facultative CAM good for? *Ann Bot.* 103, 645-653.
- Heyduk, K., Burrell, N., Lalani, F., Leebens-Mack, J., 2016. Gas exchange and leaf anatomy of a C3-CAM hybrid, *Yucca gloriosa* (Asparagaceae). *J Exp Bot.* 67(5), 1369-1379.
- Janska, A. Mars, P., k., Zelenkova, S. & Ovesna, J. 2010. Cold stress and acclimation – what is important for metabolic adjustment? *Plant Biology* 12: 395–405.
- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27:137-138.
- Klerk, G. D. & Pumutapon, P. 2008. Protection of in vitro grown *Arabidopsis* seedlings against abiotic stresses. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 95:149-154.
- Larcher, W. 2006. *Ecofisiologia Vegetal* RiMa, São Carlos, SP, 398p.
- Lüttge, L. 2004. Ecophysiology of crassulacean acid metabolism (CAM). *Ann. Bot.* 93:629–652.
- Majada, J. P., Tadeo, F., Fal, M. A. & Sánchez-Tamés, R. 2000. Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63: 207-214.
- Majerowicz, N. 2008. Fotossíntese. pp.82-133. in Kerbaudy, G.B. *Fisiologia Vegetal* – 2ª. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

- McIlvaine, T.C. 1921. A buffer solution for colorimetric comparison. J. Biol. Chem. 1921, 49:183-186.<http://www.jbc.org/content/49/1/183>.
- Meirelles, S.T., Pivello, V.R., Joly, C.A. 1998. The vegetation of granite rock outcrops in Rio de Janeiro, Brasil, and the need for its protection. Environmental Conservation 26(1)10-20.
- 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 Tiss Organ Cult 107:141–149.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant. 15: 473-497.
- Nelson, E. A., Sage, T.L., Sage, R.F. 2005. Functional leaf anatomy of plants with crassulacean acid metabolism. Functional Plant Biology 32: 409-419.
- Nelson, E.A., Sage, R.F. 2008. Functional constraints of CAM leaf anatomy: tight cell packing is associated with increased CAM function across a gradient of CAM expression. Journal of Experimental Botany 59(7): 1841-1850.
- 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 Plant Cellular & Developmental Biology 41: 832-837.
- Pereira, P.N. 2016. Influência das fontes de N e do déficit hídrico sobre a expressão de aquaporinas e/ou transporte de ácidos orgânicos em plantas CAM. IB- USP.
- Pereira, P.N., Purgatto, E., Mercier, H., 2013. Spatial division of phosphoenolpyruvate carboxylase and nitrate reductase activity and its regulation by cytokinins in CAM-induced leaves of *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae). Journal Plant Physiol. 170: 1067-1074.

- Porembski, S. 2007. Tropical inselbergs: habitat types, adaptive strategies and diversity patterns. *Revista Brasil. Bot.*, V.30, n.4, p.579-586
- Pozoz, R.L., Garcia, J.L.A, Hernández, A.B. 2007. La enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa em El metabolismo central de los vegetales. *Temas de ciência y tecnologia* vol 11. Nnº2 pg 23-31.
- Prasch, C.M. & Sonnewald, U. 2015. Signaling events in plants: Stress factors in combination change the picture. *Environmental and experimental botany* 114: 4-14.
- Rainha, N., Medeiros, V.P., Ferreira, C., Raposo, A., Leite, J.P., Crus, C., Pacheco, C.A., Ponte, D., Silva, A.B., 2016. Leaf malate and succinate are out of phase throughout the development of the CAM plant *Ananas comosus*. *Plan Physiol Biochem.* 100, 47-51.
- Renaut, J., Hoffmann, L. & Hausman, J.F. 2005. Biochemical and physiological mechanisms related to cold acclimation and enhanced freezing tolerance in poplar plantlets. *Physiologia Plantarum* 125: 82-94.
- Rodrigues, M.A., Matiz, A., Cruz, A.B., Matsumura, A.T., Takahashi, C.A., Hamachi, L., Félix, L.M., Pereira, P.N., Lantansio-Aidar, S.R., Aidar, M.P., Demarco, D., Freshi, L. Mercier, H. and Kerbaudy, G.B.** 2013. Spatial patterns of photosynthesis in thin- and thick-leaved epiphytic orchids: unravelling C₃-CAM plasticity in an organ-compartmented way. *Annals of Botany* 112: 17-29.
- Ronchi, C.P., Caten, A.T., Moraes, B.K., Batista, K.D., Chaves, A.R.M. & Da Matta, F. 2005. Efeitos de taxas de imposição e severidade do déficit hídrico sobre a fotossíntese em folhas de *Coffea canephora* www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/spcb_anais/simposio4/p36.pdf

- Ruelland, E., Vaultier, M.N., Zachowski, A., Hurry, V., 2009. Cold signaling and cold acclimation in plants. *Adv Bot Res.* 49, 35-150.
- Sakai, W.S. 1973. Simple method for differential staining of parafin embedded plant material using toluidine blue. *Stain Technology* 48: 247-249.
- Ting I.P. 1985. Crassulacean Acid Metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 36, p. 595-622. University Press, New York.

