

GABRIELA MARIA CABRAL NASCIMENTO

**ATIVIDADE DAS ENZIMAS GLUTAMINA SINTETASE E  
GLUTAMATO DESIDROGENASE EM PLANTAS DE  
*Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms SUBMETIDAS À  
DIFERENTES TEMPERATURAS**

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

SÃO PAULO

2019

GABRIELA MARIA CABRAL NASCIMENTO

**ATIVIDADE DAS ENZIMAS GLUTAMINA SINTETASE E  
GLUTAMATO DESIDROGENASE EM PLANTAS DE  
*Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms SUBMETIDAS À  
DIFERENTES TEMPERATURAS**

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

ORIENTADORA: CATARINA CARVALHO NIEVOLA

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

**2. Nascimento, Gabriela Maria Cabral**

N244a Atividade das enzimas glutamina sintetase e glutamato desidrogenase em plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms submetidas à diferentes temperaturas / Gabriela Maria Cabral Nascimento -- São Paulo, 2019.  
53p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente, 2019.  
Bibliografia.

1. *Bromeliaceae*. 2. Temperatura alta. 3. Amônio. I. Título.

CDU: 582.564

*"Plante semente por semente e certamente com o tempo terá um lindo jardim. Mas é preciso ter fé, plantar, regar e esperar cuidando sempre." Louise Figueiredo*

*"Quando penso que cheguei no meu limite descobro forças para ir além." - Ayrton Senna*

A minha mãe Gislene.

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me criado, me dado sabedoria, força, paciência e saúde para enfrentar os desafios que aparecem a cada dia e me ajudar vencê-los.

À minha orientadora Dra. Catarina Carvalho Nievola, pela compreensão em todas as minhas dificuldades e inseguranças. Por orientar-me, pela paciência e vontade de ensinar, pelo incentivo, por compartilhar suas experiências e seus valiosos conhecimentos em Botânica e pela confiança depositada em mim desde o início.

Ao colaborador Dr. Marco Aurélio Silva Tiné, por toda contribuição ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais por terem me dado a vida. Em especial à minha mãe Gislene, pela companhia, conselhos, incentivo, apoio, compreensão e toda ajuda que precisei.

Aos meus avós, Neida e Antônio, por todo amor, carinho, apoio e ajuda.

À minha tia Eva, por toda ajuda, carinho e incentivo.

Ao meu primo Arthur, que há 10 anos chegou para alegrar meus dias, e com sua visão e inocência de criança, me faz ver as coisas mais simples da vida serem as melhores.

A todos os outros familiares.

Ao Instituto de Botânica pela oportunidade de conviver com ótimos profissionais e pessoas que de algum modo contribuíram para a minha formação, partilhando seus conhecimentos e experiências.

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

À todos do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais.

Aos amigos que fiz, pelas experiências que compartilhamos ao longo desses anos.

Aos meus amigos irmãos Mariana e Víctor, pela companhia, pelas piadas, risadas, por toda ajuda e por tudo, enfim, pela amizade sincera.

Ao André, pela confiança em mim depositada nesses anos de trabalho, pelas conversas e conselhos, por toda ajuda ao longo da minha caminhada, meu respeito e admiração. À Patricia pelas conversas, conselhos, enfim, pela amizade sincera.

Aos meus colegas de trabalho que torcem por mim, por tudo o que com eles aprendi e as experiências vivenciadas.

Aos meus alunos, por tudo que me ensinam para tornar meu trabalho sempre melhor, pelo carinho e pela amizade.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

## RESUMO

Efeitos do aquecimento global incluem um cenário de clima mais extremo com secas, inundações e ondas de calor mais frequentes, alterando o cenário ambiental. Dentre espécies tolerantes às situações de estresse, encontram-se as bromélias rupícolas, como *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, a qual ocupa ambientes sujeitos a intensas variações de temperatura, o que indica a presença de mecanismos fisiológicos que garantam sua sobrevivência. Nesse sentido, pode tornar-se um modelo para estudo das respostas fisiológicas aos eventos de mudanças climáticas, como o aumento da temperatura. Tem sido considerado que um dos efeitos da exposição às altas temperaturas nas plantas, é o aumento da proteólise que pode levar à liberação de amônio, dentre outros produtos considerados tóxicos se acumulados. Portanto, esse íon deve ser assimilado com eficiência pela ação de enzimas como a glutamina sintetase (GS) e glutamato desidrogenase (GDH). O objetivo deste trabalho foi avaliar as atividades dessas enzimas em plantas de *Alcantarea imperialis*, submetidas às diferentes condições térmicas, visando avaliar a assimilação eficiente de amônio e a capacidade de sobrevivência no cenário de alteração da temperatura. Sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri com papel filtro, a  $25 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 12h. As plantas foram transferidas para bandejas contendo como substrato casca de *Pinus*, sendo mantidas nas mesmas condições durante dois meses. Após esse período, foram colocadas em câmara de germinação, em diferentes temperaturas (25 °C, 37 °C, 15 °C e 37 °C/15 °C), fotoperíodo de 12h e avaliadas por até 15 dias. As coletas ocorreram em 1 dia, 4 dias, 7 dias, 11 dias e 15 dias. Os resultados mostraram que a temperatura de 37°C foi que ocasionou maior liberação de amônio nos tecidos aos 15 dias de cultivo, acompanhado de diminuição da GS, aumento da GDH, redução dos pigmentos fotossintéticos e dos valores de Fv/Fm. Já as plantas mantidas à 15°C apresentaram menores valores para o conteúdo relativo de água, pequeno aumento de amônio e aumento de GS. A atividade de GDH não teve diferença significativa, aumento de clorofila *a* e valores de fluorescência próximos ao controle (25 °C). O tratamento de alternância (37 °C/15 °C) apresentou valores dos parâmetros avaliados mais próximos à 25 °C do que à 37 °C, possivelmente devido às noites terem temperaturas mais baixas do que durante o dia. Mostrando

que as altas temperaturas constantes dia/noite afetam mais as plantas de *A. imperialis* do que as baixas temperaturas. Quando as plantas foram de-aclimatadas, ou seja, o lote de plantas a 37 °C foi transferido para 25 °C, observou-se redução do conteúdo de amônio, aumento dos pigmentos fotossintéticos e aumento do Fv/Fm, revelando a capacidade de ajustar esses parâmetros em função da diminuição da temperatura de cultivo. É possível concluir que as plantas de *Alcantarea imperialis* são resistentes ao aumento da temperatura a 37 °C por até 15 dias. Contudo, a existência de um período de frio noturno de 15 °C foi essencial à sua sobrevivência, e mais favorável à assimilação de amônio ou à menor liberação desse íon. Esses resultados indicam a necessidade de manutenção da amplitude térmica no ambiente de ocorrência dessa espécie, condição esta considerada ameaçada devido às alterações climáticas previstas.

Palavras-Chave: *Bromeliaceae*, temperatura alta, amônio, aquecimento global, mudanças climáticas.

## ABSTRACT

Global warming effects include a more extreme climate scenario with more frequent droughts, floods and hot flashes, altering the environmental scenario. Stress tolerant species include rupicolous bromeliads, such as *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, which occupy environments subject to intense temperature variations, indicating the presence of physiological mechanisms that guarantee their survival. In this sense, it can become a model for studying physiological responses to climate change events, such as rising temperatures. It has been considered that one of the effects of exposure to high temperatures in plants is increased proteolysis that can lead to ammonium release, among other products considered toxic if accumulated. Therefore, this ion must be efficiently assimilated by the action of enzymes such as glutamine synthetase (GS) and glutamate dehydrogenase (GDH). The objective of this work was to evaluate the activities of these enzymes in plants of *Alcantarea imperialis*, submitted to different thermal conditions, aiming to evaluate the efficient assimilation of ammonium and the survival capacity in the scenario of temperature change. Seeds were placed to germinate in petri dishes with filter paper at  $25 \pm 2$  °C and 12h photoperiod. The plants were transferred to trays containing Pinus bark as substrate and kept under the same conditions for two months. After this period, they were placed in a germination chamber at different temperatures (25 °C, 37 °C, 15 °C and 37 °C/15 °C), photoperiod of 12h and evaluated for up to 15 days. The collections occurred in 1 day, 4 days, 7 days, 11 days and 15 days. The results showed that the temperature of 37 °C caused the greatest release of ammonium in the tissues at 15 days of cultivation, accompanied by decreased GS, increased GDH, reduced photosynthetic pigments and Fv/Fm values. Plants maintained at 15 °C had lower values for relative water content, small increase of ammonium and increase of GS. GDH activity had no significant difference, chlorophyll a increase and fluorescence values close to control (25 °C). The alternation treatment (37 °C/15 °C) presented values of the evaluated parameters closer to 25 °C than to 37 °C, possibly due to the nights having lower temperatures than during the day. Showing that the constant high temperatures day / night affect the plants of *A. imperialis* more than the low temperatures. When the plants were de-acclimated, that is, the plant batch at 37 °C was transferred to 25 °C, a reduction in ammonium content, an increase in photosynthetic pigments and an

increase in Fv/Fm, revealing the ability to adjust these parameters as a function of decreasing cultivation temperature. It can be concluded that *Alcantarea imperialis* plants are resistant to temperature increase at 37 °C for up to 15 days. However, the existence of a night cold period of 15 °C was essential for its survival, and more favorable for ammonium assimilation or less release of this ion. These results indicate the need to maintain the thermal amplitude in the environment of occurrence of this species, a condition considered threatened due to the predicted climate changes.

Key-words: *Bromeliacea*, high temperature, ammonium, global warming, climate changes.

## Lista de Figuras

Figura 1 - Processo de assimilação do amônio via glutamina sintetase.....	16
Figura 2 – Processo de assimilação do amônio via glutamato desidrogenase.....	16
Figura 3 – <i>Alcantarea imperialis</i> em seu habitat natural – Serra dos Órgãos – Rio de Janeiro e importância ecológica.....	21
Figura 4 - Importância ornamental da bromélia imperial, utilizada no paisagismo....	21
Figura 5 – Material vegetal e condições de cultivo de experimento.....	24
Figura 6 - Fluxograma do experimento, indicando as temperaturas utilizadas.....	25
Figura 7 - Conteúdo de amônio endógeno, atividade da glutamina sintase (GS) e atividade da glutamato desidrogenase (GDH) na parte aérea de <i>A. imperialis</i> , nas diferentes temperaturas.....	37
Figura 8 - Conteúdo de pigmentos fotossintéticos (mg) (clorofila <i>a</i> , <i>b</i> e carotenoides) por grama de massa seca de <i>A. imperialis</i> , nas diferentes temperaturas.....	40
Figura 9 - Fluorescência mínima (F0), Fluorescência máxima (Fm) e Taxa de rendimento do fotossistema II (Fv/Fm) em <i>A. imperialis</i> , nas diferentes temperaturas.....	41
Figura 10 - De-aclimação: pigmentos fotossintéticos, fluorescência, conteúdo de amônio endógeno e enzimas glutamina sintetase e glutamato desidrogenase em <i>A. imperialis</i> .....	46
Figura 11 - <i>Imagens termográficas de Alcantarea imperialis</i> .....	53

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Parâmetros biométricos e conteúdo relativo de água analisados da parte aérea e radicular de *A. imperialis*, ao final dos experimentos que ocorreu após 15 dias nos tratamentos térmicos e na de-aclimação. Letras minúsculas distintas, indicam diferença significativa na análise de variância (ANOVA) com variação entre médias comparados usando o teste de Tukey em  $P < 0,05$ .....33

Tabela 2 - Parâmetros biométricos e conteúdo relativo de água analisados da parte aérea e radicular de *A. imperialis*, no Tempo inicial (TI), referente aos 7 dias à 37°C e na de-aclimação ao final do experimento (15 dias). Letras minúsculas distintas, indicam diferença significativa na análise de variância (ANOVA) com variação entre médias comparados usando o teste de Tukey em  $P < 0,05$ .....45