Considerações Finais e Perspectivas

Alcantarea imperialis é uma planta rupícola, nativa da Serra dos Órgãos (RJ), que está adaptada a viver em condições de alta irradiância, alternância de temperatura e escassez de água e nutrientes, típicos de regiões de rochas (Inselbergues) (Porembski 2007, Barbará, 2008), de onde ela é nativa. Indivíduos adultos desta espécie de bromélia possuem as bainhas de suas folhas bastante imbricadas e sobrepostas, formando um tanque para armazenar água (Versieux & Wanderley 2015), o que as tornam capazes de passar por mais tempo sem perecer pela falta de água e acabam por isso desempenhando um papel ecológico importante, na medida em que se tornam um ambiente propício à vida de outros seres vivos (fitotelmo) e daí também podem obter nutrientes (Versieux & Wanderley 2015).

O presente trabalho surgiu da necessidade de investigar quais os mecanismos fisiológicos que fazem com que plantas jovens, atmosféricas, que não formam tanque para armazenar água, consigam sobreviver fixadas à rocha. São amplamente descritos na literatura mecanismos fisiológicos utilizados para adaptação por plantas destes ambientes como a osmoproteção, a proteção contra o frio (Muller et al. 2001, Peterbauer and Richter, 2001; Bajji et al. 2001; Mahajan & Tuteja, 2005; Hinch et al. 2006; Klerk and Pumutapon, 2008; Guy et al. 2008; Klerk & Pumutapon, 2008; Xoconostle-Cázares et al. 2011) e o CAM (Smith et al. 1986; Pereira et al. 2013), o que faz supor que esta espécie pudesse quando jovem desenvolver algum deles ou ambos.

Durante este trabalho, foram estipuladas duas condições de tratamentos para estudo: simulação de falta de água (pelo cultivo de plantas em meio de cultura com adição de diferentes concentrações de PEG6000, de modo a simular a redução da

disponibilidade hídrica) e outro que associou a falta de água à presença do termoperíodo (termoperíodo 30/15°C).

Quando cultivadas em temperaturas constantes com as diferentes concentrações de PEG 6000, foi demonstrado que as plantas cultivadas em 7,5% de PEG (-1,9 MPa) produzem maiores concentrações de carboidratos solúveis do que nos demais tratamentos e que o Δ do ácido málico é negativo sem PEG (-0,5 MPa), começa a se tornar positivo com 30 dias de exposição ao tratamento de 7,5% de PEG (-1,9 MPa) e é positivo em 45% de PEG (-8,5 MPa), indicando que há acúmulo de ácido noturno nesses tratamentos. Com isso se pode concluir que a planta cultivada com 7,5% de PEG está submetida a uma falta de água que consegue manter com o aumento da produção de carboidratos, por um período de até um mês, esses açúcares irão agir como osmoprotetores contribuindo para reduzir a perda de água pelas células ou agindo como estabilizadores das membranas celulares, enquanto este mecanismo não foi suficiente em mais de 30 dias com 7,5% de PEG ou 45% de PEG, quando ela manifestou o CAM desde a primeira semana, para garantir a menor perda de água.

No experimento que envolveu só o efeito da temperatura (constante de 25°C e o termoperíodo 30/15°C), as concentrações de carboidratos solúveis foram maiores nas plantas cultivadas sob termoperíodo (exceto a trealose que apresentou concentração em torno de 25% menor) e o Δ do ácido málico foi negativo nas duas condições, demonstrando que a planta não manifesta o CAM, mas os carboidratos podem estar agindo como protetores contra o frio. A temperatura sozinha não induziu o CAM.

Quando se associa as duas condições, temperatura e falta de água, verifica-se que a produção de frutose e glicose já é maior nos tratamentos em termoperíodo mesmo sem a simulação de falta de água, mas reduz um pouco em 45% de PEG, enquanto sacarose e trealose aumentam em 45% de PEG. O Δ do ácido málico apresenta valores

positivos em 7,5% de PEG, indicando que a associação dos dois fatores faz com que o CAM ocorra nessa concentração de PEG. Contudo, em 45% de PEG as concentrações de ácido Málico reduzem, indicando que a planta não estaria tolerando essa condição, mas os carboidratos continuam sendo produzidos em quantidades crescentes, anatomicamente não foi observado prejuízo do parênquima clorofiliano, indicando que ela esteja novamente modificando seu metabolismo para tolerar esta falta de água prolongada.

É uma indicação de que esta planta consiga uma modulação de CAM, uma vez que vai modificando o metabolismo a medida que aumenta o tempo de exposição ao estresse. Levitt (1980) demonstrou que, o déficit hídrico, proporciona ajustes fisiológicos na planta que determinam respostas adaptativas anatômicas e morfológicas de acordo com a espécie e o estado de desenvolvimento, além da duração da intensidade do déficit hídrico, utilizando mecanismos que reduzam a perda de água.

Como fartamente documentado na literatura consultada (Bajji et al. 2001; Muller et al. 2001; Peterbauer and Richter 2001; Mahajan & Tuteja 2005; Hinch et al. 2006; Klerk & Pumitapun 2008; Guy et al. 2008; Xoconostle-Cázares et al. 2011; entre outros) a proteção ao resfriamento pode ser feita por carboidratos e proteínas específicas, por meio da estabilização de lipídios e proteínas da membrana celular durante a desidratação induzida por temperaturas baixas. Sendo assim, açúcares de pesos moleculares menores (como glicose, frutose, sacarose, trealose) foram encontrados nas plantas de *A. imperialis* em quantidades mais expressivas naquelas cultivadas sob termoperíodo, e poderiam estar relacionados com a tolerância dessas plantas ao frio.

Segundo Ronchi et al. (2005), é considerado déficit hídrico moderado aquele de potencial osmótico -2MPa e déficit hídrico severo o de potencial de potencial osmótico

-4 MPa. Nos tratamentos realizados, sem PEG tem um potencial osmótico de -0,5 MPa, 7,5% de PEG tem potencial osmótico de -1,9 MPa, sendo portanto considerado estresse moderado e 45% de PEG tem potencial osmótico de -8,5 MPa, sendo considerado como estresse severo.

Na figura 1 destas considerações finais, podemos comparar o Δ do ácido málico nas três condições estudadas: o primeiro gráfico mostra os experimentos sem simulação de falta de água (-0,5 MPa) , mas nas diferentes condições térmicas. Percebemos que todos os valores foram negativos, indicando que todas desenvolveram o metabolismo C_3 . No segundo gráfico comparamos todos os tratamentos com 7,5% de PEG e já percebemos que todos os valores foram positivos, indicando que com 30 dias de exposição a simulação de falta de água moderada as plantas já apresentam CAM e no terceiro gráfico, comparamos todos os tratamentos com 45% de PEG e verificamos que todos foram positivos, indicando o CAM também. Neste caso, é interessante verificar, que com 30 dias de exposição a simulação de falta de água severa associado ao termoperíodo a planta parece não estar tolerando e caem os valores do Δ do ácido málico, mostrados acima. Podemos inferir por estes resultados, que é a falta de água que é o indutor do CAM, porém o termoperíodo faz intensificar a condição.