## SUMÁRIO

Resumo.....	07
Abstract.....	09
Lista de figuras.....	11
Lista de tabelas.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Temperatura e efeito sobre assimilação de nitrogênio.....	15
1.2 Efeito da temperatura sobre os fotossistemas.....	17
1.3 Bromélia imperial ( <i>Alcantarea imperialis</i> ): tolerância à alterações térmicas.....	19
1.4 De-aclimatação: importância para a avaliação da plasticidade.....	22
2. OBJETIVOS.....	23
3. METODOLOGIA.....	23
3.1. Material Vegetal e condições de crescimento.....	23
3.2. Tratamentos de temperaturas.....	25
3.3. Biometria.....	26
3.4. Conteúdo relativo de água.....	26
3.5. Registro termográfico.....	26
3.6. Conteúdo de amônio endógeno.....	27
3.7. Análise enzimática da glutamina sintetase (GS) e glutamato desidrogenase (GDH).....	27
3.8. Conteúdo de pigmentos fotossintéticos.....	28
3.9. Fluorescência.....	29
3.10. Análise estatística.....	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	47
6. REFERÊNCIAS.....	47
7. ANEXOS.....	53
Anexo 1 – Imagens termográficas.....	53
Anexo 2 – Padronização enzimática.....	54

## 1. Introdução

### 1.1. Temperatura e efeito sobre assimilação de nitrogênio

As plantas estão expostas à alterações ambientais frequentes, como as variações de temperatura que, segundo Iba (2002), podem ocorrer durante 24h, apresentando temperaturas mais quentes de dia e temperaturas mais frias à noite, além daquelas características das estações do ano (Ruelland & Zachowski 2010). Em pouco tempo, como minutos, os vegetais podem apresentar sintomas com relação a mudança de temperatura (Larcher 2006). Considerando as previsões de mudanças climáticas para os próximos anos, que poderão alterar bruscamente as temperaturas, reduzindo-as ou aumentando-as além dos limites até o momento descritos, investigar a resiliência dos vegetais a essas alterações torna-se fundamental para a manutenção do equilíbrio do ecossistema (IPCC, 2014 e Nievola *et. al.*, 2017).

Hatfield *et. al.* (2014), relatou os efeitos das alterações de temperatura sob condições extremas (0°C a 50°C), que afetavam o crescimento de plantas cultivadas. Esse autor enfatizou que essas temperaturas extremas gerariam um grande impacto desde o início da fase reprodutiva até a formação de frutas e grãos. Clarkson *et. al.* (1986) verificaram que as raízes de plantas de *Lolium perene* eram formadas em menor número quando cultivadas sob temperaturas inferiores a 25 °C. Esses resultados foram relacionados com a redução do processo de absorção de nutrientes acarretando a diminuição do crescimento das plantas. Assim, em temperaturas mais altas, possibilitariam o melhor desenvolvimento de área foliar e raízes. Chaves (2013) em seu trabalho com espécies de bromélias (*Vriesea minarum*, *Vriesea bituminosa* e *Aechmea nudicaulis*), menciona que a temperatura alta (35 °C a 65 °C) pode alterar o metabolismo influenciando a termotolerância de espécies de bromélias. Esses autores associaram essas respostas ao aumento do conteúdo de amônio, devido à proteólise.

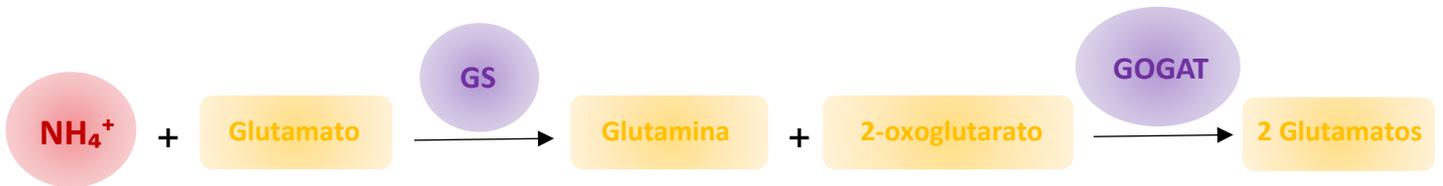
De acordo com Levitt (1980), variações na temperatura podem causar escassez de água nos tecidos levando a um estresse secundário. Na sequência, a absorção de nutrientes é alterada podendo acarretar um estresse terciário, como a falta de nitrogênio, por exemplo.

O nitrogênio faz parte da estrutura química de diversas substâncias envolvidas no metabolismo vegetal, como ácidos nucleicos, aminoácidos, proteínas, coenzimas e clorofilas, além de fazer parte de moléculas que atuam no metabolismo secundário, como os alcalóides (Marschner e Marschner, 2012, Buchanan *et al*, 2015). No solo há pouca disponibilidade de nitrogênio, diferente da atmosfera, onde é abundante (Epstein e Bloom, 2006). Embora haja abundância, o nitrogênio atmosférico precisa ser modificado para as formas inorgânicas, amônio e nitrato, para que possa ser absorvido pelas raízes das plantas (Marschner e Marschner, 2012). Contudo, o aumento de amônio no tecido das plantas, quando não é devidamente assimilado, acaba se acumulando e intoxicando a planta, causando os seguintes efeitos negativos no metabolismo: desacoplamento da fotofosforilação do transporte de elétrons, alterações no pH intracelular, redução do crescimento, e alterações no balanço osmótico (Gerendás *et. al*, 1997).

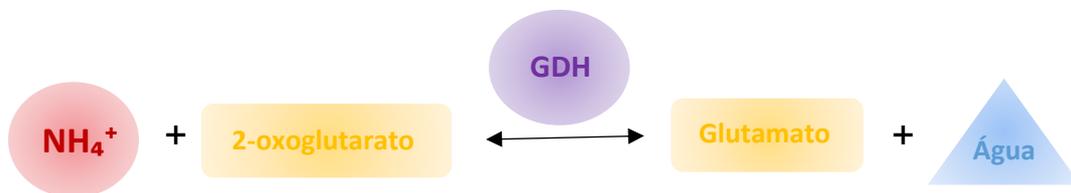
Uma outra maneira de sintetizar amônio é através da degradação das proteínas, que desempenham um papel importante na regulação dos processos biológicos e, o aumento da temperatura pode provocar a proteólise destruindo substratos e formando produtos indesejados (Buchanan *et al*.2015). Henckel, (1964), relata que a elevação da taxa de proteólise nas plantas ocasionada pelo aumento da temperatura se deve ao acúmulo de nitrogênio solúvel nos tecidos, em particular, o amônio.

A assimilação do amônio formado, é realizada tanto pela glutamina sintetase, presente em todos os tecidos vegetais e com grande afinidade pela molécula de amônio (Ruiz *et al*. 1999; Lutts *et al*. 1999; Chien e Kao 2000; Hsu e Kao 2003; Sa´nchez *et al*. 2004; Demirevska-Kepova *et al*. 2004; Miflin & Habash, 2012) quanto pela glutamato desidrogenase que catalisa tanto a aminação do  $\alpha$ -cetoglutarato e a desaminação do glutamato, que fornece esqueletos carbônicos quando há baixas concentrações de íon amoniacoal (Kumar *et al*. 2000) fazendo com que haja uma ligação entre metabolismo do carbono e do nitrogênio. Para o amônio ser assimilado via glutamina sintetase é necessário o fornecimento de 2-oxoglutarato – produzido em outra rota metabólica, o Ciclo de Krebs -, na presença da enzima GOGAT, dá origem a 2 glutamatos, que serão essenciais para um novo processo de assimilação (Figura 1). Já a GDH catalisa a síntese de glutamato a partir de amônio e 2-oxoglutarato,

formando glutamato e água. Sendo assim, a avaliação da capacidade de assimilação do amônio pode indicar a adaptação das espécies às condições térmicas que, porventura, induzam ao aumento da produção do íon.



**Figura 1-** Processo de assimilação do amônio via glutamina sintetase



**Figura 2-** Processo de assimilação de amônio via glutamato desidrogenase

Embora o estresse de temperatura alta seja um dos principais, por afetar o desenvolvimento e crescimento das plantas, ainda há poucos trabalhos sobre o seu efeito na assimilação de amônio.

Conforme mencionado anteriormente, há de se considerar que o aumento da temperatura pode causar ainda um estresse terciário, que afeta a nutrição vegetal (Levitt, 1980). Giri, *et. al.* (2017), estudando *Solanum lycopersicum* em altas temperaturas (35 °C dia / 30 °C noite e 42 °C dia / 37 °C noite), verificaram que reduz o nível de absorção de nutrientes pelas raízes, que foram afetadas pelo calor. Assim, o aumento da temperatura que está previsto para as próximas décadas (IPCC, 2014) afetaria sobremaneira a produção de alimento.

Em relação às baixas temperaturas, consideradas frias para os ambientes neo-tropicais, onde são encontradas espécies de bromélias, foram relatadas em Carvalho *et. al.* (2018), que mostraram que plantas de *Nidularium minutum* mantidas a 10 °C apresentaram aumento do conteúdo de amônio que foi associado ao alto teor de óxido nítrico. Este por sua vez, participa na regulação da expressão de genes transportadores de amônio, além da formação das

espécies reativas de oxigênio que gera uma proteólise, e contribui para o aumento do conteúdo de amônio. Os trabalhos que relatam a influência de temperaturas baixas sobre a atividade das enzimas da assimilação do amônio são mais escassos, principalmente com plantas de clima tropical. Liu *et. al.* (2017), trabalhando com plantas de *P. cirratum* e *H. plumaeforme*, mantidas a 3 °C dia/1 °C noite, verificaram que quanto mais nitrogênio adicionado ao substrato, maior a atividade das enzimas GS e GDH, porém foi necessário uma quantidade muito maior de nitrogênio, para atividade da GDH, devido à diminuição da absorção de nutrientes em temperaturas baixas. Os autores ainda relatam que essa oferta de nitrogênio deixou as plantas mais sensíveis as baixas temperaturas, ocasionando danos no fotossistema II e redução na assimilação de carbono e nitrogênio.

Poucos são os trabalhos que visam avaliar respostas simultâneas de bromélias à diferentes temperaturas. Dentre eles, nosso grupo averiguou o crescimento da bromélia imperial em plantas jovens mantidas a 26 °C, 15 °C, 15/30 °C e 30 °C. Mollo (2009), verificou diferenças quanto ao tempo de emergência das plantas mantidas em diferentes temperaturas: à 15 °C (50 dias) à 30 °C (14 dias) e, à 15/30 °C (21 dias). Foi observado menor número e tamanho de folhas e raízes, bem como valores de massa fresca e seca quando as plantas foram mantidas a 15 °C quando comparadas àquelas cultivadas à 30 °C, as quais apresentaram um valor 4 vezes maior dos parâmetros citados anteriormente.

Segundo Miura & Furumoto (2013) uma situação de estresse térmico, além de influenciar no crescimento dos vegetais, pode ocasionar danos no fotossistema II devido ao desbalanço da capacidade de absorver e dissipar energia. Esse dano causado devido a fotoinibição, afeta tanto as plantas em baixas temperaturas, como as plantas em altas temperaturas, sendo estas, as que sofrem menos danos (Hou *et. al.*, 2016).

## 1.2 Efeito da temperatura sobre os Fotossistemas

Altas temperaturas podem influenciar na fotossíntese inibindo-a antes de qualquer outro sintoma de estresse (Björkman, 1975), como por exemplo, reduzindo o transporte de elétrons, o que causa modificações no fenômeno de transporte de energia nos fotossistemas (Armond *et. al.*, 1978). Dessa forma,

pode-se utilizar a teores de clorofila para mensurar a tolerância fotossintética a altas temperaturas (Yamada *et. al.*, 1996). Segundo Duarte (2003), quando a planta é submetida a algum tipo de estresse, pode ocorrer um aumento nos teores de carotenoides e a diminuição da produção de clorofila. Para Silva & Rocha *et. al.*, (2011) quantificar indiretamente os carotenoides é importante para indicar a ambientação do vegetal. Assim como em altas temperaturas, a temperatura baixa também influencia na degradação da clorofila, porém, essa degradação das clorofilas *a* e *b* são muito menores a baixas temperaturas (Lisiewska *et. al.*, 1997).