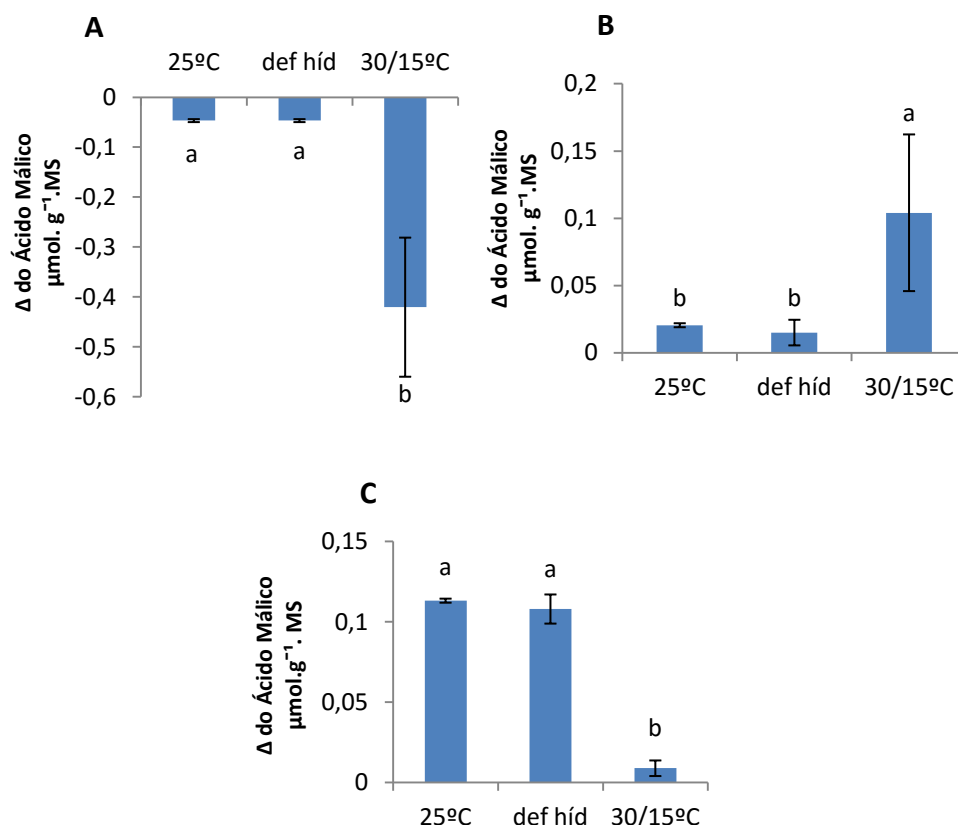


Fig. 1. Acúmulo noturno de ácido málico em folhas de plantas de *Alcantarea imperialis* mantidas em diferentes concentrações de PEG 6000 (0% **A**, 7,5% **B** e 45% **C**) por 30 dias nas três condições estudadas: temperatura constante de 25°C, simulação de falta de água em temperatura constante de 25°C (def híd) e termoperíodo 30/15°C. Os dados são expressos como a média ($\pm$ DP) de três amostras de repetição. Diferentes letras minúsculas indicam médias significativamente diferentes entre as diferentes condições ($P < 0,05$, teste de Tukey-Kramer).

Como foi demonstrado neste trabalho *A. imperialis*, quando jovem pode se adaptar as condições abióticas apresentadas de duas maneiras, quando o estresse é de menor intensidade, considerado moderado segundo Ronchi et al. (2005), ela aumenta a produção de carboidratos, para regular a quantidade de água nas células pela osmoproteção ou a integridade das membranas, como é citado o papel da trealose por diversos autores (Goddijin et al. 1997; Müller et al. 2001; Fernandez et al. 2010), um dissacarídeo não redutor constituído de duas moléculas de glicose, capaz de criar um estado vítreo e proteger as membranas das injúrias causadas pelo frio e diversos outros

estresses abióticos. Já com um estresse de maior intensidade (severo, segundo Ronchi et al. 2005), ela desenvolve o CAM, mecanismo que faz com que a planta tenha maior eficiência do uso da água, porém que tem consumo energético maior. Ainda pudemos verificar que com concentrações de PEG maiores do que 45%, as plantas não sobreviveram há 30 dias mesmo em temperaturas constantes (anexo fig. 1, 3 e 4).

Em estudo anterior (Mollo et al. 2011), já foi verificado que *A. imperialis* teve as maiores alterações na produção de carboidratos no tratamento termoperiódico (15/30 °C) e o termoperíodo é a condição que se aproxima mais do ambiente em que essas plantas ocorrem na natureza, fica evidenciado ainda que os carboidratos produzidos nesta condição possam estar envolvidos na proteção das plantas ao frio e a falta de água, como verificamos nos anexos, figura 4 que foram estudados e escolhidos os potenciais osmóticos que iríamos utilizar nesta pesquisa.

Como já foi dito nos capítulos anteriores, a característica anatômica mais representativa de CAM é a succulência, promovida por células do mesofilo grandes e indiferenciadas com vacúolos largos (Nelson et al. 2005). Neste trabalho foi demonstrado pelos cortes anatômicos que as plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* apresentam a capacidade de armazenar água, já que o parênquima aquífero apresenta células deste tipo, tendo então a capacidade anatômica de desenvolver o CAM. Foram feitos cortes anatômicos das folhas das plantas coletadas na Serra dos Órgãos, com a finalidade de verificar como elas são na natureza. As plantas coletadas tinham o tamanho aproximado daquelas cultivadas *in vitro* por seis meses. Como é possível observar no anexo Fig. 2. deste trabalho, as características da anatomia se mantém, embora as folhas se mostrassem mais robustas, apresentando maior número de camadas de células do parênquima aquífero e portanto maior espessura foliar, mas as células deste parênquima apresentaram contorno sinuoso em relação às células da região

do bordo, como foi visto nas plantas cultivadas *in vitro* com maior concentração de PEG.

Este trabalho tem o intuito de fornecer subsídios para estudos importantes que devem ser realizados como perspectivas para a evolução do conhecimento de indução de CAM, como por exemplo, se esta espécie pode ser confirmada como CAM facultativa, isto é se depois que manifesta o CAM pode retornar a C_3 , quando a disponibilidade hídrica volta ao normal e o que pode ocorrer em situações de alta temperatura. Neste caso poderia ser considerada uma CAM-facultativa. Embora esta reversão seja documentada na espécie *Guzmania monostachia* (Kerbaudy et al. 2012), não há trabalhos sobre a bromélia imperial.

A verificação da plasticidade de *A. imperialis* em relação à temperatura e a falta de água pode contribuir para futuros estudos que visem à investigação de mecanismos fisiológicos relacionados à sobrevivência em ambientes considerados estressantes, como aquele onde essa bromélia habita, além do estudo dos genes que possam controlar estas alterações fisiológicas, garantindo a sobrevivência a estes fatores de uma maneira rápida e eficiente. O fato desta espécie sobreviver em condições extremas de seca, alta irradiância e escassez de nutrientes, pode apontar para a utilização dessa bromélia como um interessante modelo para estudos sobre as mudanças climáticas e adaptação de diversas espécies vegetais às novas condições impostas pela seca e mudanças de temperaturas.

Referências bibliográficas

- Bajji, M., Lutts, S., Kinet, J.M., 2001. Water deficit effects on solute contribution osmotic adjustment as a function of leaf ageing in three durum wheat cultivars performing differently in arid conditions. *Plant Sci.* 160(4): 669-681.
- Barbará, T., Lexer, C., Martinelli, G., Mayo, S., Fay, M.F., Heuertz, M. 2008. Within-population spatial genetic structure in four naturally fragmented species of a neotropical inselberg radiation, *Alcantarea imperialis*, *A. geniculata*, *A. glazioviana* and *A. regina* (Bromeliaceae) *Heredity* 101: 285–296 & 2008 Macmillan Publishers Limited.
- Fernandez, O., Bethencourt, L., Quero, A., Sangwan, R. S. & Clement, C. 2010. Trehalose and plant stress responses: friend or foe? *Trends in Plant Science* 15: 409-417.
- Goddijn, O.J.M., Verwoerd, T.C., Voogd, E., Krutwagen, R.W.H.H., Graaf, P.T.H.M., Poels, J., Van Dun, K., Ponstein, A.S., Damm, B., Pen, J. 1997. Inhibition of Trehalase Activity Enhances Trehalose Accumulation in Transgenic Plants. *Plant Physiology* 113:181-190.
- Guy, C.L., Kaplan, F., Kopka, J., Selbig, J., Hinch, D.K., 2008. Metabolomics of temperature stress. *Physiol Plant.* 132: 220-235.
- Hinch, D.K., Popova, A.V., Cabela, A., 2006. Effects of sugars on the stability of lipids membranes during drying. In: Leitmannova LA (ed) *Advances in planar lipid bilayers and liposomes*. Elsevier, Amsterdam, pp. 189-217.
- Kerbaui, G.B., Takahashi, C.T., Lopez, A.M., Matsumura, A.T., Hamachi, L., Félix, L.M., Pereira, P.N., Freschi, L. and Mercier, H. (2012). *Crassulacean Acid Metabolism in Epiphytic Orchids: Current Knowledge, Future Perspectives, Applied Photosynthesis*, Dr Mohammad Najafpour (Ed.), InTech, DOI:

10.5772/29144. Available from: <https://www.intechopen.com/books/applied-photosynthesis/crassulacean-acid-metabolism-in-epiphytic-orchids-current-knowledge-future-perspectives>

Klerk, G. D. & Pumisutapon, P. 2008. Protection of in vitro grown *Arabidopsis* seedlings against abiotic stresses. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 95:149-154.

LEVITT, J. Response of plants to enviropmental stress. II: Water radiation, salt and other stress. New York: Academic Press, 1980. 606p

Mahajan, S., Tuteja, N., 2005. Cold, Salinity and drought stresses: An overview. *Arch Biochem and Biophys.* 444: 139-158.

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 Tiss Organ Cult* 107:141–149.

Muller, J., Aeschbacher, R.A., Wingler, A., Boller, T., Wiemken, A., 2001. Trehalose and Trehalase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 125: 1086-1093.