A avaliação da fluorescência da clorofila *a* por meio da medição da razão  $F_v/F_m$  (Fluorescência variável/Fluorescência máxima), é utilizada para representar a eficiência fotossintética do PSII (Maxwell & Johnson 2000).  $F_v$  representa a diferença entre  $F_m$  e  $F_o$  (fluorescência mínima no escuro;  $F_o$  significa a emissão de luz pelas moléculas de clorofilas excitadas, antes da energia ser dissipada para o centro de reação do fotossistema II). Os valores de  $F_m$  indicam a eficiência do processo fotoquímico (Roháček & Barták 1999).

Quando plantas jovens são expostas à luz solar, ocorre um aumento significativo na temperatura das folhas, intensificando os efeitos da fotoinibição (Valladares & Pearcy, 1997). Temperaturas de 35 à 42 °C são consideradas altas e podem gerar danos diretamente no aparato fotossintético (Wise *et al.*, 2004), uma vez que causam mudanças na membrana do tilacóide, alterando a organização funcional e as propriedades físico-químicas dessas estruturas celulares (Berry & Björkman, 1980). Além da fotoinibição, as temperaturas elevadas afetam a taxa máxima de assimilação de carbono, podendo ser inibida pela redução da condutância estomática (Law & Crafts-Brandner, 1999).

Ferguson *et. al* (1991) trabalhando com *Nicotiana tabacum* citam que diferentes temperaturas e variações na disponibilidade de água causam mudanças na fotossíntese. Eles mediram  $F_v/F_o$  e observaram que a partir de 35 °C (até 45 °C), há uma redução nos valores desse índice avaliado.

Durante a fotoinibição ocorre a redução dos valores de  $F_v/F_m$  e aumento dos valores de  $F_o$ , reversível em uma escala de horas ou dias (Skillman & Osmond 1998). Sabe-se que em plantas submetidas à altas temperaturas, ocorre um dano menor causado pela fotoinibição, do que em plantas submetidas à baixas temperaturas (Hou *et al.* 2016).

As baixas temperaturas como avaliado nas plantas de seringueira, que foram cultivadas a 10 °C, tiveram redução da taxa fotossintética e dos valores de Fv/Fm, associado a fotoinibição (Mai *et al.* 2009). Entretanto, houve a recuperação da eficiência do fotossistema II quando as plantas foram transferidas para 28 °C. As plantas de milho cultivadas em 15 °C, também apresentaram redução nas taxas de Fv/Fm e, o resultados foram relacionados com os menores teores de pigmento fotossintéticos obtidos (Fracheboud *et al.* 1999).

Os efeitos do frio sobre os fotossistemas foram relatados por Perez *et al.*, (2001) que mostraram que ocorre a inibição do crescimento foliar em plantas de *Festuca arundinacea* quando transferidas para 12 °C provenientes do cultivo a 25 °C. Estudos realizados por nosso grupo mostraram que espécies de Bromeliaceae apresentam mecanismos de resistência à variações térmicas. Carvalho *et al.* (2018) estudando os efeitos do frio (10 °C) em *Nidularium minutum*, verificaram que houve uma redução da relação Fv/Fm em comparação à plantas cultivadas a 25 °C. Os autores sugerem um comprometimento da transferência de energia do complexo antena para os centros de reação.

### 1.3. Bromélia imperial (*Alcantarea imperialis*): tolerância à alterações térmicas

Vivendo expostos a temperaturas extremas, seca, sol intenso, escassez de nutrientes, membros de Bromeliaceae ocorrem em regiões neotropicais, sendo que 40% das espécies dessa família ocorrem em território brasileiro (Benzing, 2000). Notadamente as espécies que vivem sobre rochas, como rupícolas, sujeitas à várias situações consideradas condições estressantes. Variam do nível do mar às grandes altitudes, e de locais úmidos, como a Mata Atlântica, onde são encontradas 80% das espécies, até regiões secas, como a Caatinga (Benzing, 2000; Nunes 2006; Silva & Gomes 2003).

Endêmica da região de afloramentos rochosos da Serra dos Órgãos do Estado do Rio de Janeiro, se encontra a “bromélia imperial”, *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, uma planta ornamental muito utilizada no paisagismo (Leme & Marigo, 1993) (Figura 3 e 4). Pode atingir de 3 a 5 metros de altura, com folhas dispostas em roseta vistosa de aproximadamente 1,5

metros de diâmetro, que permitem que água e nutrientes acumulem-se entre suas folhas, formando um tanque. A inflorescência projeta-se, excedendo as folhas, com numerosas flores alvas contrastantes com as brácteas vermelhas. Apresenta hábito saxícola ou rupícola, sendo exposta a alta luminosidade, a escassez de água, pouca disponibilidade de substrato e expressivas variações térmicas. Essas condições abióticas severas são fatores determinantes na adaptação das espécies encontradas nesses locais (Porembski 2007). A Serra dos Órgãos apresenta clima mesotérmico brando superúmido – 80 a 90% de umidade relativa do ar, (classificado, segundo Köppen como Cwb – tropical de altitude – com curta estação de seca), o Parque possui temperatura média anual de 18 °C e índice pluviométrico médio de 2.300mm (Nimer 1977). Devido à localização na região mais alta do estado, a temperatura mínima no verão é de 24 °C e no inverno pode atingir valores iguais ou inferiores a 0 °C, sendo que a amplitude térmica anual pode atingir valores desde -5 ° C até 35 ° C (Ibama 1989).

O fato de *Alcantarea imperialis* ser nativa de ambiente sujeito a variações térmicas, indica a presença de mecanismos fisiológicos relacionados à tolerância ao aumento de temperatura. Nesse sentido, pode tornar-se um modelo para estudo das respostas fisiológicas aos eventos de mudanças climáticas.



**Figura 3-** *Alcantarea imperialis* em seu habitat natural – Serra dos Órgãos – Rio de Janeiro (A). Foto: Luciana Mollo; (B) importância ecológica. Foto: [www.pinterest.jp/pin/573857177504905949/](http://www.pinterest.jp/pin/573857177504905949/)



**Figura 4 –** Importância ornamental da bromélia imperial, utilizada no paisagismo. Foto: [www.pinterest.jp/pin/573857177504905949/](http://www.pinterest.jp/pin/573857177504905949/)

Considerando que *Alcantarea imperialis* ocorre em ambiente de grandes variações térmicas, essa espécie deve possuir mecanismos de tolerância à altas e baixas temperaturas. Surgem questões a respeito desses mecanismos:

- 1) A exposição à alta temperatura elevaria os níveis de amônio, como ocorre em outras plantas? Se sim, haveria alterações nas atividades das enzimas de assimilação de amônio de modo a impedir o aumento desse íon a níveis incompatíveis com a sobrevivência dessa espécie?
- 2) A exposição ao frio constante alteraria também a formação de amônio e as atividades das enzimas?

A hipótese deste trabalho baseia-se na adaptação dessa espécie às temperaturas extremas que ocorrem no ambiente natural. Considerando que a formação de amônio pode ser aumentada em resposta à variações térmicas, sobretudo sob aumento da temperatura, é possível supor que a sobrevivência dessa espécie às mudanças climáticas ocorra devido à alterações nos processos de assimilação desse íon pelas enzimas GS e GDH de modo a evitar o acúmulo de amônio, considerado tóxico aos vegetais. As respostas em temperaturas baixas constantes seriam de uma diminuição do metabolismo e ajuste na atividade dessas enzimas para a assimilação do amônio. Essas respostas indicariam a plasticidade da espécie às variações térmicas.

#### 1.4. De-aclimatação: importância para a avaliação da plasticidade

A aclimatação ocorre quando uma planta passa de um ambiente de condições favoráveis para um outro em situação estressante. O retorno dessas plantas para a condição favorável é denominada de-aclimatação (Debat e David, 2001). Para esses autores, essa mudança pode alterar a fisiologia e morfologia, ativando mecanismos de resistência.

Os efeitos da de-aclimatação em altas temperaturas podem ser observados no trabalho de Giri *et. al.* (2017), que estudando *Solanum lycopersicum*, em 25 °C dia/20 °C noite, transferiram para altas temperaturas (35 °C dia/30 °C noite e 42 °C dia/37 °C noite) durante 6 dias e, após esse período de-aclimataram para as condições iniciais. Mostraram um aumento das enzimas

estudadas (GS e GDH) quando colocadas em altas temperaturas, e ao serem de-aclimatadas, redução nos níveis das enzimas nas plantas que estavam à 35 °C, mas não nas plantas que estavam à 42 °C, sugerindo que não houve uma recuperação completa das plantas.

Já para temperaturas baixas, as respostas relacionadas à de-aclimação pode ser observada no trabalho de Carvalho *et. al.* (2018) estudando *Nidularium minutum* à 10 °C, de-aclimatou as plantas à 25 °C, verificou que houve um aumento da razão Fv/Fm e um decréscimo no valor de F0; analisou também o conteúdo de amônio endógeno e houve uma redução desse parâmetro. No entanto, não foram encontrados trabalhos que relatassem se as respostas de assimilação de amônio variariam durante a de-aclimação.

Nossa hipótese reside na possibilidade de que a alteração ocasionada pela alta temperatura constante seja diferente durante a de-aclimação à redução térmica. De fato, estudar a de-aclimação significa estudar o quão plásticas as plantas são e, qual a possibilidade de sobreviverem aos eventos de mudanças climáticas previstos, principalmente relacionados ao aumento dos episódios de calor.

## **2. Objetivo**

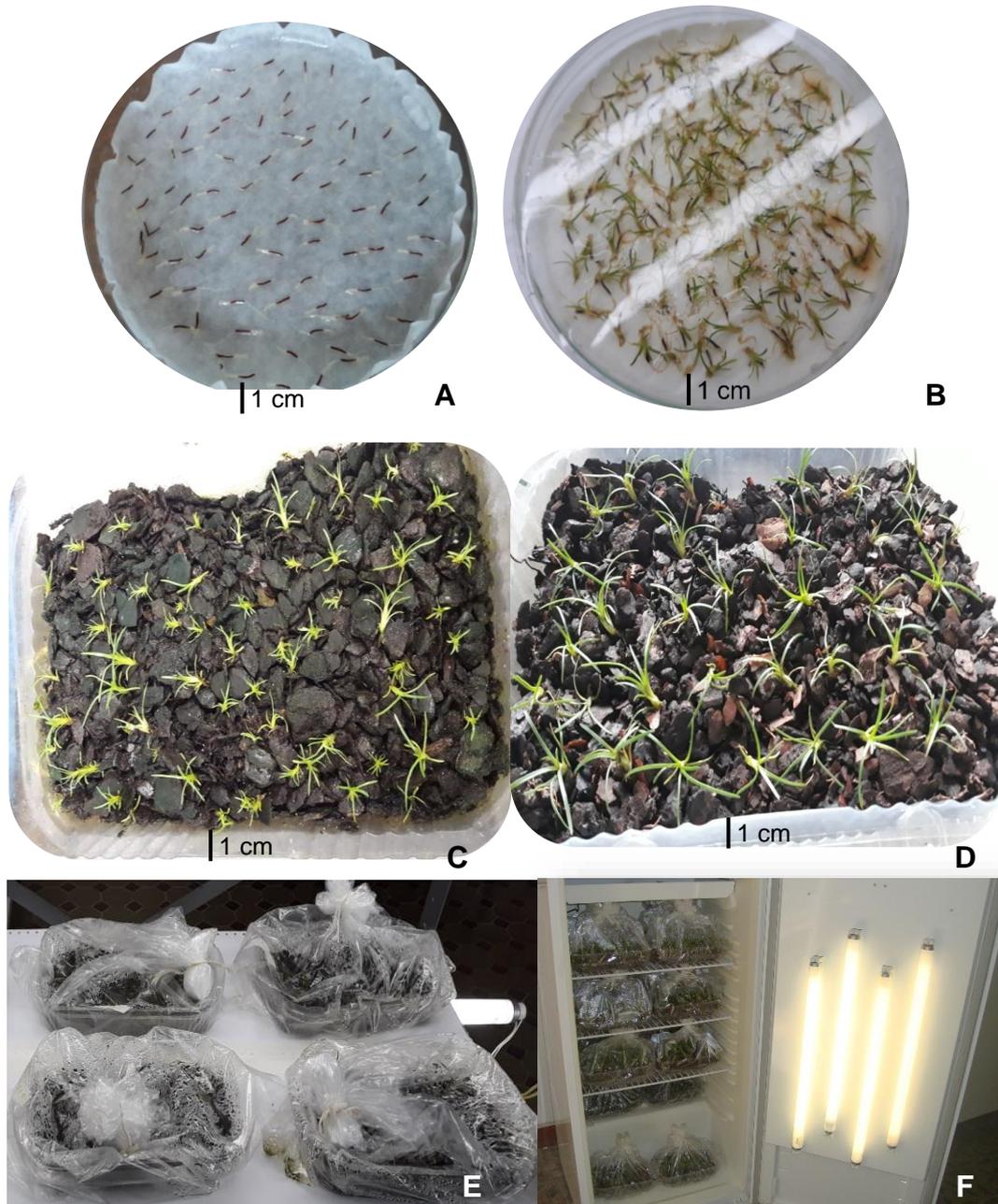
O presente trabalho teve como objetivo avaliar as atividades de enzimas do metabolismo do nitrogênio, relacionadas à assimilação de amônio em plantas de *Alcantarea imperialis*, com vistas a revelar os mecanismos fisiológicos envolvidos no ajuste térmico, em situação de aumento (aclimação) e diminuição de temperatura (de-aclimação).

## **3. Materiais e Métodos**

### **3.1. Material Vegetal e condições de crescimento**

Sementes de *Alcantarea imperialis* foram desinfestadas e colocadas para germinar em placas de Petri com papel filtro. Após um mês, as plântulas foram transferidas para bandejas transparentes contendo (600mL de) casca de Pinus e adubadas quinzenalmente com 40 mL de MS/2 (Murashige e Skoog, 1962 com 50 % da concentração de macronutrientes) modificado (sem sacarose e ágar).

Tanto na germinação quanto após a transferência, as sementes e plântulas foram mantidas em sala de cultura com fotoperíodo de 12h, radiação fotossinteticamente ativa de  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  e temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

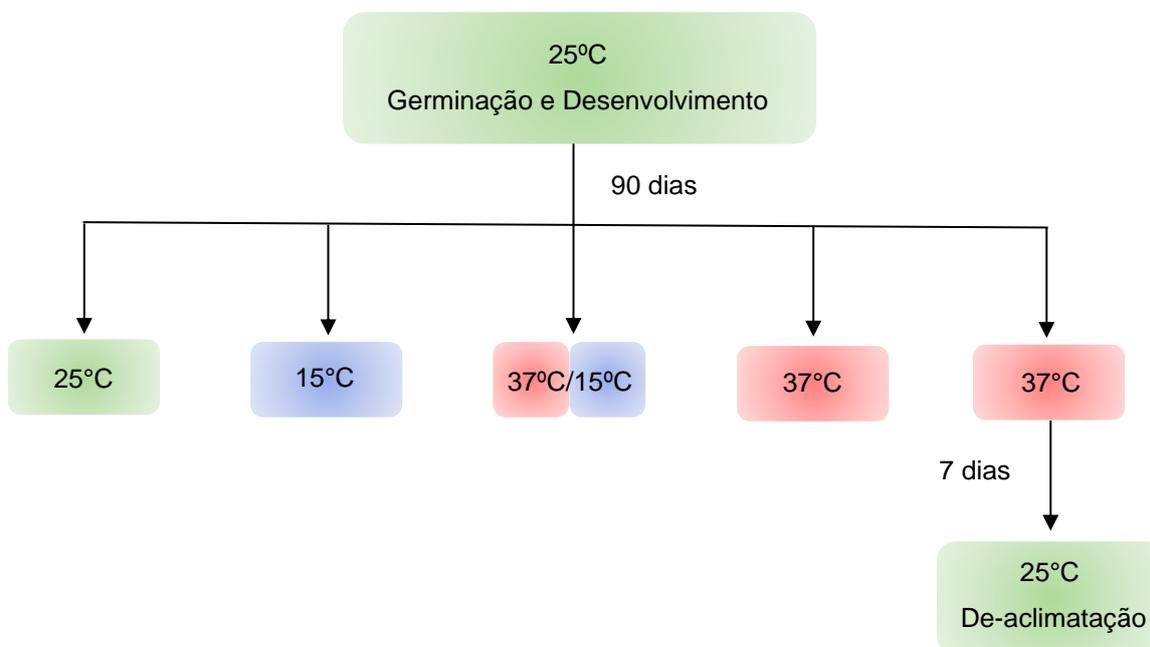


**Figura 5** – Material vegetal e condição de cultivo do experimento. A) Sementes colocadas para germinar; B) Plântulas; C) Plântulas transferidas para bandejas com casca de Pinus; D) Plantas jovens antes de serem transferidas para os tratamentos; E) Condição de cultivo em sala de cultura; F) Condição de cultivo na BOD.

### 3.2. Tratamentos de temperatura

Passados três meses da transferência das plantas das placas de Petri para as bandejas, estas foram mantidas em estufas tipo BOD com as condições controladas descritas anteriormente no item 3.1, modificando apenas a temperatura. Os lotes foram divididos em 25°C – controle (temperatura ótima para germinação verificada por Mollo *et. al.* 2011), 15°C – temperatura baixa (temperaturas verificadas por Mollo *et. al.* 2011), mostrando adaptações da bromélia imperial ao frio), 37°C – temperatura alta (dois graus previstos pelo IPCC, 2007 – verificar o limite térmico para as injúrias), 37°C/15°C – alternância dia/noite (inclui o aumento do IPCC 2007, considerando que o ambiente natural da *Alcantarea imperialis* é mais frio que o valor estipulado). Os valores de temperatura alta e baixa isolados seviram para verificar o efeito direto da temperatura. Ainda parte do lote que estava a 37°C, após 7 dias, foram transferidos para 25°C novamente, para de-aclimação. Foram realizadas coletas com 1, 4, 7, 11 e 15 dias após terem sido colocadas em cada tratamento, que serviram para as análises descritas a seguir.

O esquema a seguir representa os tratamentos térmicos utilizados.



**Figura 6** - Fluxograma do experimento, indicando as temperaturas utilizadas

### 3.3. Biometria

Para as análises biométricas realizadas foram separadas 10 plantas de cada coleta e realizadas as medições (número de folha, número de raiz, tamanho de folha em cm, tamanho de raiz em cm e folhas mortas). Essas medidas foram realizadas após 15 dias de cultivo nas plantas mantidas nos diferentes tratamentos térmicos.

### 3.4. Conteúdo relativo de água

Para avaliar o teor relativo de água das plantas, as folhas foram pesadas pouco tempo após cada coleta (peso fresco, FW), sendo então reidratadas em água destilada por 24 h no escuro (peso turgido, TW). Após este período, eles foram transferidos para um forno a 60 ° C até atingir um peso constante (peso seco, DW). O teor de água foi expresso de acordo com a fórmula (Barrs e Weatherley, 1962):  $(FW - DW) / (TW - DW) * 100$

### 3.5. Registro termográfico

Termografia é definida no dicionário como sendo uma técnica que permite mapear um corpo ou uma região com o intento de distinguir áreas de diferentes temperaturas, sendo, portanto, uma técnica que permite a visualização artificial da luz dentro do espectro infravermelho.

Os termogramas, obtidos utilizando-se um termovisor (Testo®), serão usados para avaliar os efeitos dos tratamentos com diferentes temperaturas em todas as coletas, no gradiente de temperatura das plantas amostradas ao longo da parte aérea e da raiz utilizando-se da metodologia apresentada em Liu Y et al. (2011).

Os registros termográficos deste trabalho podem ser encontrados no anexo 1.

### 3.6. Conteúdo de amônio endógeno

Preparação do material vegetal: amostras de 0,1 g de massa fresca foliar foram trituradas com nitrogênio líquido e, posteriormente, foram transferidas para microtubos tipo eppendorf, aos quais foram acrescentados 1 ml de água ultra-purificada. Essas amostras foram centrifugadas a 22.000 RCF, 4°C por 10 minutos e recolhido o sobrenadante.

Para a determinação do conteúdo endógeno de  $\text{NH}_4^+$  foi utilizado o método de acordo com a reação conhecida como fenol-hipoclorito (Weatherburn, 1967; McCullough, 1967), nesta reação foram utilizados dois reagentes, o primeiro constituído por 1% (m/v) de fenol e 0,005% (m/v) nitroprusside e, o segundo constituído por 5,37 % (m/v) de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 1% (v/v) de hipoclorito de sódio (10-14%  $\text{Cl}_2$ ) e 0,5% (m/v) de NaOH. Em microtubos tipo eppendorf, foram aliqüotados 200  $\mu\text{l}$  do extrato vegetal de cada amostra e, adicionado 0,5 ml do primeiro reagente e 0,5 ml do segundo reagente. Após agitação dos microtubos, a mistura permaneceu em banho-maria a 35°C por 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 625 nm. Microtubos contendo de 0,002 a 0,03  $\mu\text{mol}$  de  $\text{NH}_4^+$  ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) em 0,1 mL foram utilizados na constituição da curva padrão, nestes também foram acrescentados os dois reagentes e, permaneceram sob as mesmas condições que as amostras, até a leitura em espectrofotômetro. A dosagem de amônio endógeno foi expressa em  $\mu\text{mol}$  de amônio por grama de massa seca ( $\mu\text{mol NH}_4^+ \cdot \text{g}^{-1} \text{MS}$ ).

### 3.7. Análise enzimática da glutamina sintetase (GS) e glutamato desidrogenase (GDH)

A atividade da GS foi determinada de acordo com o método *in vitro* descrito por Elliott (1955) apud Farnden e Robertson (1980), enquanto para a GDH-NADH a determinação foi realizada com base no método descrito por Bulen (1956) com as seguintes modificações devido à padronização realizada neste trabalho para *A. imperialis* (Anexo 2).

Para a extração, cada um dos tratamentos, foram utilizadas 0,2 g de massa fresca foliar. As amostras foram trituradas em almofariz com nitrogênio

líquido até a obtenção de um pó fino e, então, transferidas para microtubos tipo eppendorf, previamente resfriados, aos quais foram acrescentados 1,5 ml de uma solução composta por 0,05 M de tampão imidazol com pH 7,9 e 0,005 M de ditioneitol. Estas amostras foram submetidas à centrifugação de 21.000 RCF (força centrífuga relativa ou força g) à temperatura de 4°C por 1 hora. O sobrenadante foi dessalinizado em coluna PD10 (Sephadex G-25) e mantido a 4°C para a determinação das atividades de GS e GDH.

No ensaio enzimático da GS, o volume total da reação enzimática foi de 0,5 ml, constituído por: 0,1 mM de tampão imidazol, cujo pH foi 7,5, 49 mM de hidroxilamina, 40 mM de MgCl<sub>2</sub>, 160 mM de glutamato e 45 mM de ATP. A reação foi iniciada com a adição de 50 µL do extrato enzimático e, incubação à temperatura de 35°C por 1 hora. Após esse período a reação foi interrompida com a adição de 1 mL da solução de parada, constituído por: 0,123 M de cloreto férrico, 0,25 M de HCl e 0,1225 M de ácido tricloroacético (TCA). A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 540nm. A atividade da enzima foi expressa em mmol gama glutamil hidroxamato por hora por grama de massa seca (mmol  $\gamma$ GH. h<sup>-1</sup> . g<sup>-1</sup> MS).