Nelson, E. A., Sage, T.L., Sage, R.F. 2005. Functional leaf anatomy of plants with crassulacean acid metabolism. *Functional Plant Biology* 32: 409-419.

Pereira, P.N., Purgatto, E., Mercier, H., 2013. Spatial division of phosphoenolpyruvate carboxylase and nitrate reductase activity and its regulation by cytokinins in CAM-induced leaves of *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae). *J Plant Physiol.* 170: 1067-1074.

Peterbauer, T., Richter, A., 2001. Biochemistry and physiology of raffinose oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Sci Res.* 11: 185-197.

- Porembski, S., 2007. Tropical inselbergs: habitat types, adaptative strategies and diversity patterns. *Revista Brasil Bot.* 30(4): 579-586.
- Ronchi, C.P., Caten, A.T., Moraes, B.K., Batista, K.D., Chaves, A.R.M. & DaMatta, F. 2005. Efeitos de taxas de imposição e severidade do déficit hídrico sobre a fotossíntese em folhas de *Coffea canephora* www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/spcb_anais/simposio4/p36.pdf
- Smith, J.A.C., Griffiths, H., Lüttge, U., 1986. Comparative ecophysiology of CAM and C₃ bromeliads. I. The ecology of the Bromeliaceae in Trinidad. *Plant, Cell Environ.* 9: 359-376.
- Versieux, L. M. & Wanderley, M.G.L. 2015. Bromélias-Gigantes do Brasil, Natal Offset Editora.
- Xoconostle-Cázares, B., Ramires-Ortega, F.A., Flores- Elenes, L., Ruiz-Medrano, R., 2011. Drought tolerance in crop plants. *Am J Plant Physiol.* 5: 241-256.

ANEXOS

Experimento preliminar: Identificação da condição de maior acúmulo de Ácido Malico

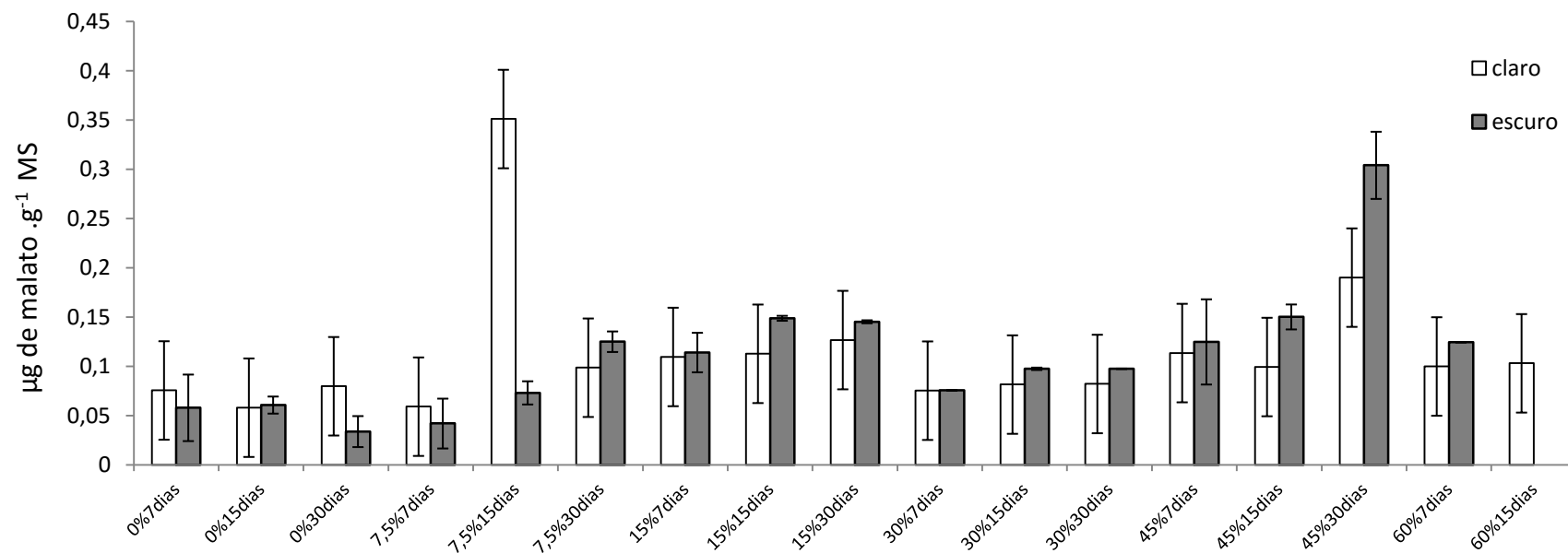


Fig. 1. Conteúdo de ácido málico em folhas de *Alcantarea imperialis* nos diversos tratamentos realizados (0%, 7,5%, 15%, 30%, 45% e 60% de PEG, por 7, 15 e 30 dias de tratamento) em 25°C constantes e fotoperíodo de 12 horas, sendo que as barras claras representam a coleta do período diurno e as barras escuras, o período noturno. Os dados são expressos como a média ($\pm$ DP) de três amostras de repetição. O resultado de 60% de 15 dias e de 60% 30 dias não foram realizados, pois as plantas não sobreviveram.

Análise anatômica complementar: Corte de folha de *Alcantarea imperialis* da Serra dos Órgãos

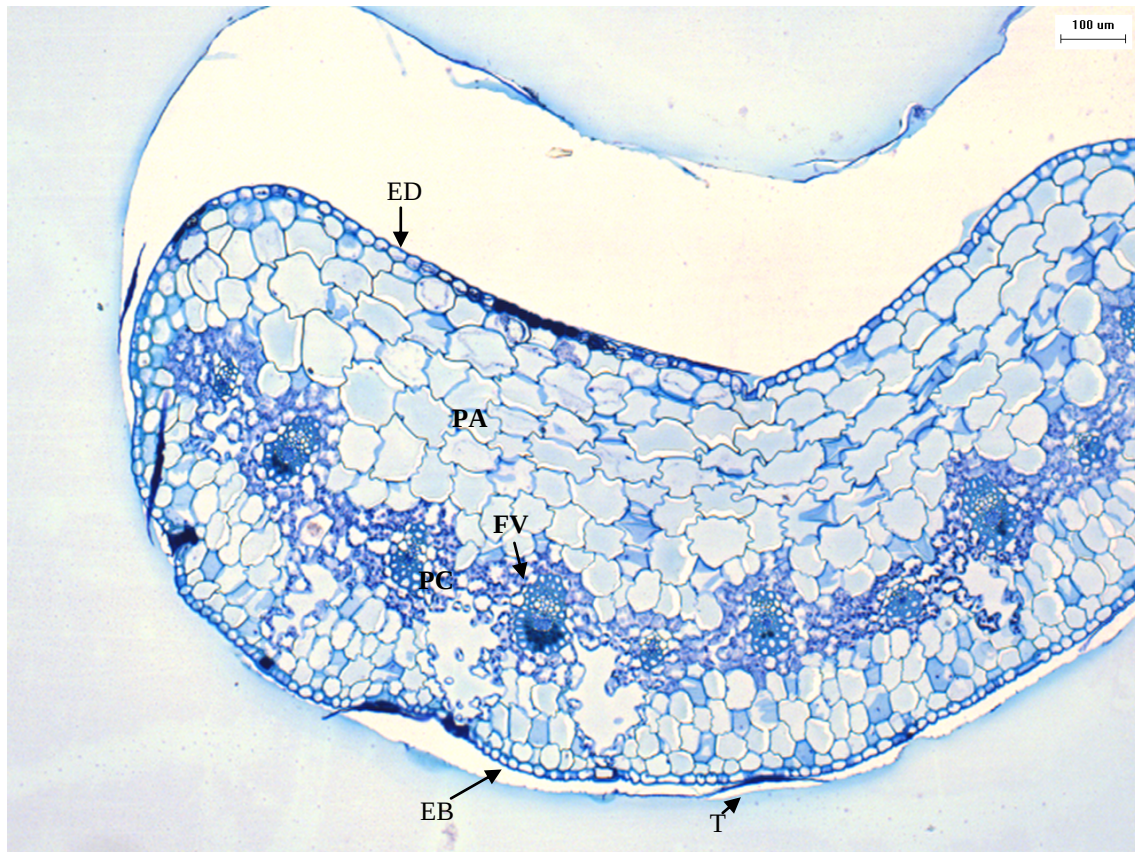


Fig.2. Corte transversal do terço médio de folha de planta jovem de *Alcantarea imperialis* coletada no ambiente natural (Inselbergue da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro) em julho de 2015. EB = epiderme da superfície abaxial, ED = epiderme da superfície adaxial, FV = feixe vascular, PA = parênquima aquífero, PC = parênquima clorofiliano, T = tricoma.

Identificação da condição de graus de estresse em plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro*.



Fig.3. *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* em meio de cultura M&S/2 com ágar por 6 meses e transferidas para meio líquido com meio de cultura M&S/2 líquido com diferentes concentrações de PEG. (A) sem PEG = -0,5 Mpa, (B) com 7,5% de PEG = - 1,9 Mpa, (C) 45% de PEG = -8,5 Mpa, (D) 30% de PEG = - 4,7 MPa , (E) 60% de PEG = - 17 Mpa (plantas não sobreviventes).