O ensaio enzimático da GDH, a atividade da GDH-NADH foi quantificada por meio do consumo de NADH gasto na reação, cujo o volume total foi de 1 ml, constituído por tampão 0,1 M de TRIS com pH 8,2, 13,3 mM de 2-oxoglutarato, 0,1 M de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, 0,16 mM de NADH. Todos os reagentes foram mantidos à temperatura de 30°C por 10 minutos antes de começar a reação enzimática, iniciada pela adição de 0,25 mL de extrato enzimático e, imediatamente lido em espectrofotômetro a 340 nm. O delta de decaimento (slope) foi calculado utilizando a faixa linear das absorbâncias anotadas dentro de um período de três minutos. A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon_{340}$ ) de 6,22 x 10<sup>6</sup> mmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> e a atividade expressa em µmol de NADH consumido por minuto por grama de massa seca (µmol NADH. min<sup>-1</sup> . g<sup>-1</sup> MS).

### 3.8. Conteúdo de pigmentos fotossintéticos

As clorofilas *a*, *b* e carotenoides foram extraídos das folhas de cada amostra de acordo com o método descrito por Munné-Bosch e Lalueza (2007), com

modificações. A massa fresca foliar foi triturada em nitrogênio líquido e 0,05 g foi homogeneizado em 1 mL de acetona a 100% (v/v). Estes permaneceram em banho ultrassônico a 4 °C por 30 minutos, decorrido o período, as amostras foram centrifugadas 22.000 RCF, 4 °C por 20 minutos e o sobrenadante foi coletado. Esse procedimento foi realizado novamente com a mesma amostra e posteriormente os dois sobrenadantes de foram combinados para a leitura em espectrofotômetro. Os comprimentos de ondas para a leitura em espectrofotômetro, assim como as equações para o cálculo de conteúdo de pigmentos fotossintéticos foram utilizados de acordo com o descrito por Lichtenthaler e Buschmann (2001) e expresso em miligrama de pigmento por grama de massa seca (mg. g<sup>-1</sup> MS).

### 3.9. Fluorescência

Para a determinação de fluorescência, utilizou-se um medidor de fluorescência da Hansatech. As leituras foram realizadas na epiderme adaxial com folhas de 10 plantas totalmente expandida, após adaptação no escuro por 30 minutos. Foram avaliados os parâmetros de fluorescência inicial (F<sub>0</sub>), máxima (F<sub>m</sub>), variável (F<sub>v</sub>) e a eficiência quântica do PSII (F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>), caracterizando o funcionamento das antenas e estresse sofrido pela planta.

### 3.10. Análise estatística

A condução do experimento foi totalmente casualizado. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) com variação entre médias comparados usando o teste de Tukey em P <0,05. Foram utilizadas no mínimo 20 plantas por tratamento térmico para cada análise biométrica e 200 para as análises bioquímicas.

## 4. Resultados e discussão

A porcentagem de sobrevivência das plantas mantidas nas diferentes temperaturas foi diferente entre os tratamentos. As plantas mantidas à 37°C, apresentaram indivíduos mortos após 15 dias de cultivo (porcentagem de

sobrevivência de 45%), sendo que ao final de 30 dias, todas mantidas nessa temperatura, estavam mortas. Por este motivo, 15 dias foi o período máximo de cultivo das plantas em todos os tratamentos térmicos. Daniell *et. al.* (1969) estudando plantas de *Glycine max* L. e *Elodea canadensis* Michx, verificaram a morte de ao menos 40% das folhas quando as plantas foram submetidas a temperaturas que variavam de 47 °C até 57 °C. Os autores atribuíram esse efeito à uma desorganização e desintegração das membranas dos cloroplastos e tonoplasto. No caso da bromélia imperial, o limite térmico foi menor (37 °C constantes) o que pode estar relacionado ao ambiente de origem da espécie, caracterizado por apresentar temperaturas menores a noite (5 °C) (Ibama, 1989).

Os efeitos deletérios das altas temperaturas podem ocorrer em horas (Larcher, 2006) inclusive para espécies nativas, conforme corroborado pelo trabalho de Chaves *et. al.* (2014), que avaliou os efeitos da alta temperatura, em plantas da bromélia *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Sm. Esses autores mostraram o decaimento dos valores de Fv/Fm após 10 horas a 35 °C. Para a bromélia estudada neste trabalho, *Alcantarea imperialis*, o decaimento de Fv/Fm ocorreu apenas após 7 dias, revelando uma resistência maior à alta temperatura de 37 °C constantes em relação à esse parâmetro. Essa resistência pode estar relacionada com o ambiente natural dessa espécie onde as temperaturas máximas chegam aos 35 °C (Ibama, 1989)

Os dados de crescimento das plantas jovens da bromélia imperial mantidas nas diferentes temperaturas estão na Tabela 1. Após os 15 dias de experimento, as plantas a 25 °C e alternância apresentaram maior desenvolvimento da parte aérea, diferente das plantas mantidas em 37 °C e 15 °C. Contudo, as plantas mantidas nestes últimos tratamentos mostraram valores maiores para as medidas da parte radicular. Por outro lado, das plantas cultivadas em 25 °C e alternância, mostraram menor desenvolvimento do parâmetro avaliado.

Lafta e Lorenzen (1995) estudando dois cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.), verificaram uma redução no crescimento das folhas das plantas mantidas em altas temperaturas (31 °C dia/29 °C noite), devido à sensibilidade das cultivares à altas temperaturas. De modo oposto, Perez *et al.* (2001) mostram que a exposição ao frio pode causar a inibição do crescimento foliar de plantas de *Festuca arundinacea* quando transferidas do cultivo a 25 °C para 12

°C. Já Clarkson *et al.* (1986) mostraram ter havido a formação de número menor de raízes em plantas de *Lolium perene* cultivadas sob temperaturas inferiores a 25°C. Esses autores relacionaram esse aumento do número de células, como consequência da maior absorção de nutrientes.

O teor relativo de água da bromélia imperial foi maior a 37 °C em comparação à 25 °C (Tabela 1), o que mostra a capacidade de reter água nos tecidos, apesar do possível aumento da transpiração em função da temperatura alta constante. É possível supor que ela fechou os estômatos e, ainda, pode estar desenvolvendo CAM nessa condição, apesar de ser considerada C3 (Crayn *et al.*, 2000). Mollo (2017), ao submeter plantas de *A. imperialis* à alternância (30 °C/15 °C), houve um aumento do conteúdo de malato no período noturno, indicando a mudança da fotossíntese. Nievola *et al.* (2005) avaliando plantas de *Ananas comosus* clonadas e cultivadas *in vitro* apresentavam redução no crescimento quando mantidas em alternância (28 °C claro/15 °C escuro) e maior atividade da enzima fosfoenol piruvato carboxilase noturna em relação àquelas mantidas a 28 °C constantes, relacionando esses dados à ocorrência de CAM. Segundo Martin (1994), as temperaturas noturnas mais baixas estimulam a absorção de gás carbônico em *Bromeliaceae*. Logo, a noite fria pode ser determinante a sobrevivência das plantas sob danos maiores por alta temperatura durante o dia.

Cansev (2012) verificou também ser possível manter o conteúdo relativo de água em temperaturas altas. Em seu trabalho com azeitona, observou que o teor relativo de água era estável até 45 °C, reduzindo a 50% desse conteúdo quando a temperatura atingiu 50 °C. Sugerem que o estresse em altas temperaturas afeta o crescimento e o desenvolvimento da oliveira, reduzindo o conteúdo de água e inibindo a fotossíntese, somente quando a temperatura está acima de 50 °C. Por outro lado, Crawford *et al.* (2012), estudando o impacto que a alta temperatura (28 °C) gera no desenvolvimento de plantas de *Arabidopsis thaliana*, verificaram que há uma maior perda de água, capacitando o resfriamento das folhas. Sugerem que isso ocorre através da evaporação foliar, que contribui para diminuir a temperatura das folhas que absorverão água do solo, em ambiente bem irrigado. Esse resultado é diferente do que ocorreu neste projeto com *A. imperialis*, que manteve água nos tecidos mesmo sob alta temperatura. É possível supor que, uma vez que a bromélia imperial, vive em um

ambiente rupícola e a disponibilidade de água é baixa, ela capta água da atmosfera e a retém nos tecidos. Vale lembrar que há alta umidade em seu ambiente natural (Nimer, 1977). Cach-Pérez et. al., (2014) recentemente publicaram uma revisão sobre as bromélias serem adequadas aos estudos de mudanças climáticas globais (Andrade, 2003; Graham; Andrade, 2004).

A tabela 1 mostra que as plantas mantidas a 15 °C apresentaram o menor conteúdo relativo de água. Esse resultado pode indicar uma diminuição na absorção de água resultado da temperatura baixa, o que, indiretamente, causaria uma diminuição na absorção de nutrientes, como ilustrado por Larcher (2006). Entretanto, existem trabalhos que mostram o inverso, ou seja, em temperaturas baixas o frio induz o acúmulo de água nos tecidos, como foi visto por Carvalho et. al. (2018) em seu trabalho com plantas da bromélia *Nidularium minutum*. Porém, essas plantas foram submetidas a uma temperatura menor, de 10 °C. Os autores associaram esse resultado ao aumento do conteúdo de carboidratos solúveis que contribuiriam como osmoprotetores. De modo interessante, as plantas jovens de *A. imperialis* conservam água no calor e não no frio. Porém foi observada cerca de 50% de morte de plantas aos 15 dias a 37° C constantes. É possível supor que o excesso de água acumulada tenha culminado nesse resultado. De acordo com Crawford et. al. (2012) que estudaram temperatura alta (28 °C) em *Arabidopsis thaliana*, há necessidade de reciclar água para resfriar os tecidos, do contrário, esses autores mencionam que pode levar a planta a senescência.

As imagens termográficas de *A. imperialis* mostram o aquecimento dos tecidos de modo diferente entre raiz e parte aérea. É possível supor que o contato com o substrato tenha interferido na temperatura, pois apresentava temperatura menor. (Anexo 2)

**Tabela 1** - Parâmetros biométricos e conteúdo relativo de água analisados da parte aérea e radicular de *A. imperialis*, ao final dos experimentos que ocorreu após 15 dias nos tratamentos térmicos e na de-aclimatação. Letras minúsculas distintas, indicam diferença significativa na análise de variância (ANOVA) com variação entre médias comparados usando o teste de Tukey em  $P < 0,05$ .

	25°C	15°C	37°C	37°C/15°C
Número de folhas	8,20 ± 0,63 a	7,30 ± 0,67 b	6,60 ± 0,84 b	6,80 ± 0,42 b
Número de raiz	1,70 ± 0,48 b	1,90 ± 0,74 a	2,00 ± 0,00 a	1,60 ± 0,70 b
Tamanho de folha (cm)	2,63 ± 0,19 a	2,31 ± 0,43 b	2,20 ± 0,28 b	2,55 ± 0,25 a
Tamanho de raiz (cm)	0,65 ± 0,30 b	0,65 ± 0,38 b	1,14 ± 0,36 a	0,84 ± 0,28 ab
Folhas mortas	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a	1,50 ± 0,71 a	0,00 ± 0,00 a
Conteúdo relativo de água	89,24 ± 0,39 ab	81,99 ± 0,68 b	92,19 ± 0,54 a	86,35 ± 0,47 ab

Após 7 dias cultivadas no calor, foi possível verificar alterações nas atividades das enzimas, como a diminuição da GS aos 37 °C em comparação aos 25 °C (Figura 7B e 7C). As concentrações de amônio foram inferiores aos 11 e 15 dias de cultivo na temperatura alta em comparação a todos os outros tratamentos (Figura 7A). Os valores reduzidos de atividade de GS ocorreram já em pequenas concentrações de amônio (45,30 µg NH<sub>4</sub>/g MF) que pode ter sido o efeito da temperatura alta sobre o funcionamento da enzima. Embora não tenham avaliado o efeito direto da temperatura, Zhong et. al (2017) verificaram que a produção de grãos de arroz era afetada pela falta de água de acordo com o suprimento de nitrogênio, e mostraram que há uma redução da enzima GS em alta disponibilidade de nitrogênio (7.15 mM), sugerindo que o metabolismo no nitrogênio deve estar associado à tolerância da fotossíntese à água, que afeta a difusão do gás carbônico e ajuste osmótico. Liang et. al. (2011), que estudaram duas variedades de arroz. Esses autores verificaram um decréscimo na atividade de GS quando as plantas foram mantidas em alta temperatura (35 °C/29 °C – dia/noite). Cui et. al. (2006) ao estudarem dois cultivares de *Festuca arundinacea*, uma tolerante ao calor (Jaguar 3 – J3) e uma sensível ao calor (TF 66 – T6), também relataram uma redução na atividade da GS mesmo em maiores concentrações de amônio, observadas em 10 e 20 dias do tratamento em alta temperatura (35 °C/30 °C). Esses autores concluíram que houve uma relação significativamente negativa entre o aumento da concentração do amônio e a redução da atividade de GS, provavelmente causada pela temperatura. Assim, a redução na atividade da GS ocasionou a diminuição da assimilação de amônio por essa via (Chien e Kao, 2000). Isso corrobora com os resultados obtidos em *A. imperialis*. Foi observado o aumento do amônio de acordo com a sensibilidade da planta à temperatura, levando à uma diminuição da atividade da enzima GS. É possível supor que os períodos maiores que 7 dias tenham relação com aumento da proteólise culminando com os maiores valores de amônio (472,47 µg NH<sub>4</sub>/g MF e 810,26 µg NH<sub>4</sub>/g MF, para 11 e 15 dias respectivamente), como relatado por Henckel (1964), que sugere que o aumento da temperatura eleva a taxa de proteólise nas plantas, fazendo com que se eleve o acúmulo de nitrogênio solúvel nos tecidos, em particular, a amônia, intoxicando a planta.

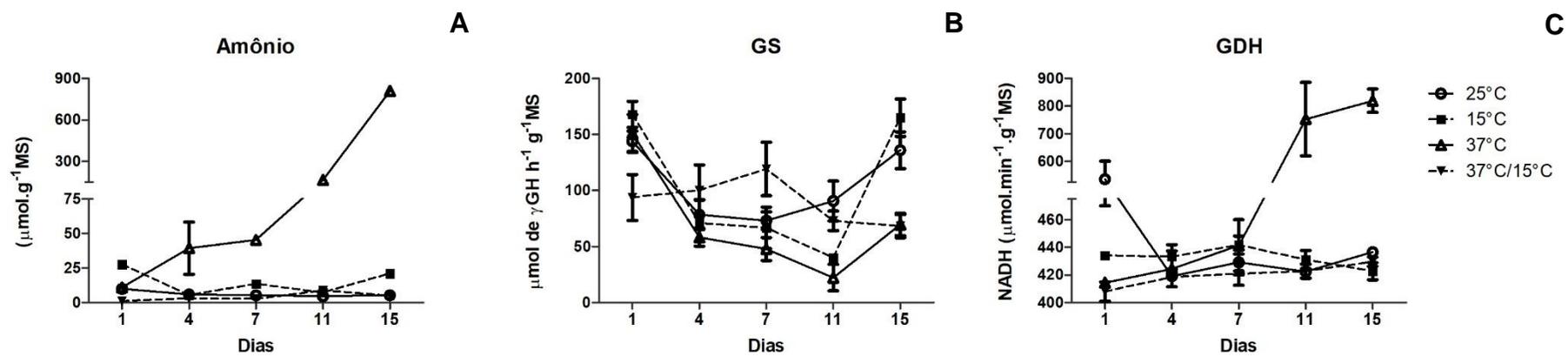
De modo interessante, quando as plantas de *A. imperialis* foram mantidas em temperaturas alternadas, em 37° C somente no período de claro, não foi observado o mesmo resultado que quando mantidas na temperatura alta constante. Provavelmente a diminuição da temperatura no período de escuro favoreceu recuperação da bromélia imperial garantindo a sobrevivência. As atividades de GS foram similares àquelas das plantas mantidas nos tratamentos mais frios. Uma vez que as temperaturas selecionadas para este trabalho ocorreram com base na previsão do IPCC (2007) referente ao aquecimento global, *A. imperialis* se mostrou resistente à essa previsão, desde que a temperatura do período noturno não seja elevada.

Por outro lado, a partir do 11º dia, a GDH a 37°C teve um aumento significativo, mas os demais tratamentos e dias de coleta, não tiveram diferença significativa (Figura 7C). O mesmo pode ser observado no trabalho de Cui *et al.* (2006) que mostrou que atividade de GDH não alterou até 10 dias de estresse em alta temperatura, mas em T6, após os 20 dias de tratamento aumentou em comparação ao controle. Já o cultivar Jaguar 3, diferente de TF 66 e *A. imperialis*, diminuiu a atividade da GDH. O comportamento diferencial do GDH nas duas cultivares de *Festuca*, mostra que há uma possível associação da enzima com a tolerância ao calor. O aumento da GDH mostra que pode desempenhar um papel importante na assimilação de amônio em cultivares sensíveis ao calor e, sendo assim, também corrobora com estudos anteriores feitos por (Lutts *et al.* 1999; Llorens *et al.* 2000). Acredita-se que esse aumento da GDH ocorre, devido à uma quantidade elevada de amônio (Magalhães e Huber, 1991, Skopelitis *et al.*, 2006, Li *et al.*, 2011). Por outro lado, alguns autores apontam que a principal atividade catalítica desta enzima *in vivo* seja a desaminação do glutamato (Mifflin & Habash, 2002, Lea & Mifflin, 2003, Masclau-Daubresse *et al.*, 2010), nesse caso, pode-se concluir, que a maior atividade da GDH nas plantas de *A. imperialis*, a partir do 11º dia de calor, seja no sentido de assimilar o amônio, que foi produzido em grande quantidade devido ao aumento da temperatura.

Logo após um dia de exposição ao frio constante de 15°C, foi verificado um aumento de amônio, e ao final do experimento, aos 15 dias, também houve um aumento significativo desse íon (Figura 7A). O mesmo pode ser observado

no trabalho de Calatayud *et al.* (2008) ao estudar rosas mantidas a 10 ° C e no trabalho de Carvalho *et al.* (2018) nas plantas de *N. minutum* mantidas a 10 °C. Esse fato pode ser associado à formação de amônio a partir da absorção e hidrólise de proteínas (Zhang *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017).

A 15°C, aos 15 dias há um aumento significativo da enzima GS (Figura 7B). Como já citado anteriormente, Liu *et al.* (2017), avaliaram as baixas temperaturas (3 °C dia/1 °C) em duas espécies de musgo *P. cirratum* e *H. plumaeforme* e, verificaram que as baixas temperaturas em combinação com maior disponibilidade de diferentes fontes nitrogenadas, maior a atividade da enzima GS, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho com *A. imperialis*. Esse aumento da atividade da GS pode intensificar a assimilação de amônio (Tang *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2001; Miflin *et al.*, 2002; Jin *et al.*, 2007). Pode-se concluir que o aumento da GS e a baixa quantidade de amônio, em comparação às plantas cultivadas à 37 °C, ocorreram devido a intensificação da assimilação desse íon.



**Figura 7** - A) Conteúdo de amônio endógeno, B) Atividade da glutamina sintase (GS) e C) atividade da glutamato desidrogenase (GDH) na parte aérea de *A. imperialis*, nas diferentes temperaturas.

A figura 8 mostra o teor de pigmentos fotossintéticos nas plantas de *A. imperialis* mantidas nas diferentes temperaturas. Verificou-se um decréscimo dos teores de clorofila e carotenoides nas plantas mantidas a 37 °C, no decorrer do período de cultivo, quando comparadas àquelas do tratamento controle (25 °C). Shah & Paulsen (2003) mostraram que a resposta de plantas de trigo mantidas em altas temperaturas (35 °C/30 °C), ocorreu logo na primeira semana de exposição. Esses autores observaram uma redução na fotossíntese e, uma redução ainda maior quando esse estresse foi combinado à períodos de seca. Camejo *et. al.* (2004) estudando duas variedades de tomate, verificaram que ao serem colocadas em altas temperaturas (45°C e 40°C), houve um aumento de clorofila *a*, uma redução de clorofila *b* e o aumento de carotenoides. Sugeriram que o aumento de clorofila *a* e carotenoides serviu para proteger o aparato fotossintético frente a temperatura elevada e alta luminosidade. Em baixas temperaturas, o teor de clorofila e carotenóides em *A. imperialis* (Figura 8A, 8B e 8C) aumentou, com destaque para a clorofila *a* (Figura 2A), com valores duas vezes mais altos quando comparados ao tratamento controle de 25 °C. Shah & Paulsen (2003) mostraram que as plantas de trigo colocadas em baixas temperaturas, 15 °C/10 °C tiveram um decaimento na fotossíntese. Plantas de milho cultivadas a 15 °C, também apresentaram aos menores teores de pigmentos fotossintéticos, que foram associados à redução nas taxas de Fv/Fm (Fracheboud *et al.*, 1999). Os trabalhos citados não corroboram com o que aconteceu no resultado de temperatura baixa em *A. imperialis*. Possivelmente, esse aumento de clorofila *a* serviu para proteger o aparato fotossintético da planta em baixas temperaturas.

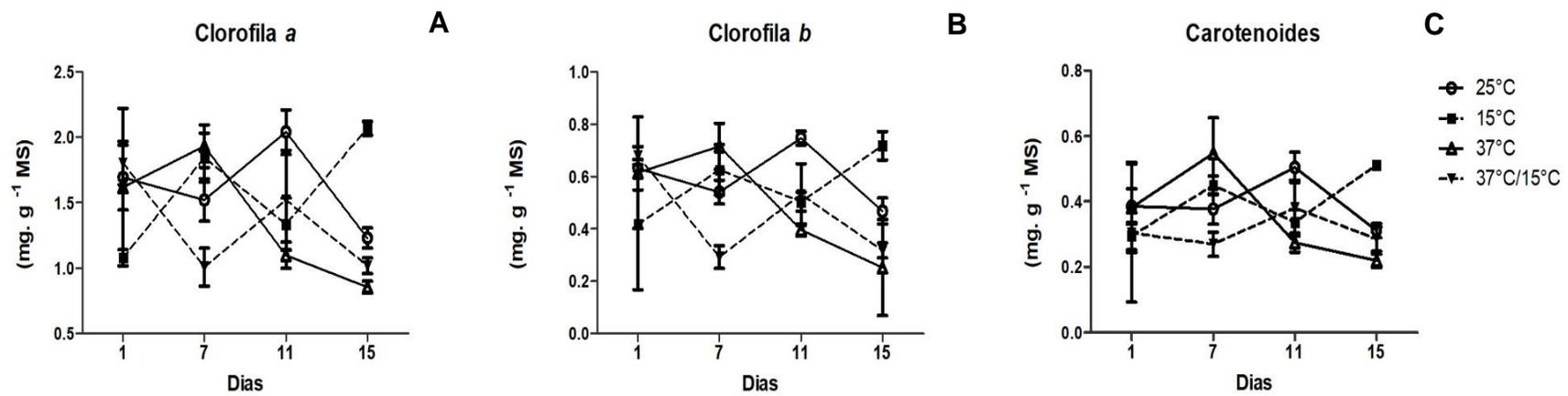
Avaliando a fluorescência das plantas de *A. imperialis* mantidas a 37 °C, foi observado um decréscimo nos valores de F0 e Fv/Fm a partir do 7º dia, que persistiu até o 15º dia (Figura 9A e 9C), em comparação com o tratamento controle. Ferguson *et al.* (1991) mostram em seu artigo que quanto maior a temperatura (até 40 °C) durante 8 dias de experimento em plantas de tabaco e milho, apresentaram menores os índices Fv/Fm, corroborando com os dados obtidos com *Alcantarea imperialis* em 37 °C

para do 7° ao 15° dia. Esses dados sugerem que houveram danos no aparato fotossintético.