Experimento preliminar: Análise do conteúdo de carboidratos solúveis em plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* em diferentes graus de simulação de falta de água.

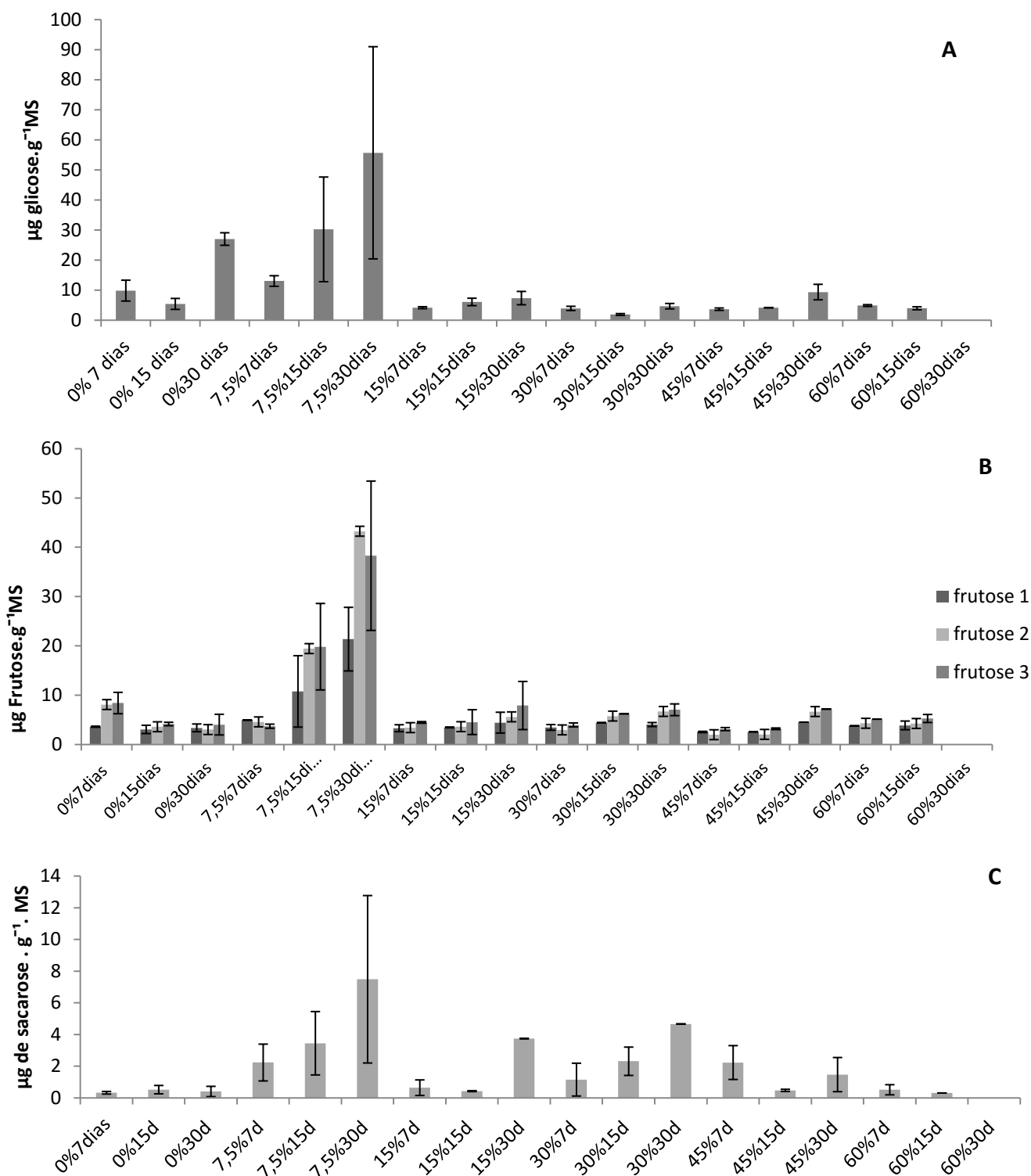


Fig. 4. Conteúdo de açúcares solúveis em plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* por 6 meses em meio de cultura M&S/2 com ágar e transferidos por 30 dias para diferentes concentrações de PEG (sem PEG, 7,5%, 15%, 30%, 45% e 60% de PEG). (A) = Glicose, (B) = Frutose e (C) = Sacarose.