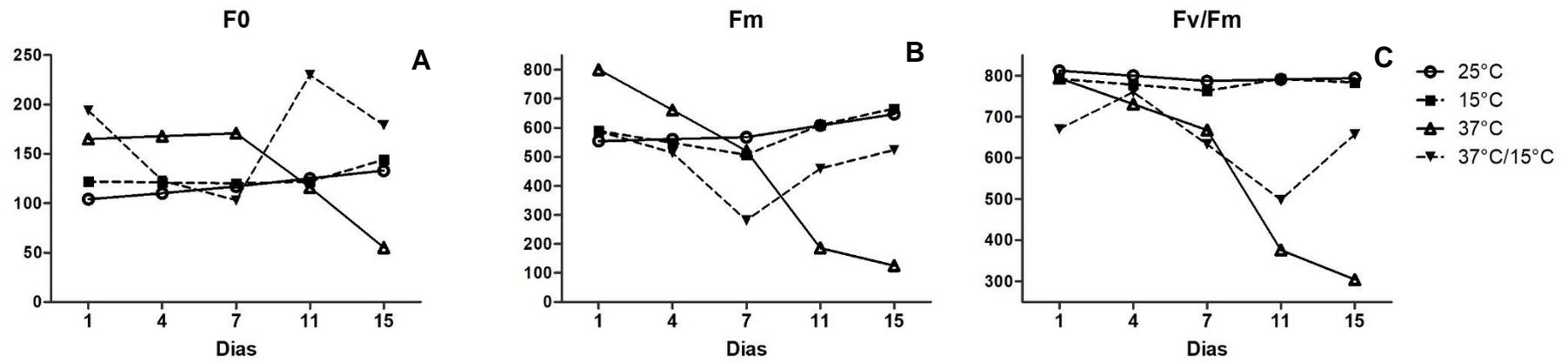
Verificou-se que os valores de Fv/Fm para as plantas de *A. imperialis* mantidas a 25 e 15° C, estiveram próximos a 0,800 (Figura 9C), diferente do que ocorreu no trabalho de Carvalho *et. al* (2018) estudando os efeitos do frio (10 °C) em *Nidularium minutum*, verificaram que houve uma redução da relação Fv/Fm, uma vez que afetou o potencial máximo da eficiência fotoquímica do fotossistema II, após 72 h. Os autores sugerem um comprometimento da transferência de energia do complexo antena para os centros de reação, após verificar um aumento na fluorescência inicial nas plantas que foram transferidas para 10° C. E, o mesmo ocorreu com os resultados observados para a bromélia *Aechmea blanchetiana* e trigo cultivado a 10 °C e entre 0 e 8 °C, respectivamente (Groom e Baker, 1992; Chaves *et al.*, 2014). É possível concluir que o frio não interferiu na eficiência de *A. imperialis*, uma vez que os valores de Fv/Fm de temperatura baixa ficaram próximos àquelas mantidas a 25° C.

As plantas em alternância mostraram uma queda nos valores de Fv/Fm a partir do 4° dia, porém uma queda menor do que nas plantas mantidas a 37 °C, comparadas ao controle (25 °C) e, houve um aumento nos valores de F0 observados nas plantas em alternância a partir do 11° dia, juntamente com a redução nos valores de Fv/Fm (Figura 9A e 9C), sugerindo que a temperatura noturna mais baixa tenha amenizado os danos que seriam causados pela temperatura alta constante.

Os resultados obtidos nesse trabalho com *A. imperialis*, sugerem que os valores próximos ao controle em baixa temperatura resultou em pouco ou nenhum dano à fotossíntese; em temperatura alta, os valores muito abaixo ao controle, geraram grandes prejuízos na fotossíntese; e, em alternância os valores são menores em relação ao controle, mas superiores aos constantes de 37 °C. Logo, pode-se concluir que altas temperaturas causam mais danos as plantas de *A. imperialis*, ao avaliar a fluorescência.



**Figura 8-** Conteúdo de pigmentos fotossintéticos (mg) (clorofila *a*, *b* e carotenoides) por grama de massa seca de *A. imperialis*, A) Clorofila *a* B) Clorofila *b* e C) Carotenoides, nas diferentes temperaturas.



**Figura 9-** A) Fluorescência mínima (F0), B) Fluorescência máxima (Fm) e C) Taxa de rendimento do fotossistema II (Fv/Fm) em *A. imperialis*, nas diferentes temperaturas.

Os resultados referentes às análises das plantas de *A. imperialis* que foram transferidas da condição de tratamento constante de 37° C por 7 dias, para 25° C, aqui denominada de-aclimação (Debat e David, 2001) estão na tabela 2 e figura 10. As plantas apresentaram o aumento da quantidade de raiz, tamanho de raiz e tamanho de folha; não houveram folhas mortas. Após 7 dias à 37 °C (TI) as plantas estavam com conteúdo relativo de água à 74,08%, após ser de-aclimatada e avaliada depois de 15 dias, o conteúdo de água estava em 90,72%. Rapacz (2002), estudando a de-aclimação de *Brassica napus* var. Oleifera, verificou que a partir da segunda semana de de-aclimação, as plantas aumentaram seu crescimento e continuaram crescendo até o fim do experimento, corroborando com os dados obtidos neste trabalho. Ao avaliar esses dados é possível sugerir que após as plantas de *A. imperialis* terem passado 7 dias em temperatura alta constante e depois serem de-aclimatadas, conseguem se recuperar e manter seu crescimento e desenvolvimento.

O teor de clorofila *a* diminui significativamente nas plantas de-aclimatadas e os teores de clorofila *b* e carotenóides permanecem sem diferença significativa, comparadas ao tempo inicial (TI) (Figura 8A). Foram observados também menores valores de F0 e um aumento nos valores de Fv/Fm nas plantas que tinham passado pelo período de 7 dias a 37° C constantes antes de serem transferidas para 25° C (Figura 8B). Não foram encontrados trabalhos de de-aclimação em altas temperaturas que relatam os parâmetros citados anteriormente. O processo de recuperação da bromélia imperial, indicam uma fotoinibição dinâmica, que é a capacidade de recuperação da planta após ter sofrido algum estresse. Porém não se reestabeleceu totalmente, uma vez que o tempo passado em temperatura alta possivelmente prejudicou a clorofila, devido a diminuição de clorofila *a*.

Nas plantas a 37 °C após 7 dias, é possível observar inicialmente um aumento de amônio de até 4 dias e, posteriormente, uma queda, aproximando os valores do tratamento controle de 25 °C (Figura 8C). Juntamente com o amônio, GS também sofreu alterações, manteve-se ainda um pouco abaixo do controle e GDH se manteve sempre com

valores próximos ao controle (Figura 8D). Giri *et. al.* (2017) cultivaram *Solanum lycopersicum*, em 25 °C dia/20 °C noite e transferiram para temperaturas mais altas (35 °C dia/30 °C noite e 42 °C dia/37 °C noite) durante 6 dias. Após 6 dias, as plantas foram de-aclimatadas para 25 °C dia/20 °C noite. Relataram que houve um aumento das enzimas estudadas (GS e GDH) quando colocadas em altas temperaturas, e ao serem de-aclimatadas, as plantas que estavam à 35 °C baixaram os níveis das enzimas, porém as plantas que estavam à 42 °C mantiveram constante os níveis de GDH e aumentaram um pouco mais os níveis de GS. Desse modo, os autores sugerem que houve uma recuperação quase completa das plantas. Os dados de GS avaliados corroboram com o que foi obtido nesta dissertação, porém os dados de GDH são diferentes, uma vez que não houve alteração na GDH quando as plantas de *A. imperialis* foram mantidas em altas temperaturas antes de serem de-aclimatadas.

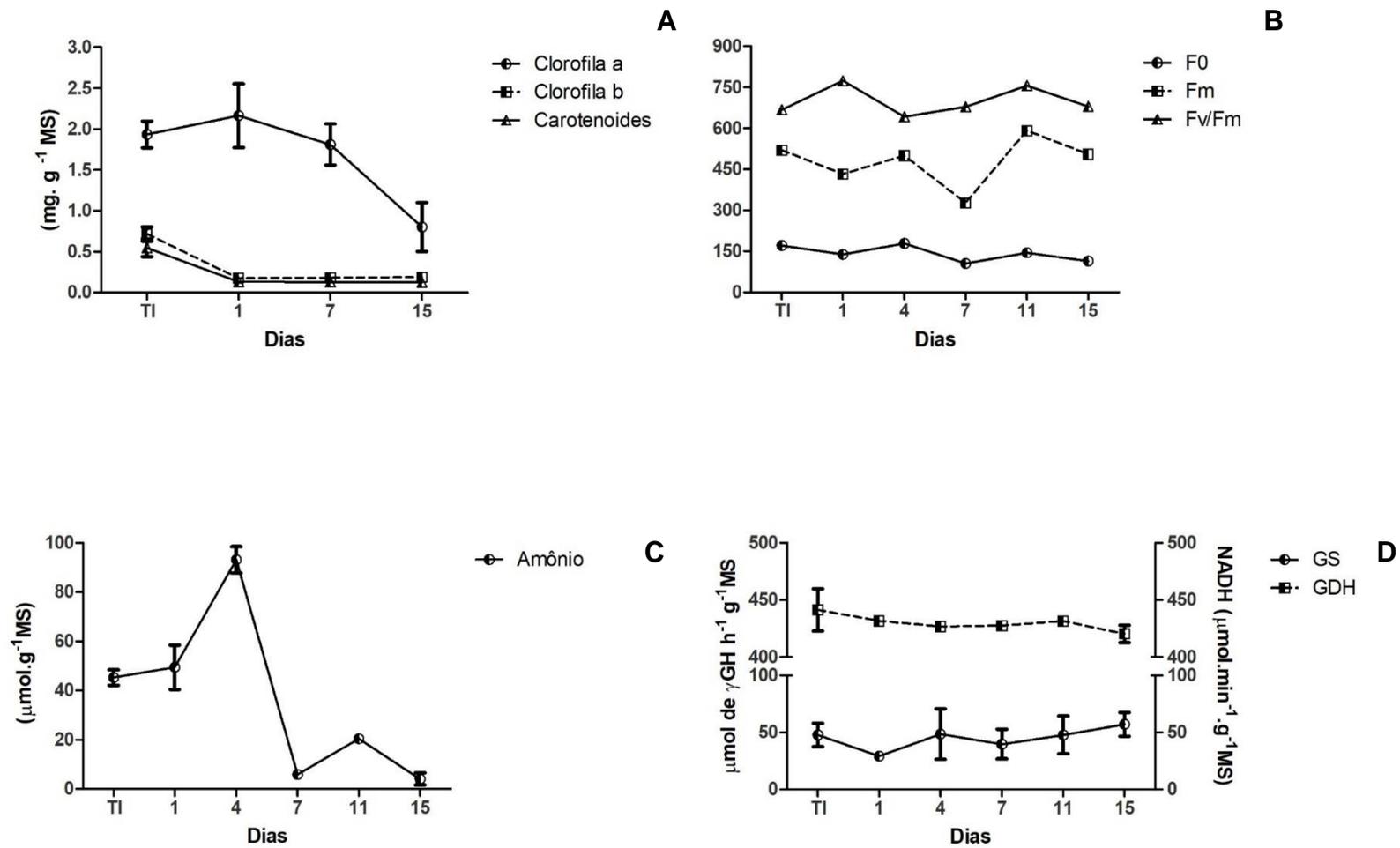
Como a de-aclimação a 25 °C não restaurou as atividades de GS igual ao controle a 25 °C, é possível que parte do aparato enzimático tenha sido afetado pelo período de calor. Trabalhos encontrados que avaliam a enzima referida, utilizam, na metodologia, a temperatura de 30 °C (Elliott, 1955 apud Farnden e Robertson, 1980; Kurita, 2015; Silva, 2016).

Resultados sobre de-aclimação em bromélias são escassos. Contudo, os resultados avaliados por nosso grupo de pesquisa sobre a de-aclimação após a exposição ao frio em plantas da bromélia *N. minutum*, apontam para a plasticidade de espécies desse grupo. Nesse trabalho foi observado que as plantas que estavam a 10° C e foram transferidas para 25° C apresentaram recuperação nos valores de pigmentos fotossintéticos que foram alterados, baixos valores para F0 e valores mais altos da razão Fv/Fm quando comparadas as plantas mantidas a 10 °C permanentemente, indicando a capacidade de restauração do aparato fotossintético (Carvalho *et. al.* 2018). Nesse mesmo trabalho foi verificado que ao de-aclimatar as plantas de *Nidularium minutum* houve uma redução no conteúdo de amônio endógeno. Considerando que existem respostas idênticas das plantas à diferentes tipos de estresse (Levitt, 1980; Larcher, 2006), é possível supor

que os parâmetros avaliados neste trabalho sejam importantes para identificar a resiliência das espécies vegetais aos eventos de alterações climáticas que levam à estresses simultâneos. Neste sentido, a busca por conhecimento acerca dos mecanismos de resistência torna-se cada vez mais necessária.

**Tabela 2** - Parâmetros biométricos e conteúdo relativo de água analisados da parte aérea e radicular de *A. imperialis*, no Tempo inicial (TI), referente aos 7 dias à 37°C e na de-aclimação ao final do experimento (15 dias). Letras minúsculas distintas, indicam diferença significativa na análise de variância (ANOVA) com variação entre médias comparados usando o teste de Tukey em  $P < 0,05$ .

	TI	De-aclimação
Número de folhas	6,20 ± 0,79 a	5,70 ± 0,67 b
Número de raiz	1,40 ± 0,52 b	2,40 ± 0,52 a
Tamanho de folha (cm)	1,83 ± 0,25 b	2,93 ± 0,45 a
Tamanho de raiz (cm)	0,44 ± 0,08 b	0,86 ± 0,30 a
Folhas mortas	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a
Conteúdo relativo de água	74,08 ± 1,18 b	90,72 ± 0,46 a



**Figura 10-** De-aclimatação A) Pigmentos fotossintéticos, B) Fluorescência, C) Conteúdo de amônio endógeno e D) Enzimas glutamina sintetase e glutamato desidrogenase em *A. imperialis*.

## 5. Conclusão e Perspectivas futuras

As plantas de *Alcantarea imperialis*, com base nos parâmetros avaliados nessa dissertação, podem ser consideradas resistentes as mudanças climáticas previstas pelo IPCC, desde que a temperatura noturna seja baixa, pois esta é determinante na sobrevivência das plantas sob danos maiores por alta temperatura.

Caso haja um período de uma semana de temperatura alta constante e posteriormente temperaturas mais amenas por volta dos 25 °C, as plantas resistem e são capazes de se recuperar dos danos sofridos pelas altas temperaturas.

Tendo em vista esses resultados, é possível identificar os genes responsáveis por essa resiliência.

Visando esclarecer melhor o funcionamento da planta em altas temperaturas, seria necessária a análise de outros parâmetros: conteúdo dos ácidos orgânicos para verificar se houve aumento de malato e citrato, que servem como protetores na intoxicação por amônio, por exemplo, e na homeostase da planta sob situação de estresse, levando à aclimação; metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) para ver se é induzido nessa condição; conteúdo de carboidratos solúveis, para verificar a capacidade de osmorregulação da planta, devido ao efeito secundário do estresse por temperatura, a seca; danos de membrana, medindo peroxidação lipídica (LPO); e sistema antioxidante enzimático - superóxido dismutase (SOD), glutathione redutase (GR), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT), devido ao estresse oxidativo gerado pelas altas temperaturas.

## 6. Referências

Armond, P. A., Schreiber, U., & Björkman, O. 1978. Photosynthetic acclimation to temperature in the desert shrub, *Larrea divaricata*. *Plant Physiology*, 61: 411–415.

Benzing, D. H. 2000. *Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation*. Cambridge University Press, Cambridge. 690p. Björkman, O. 1975. *Photosynthetic responses of plants from contrasting thermal environments*.

Thermal stability of the photosynthetic apparatus in intact leaves. Carnegie Institution of Washington Year Book, 74: 748–751.

Buchanan, B. B., Gruissem, W. & Jones, R. L. Bioquímica e Biologia Molecular das Plantas. 2ª edição. 2015.

Cach-Pérez, J.; Andrade, M. J. L.; Reyes-García, C. La susceptibilidad de las Bromeliáceas epífitas al cambio climático. Botanical Sciences, v. 92, n. 2, p. 157–168, 2014.

Camejo, D., Rodríguez, M., Morales, M.A., Dell'Amico, J.M., Torrecillas, A., Alarcón, J. J. High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. Journal of Plant Physiology, v. 162, p. 281-289, 2005

Cammaerts, D. & Jacobs, M. A study of the role of glutamate dehydrogenase in the nitrogen metabolism of *Arabidopsis thaliana*. Planta 163: 517-526, 1985.

Carvalho, M. A. M. & Dietrich, S. M. C. 1993. Variation in fructan content in the underground organs of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby at different pH 12.

Carvalho, C.P., Gustavson, P.C., Rodrigues, E., Braga, M.R., Mercier, H., Nievola, C.C. Low temperature acclimation and de-acclimation of the subtropical bromeliad *Nidularium minutum*: Implications of changes in the NO, sugar content and NR activity. Environmental and Experimental Botany v 159, p 34-43, 2019

Chaves, C. J. N. Aspectos morfofisiológicos da termotolerância de bromélias. UFMG. Dissertação. 2013.

Chaves, C.J.N., Leal, B.S.S., Lemos-Filho, J.P. Temperature modulation of thermal tolerance of a CAM-tank bromeliad and the relationship with acid accumulation in different leaf regions. Physiologia Plantarum, 2014

Crawford, A.J., McLachlan, D. H., Hetherington, A. M., Franklin, K. A. High temperature exposure increases plant cooling capacity. Current Biology, vol. 22, n 10, 2012

Daniell, J.W., Chappell, W.E., Couch, H.B. Effect of Sublethal and Lethal Temperatures on Plant Cells. Plant Physiology, 44, p. 1684-1689, 1969.

Farden, K.J.S.; Robertson, J.G. 1980. Methods for studying enzyme involved in metabolism related to nitrogenase. In: BERGSEN, F.J. Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation. John Wiley & Sons Ltda, p. 279-286.

Fiehn O. 2002. Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*, 48:155–71

Ferguson, D. L., Burke, J.J. Influence of Water and Temperature Stress on the Temperature Dependence of the Reappearance of Variable Fluorescence following Illumination. *Plant Physical*, 97, p.188-192, 1991

Gerendás, J., Zhu, Z., Bendixen, R., Rateliffe, R. G., Sattelmacher, B., 1997. Physiological and biochemical processes related to ammonium toxicity in higher plants. *Z. Pflanzenernähr. Bodenkd.* 160, 239-251.

Giri, A., Heckathorn, S., Mishra, S., Krause, C. Heat Stress Decreases Levels of Nutrient-Uptake and Assimilation Proteins in Tomato Roots. *Plants*, 2017

Hatfield, J.L., Prueger, J. H. Temperature extremes: Effect on Plant growth and development. *Weather and Climate Extremes*, 10, p. 4-10, 2015

Henckel, P.A. Physiology of plants under drought. *Annual Review of Plant Physiology*, 15:363-86, 1964.

Hou, W., Sun, A. H., Chen, H. L., Yang, F. S., Pan, J. L., Guan, M. Y., 2016. Effects of chilling and high temperatures on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in leaves of watermelon seedlings. *Biol. Plant.* 60, 148-154. doi: 10.1007/s10535-015-0575-1.

Ibama. 1989. Unidades de Conservação do Brasil. Parques Nacionais e Reservas Biológicas, Brasília. v. 1.

Iba, K., 2002. Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annu. Ver. Plant Biol.* 53, 225-45. doi: 10.1146/anurev.arplant53.100201.160729

IPCC. 2007. Summary for Policymakers. In M. L. Parry, O. F. Canzianik, J. P. Palutikof, P. J. van der Linden, & C. E. Hanson (Eds.), *Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change: 7–22.* Cambridge, UK: Cambridge University Press.

IPCC. Intergovernmental Panel on Climate change 2014. Synthesis report. Versión inglés. [S.l: s.n.], 2014.

Lafta, A.M., Lorenzen, J.H. Effect of High Temperature on Plant Growth and Carbohydrate Metabolism in Potato. *Plant Physical*, 109, p.637-643, 1995

Lea, P. J. Nitrogen metabolism. In: Lea, P. J. & Leegood, R. C. (eds.). Plant Biochemistry and Molecular Biology. 1ª ed. England: John Wiley & Sons Ltda.; pp: 155 – 180, 1993. Leegood RC. Carbon dioxide-concentrating mechanisms. In: Lea PJ, Legood RC (eds). Plant Biochemistry and Molecular Biology, 1ª ed. New York: Wiley & Sons. 1993, p. 47 – 72.

Leme, E. M. C & Marigo, L. C. 1993. Bromélias na natureza. Marigo Comunicação Visual Ltda. Rio de Janeiro. 183p.

Levitt, J. (1980) Responses of Plant to Environmental Stress: Water, Radiation, Salt and Other Stresses. Academic Press, New York, 365.

Liang C.G. Chen L.P. Wang Y. Liu J. Xu G.L. Li T. 2011 High temperature at grain-filling stage affects nitrogen metabolism enzyme activities in grains and grain nutritional quality in rice Rice Sci. 18:210-216

Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and Carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology 148: 350-382.

Liu, Y., Subhas, C., Yan, J., Song, C., Zhao, J. Maize leaf temperature responses to drought: Thermal imaging and quantitative trait loci (QTL) mapping Li, J. Environmental and Experimental Botany 71 (2011) 158–165 Majerowicz, N. Fotossíntese. In: KERBAUY, G. B. Fisiologia Vegetal. 2. Ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap. 5, 2012, p.117-121. Mathur, S.; Agrawal, D.; Jajoo, A. Photosynthesis: Response to high temperature stress. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 137, p. 116-126, 2014.

Liu, CY Lei, WQ Liu. Nitrogen addition exacerbates the negative effects of low temperature stress on carbon and nitrogen metabolism in moss. Frontiers in plant science, 2017

Mai, J., Herbette, S., Vandame, M., Kositsup, B., Kasemap, P., Cavaloc, E., Julien, J. L., Améglio, T., Roeckel-Drevet, P., 2009. Effect of chilling on photosynthesis and antioxidant enzymes in *Hevea brasiliensis* Muell. Arg.. Trees Struct. Funct. 23, 863-874. doi:10.1007/s00468-009-0328-x

Larcher, W. Ecofisiologia Vegetal. São Carlos: RIMA, 2006.

Marschner, Horst e Marschner, Petra. 2012. Marschner's mineral nutrition of higher plants. 3 ed. London: Academic Press.

Mccullough, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. Clinica Chimica Acta 17(2): 297-304.

Miflin, B. J. & Habash, D. Z. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *J. Exp. Bot.* 53 (370): 979/987, 2002. 13

Miura, K., Furumoto, T., 2013. Cold signaling and cold response in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 5312-5337. doi:10.3390/ijms14035312

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* DOI 10.1007/s11240-011-9966-y, v. 107, 1 (2011), p.141-149.

Nievola, C. C. et al. Temperature determines the occurrence of CAM or C3 photosynthesis in pineapple plantlets grown in vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 200

Nievola, C.C., Carvalho, C.P., Carvalho, V., Rodrigues, E. Rapid responses of plants to temperature changes. 2017.

Nimer E. 1977. Clima. In: IBGE (org.) *Geografia do Brasil: Região Sudeste*. 3ª ed., Rio de Janeiro, Editora IBGE, p.51-89. Nunes, J.V.C. 2006. Bromélias. In: L.L. Simões & C.F. Lino. *Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais*. 2.ed. São Paulo, Senac. pp. 119-132

Petinov, N. S., and U. G. Molokovsky. 1960. The protective processes of heat-resistant plant. In *Plant-water relationships in arid and semi-arid conditions*. *Arid Zone Res. UNESCO (Paris)*, Proc. 15:167-180.

Porembski, S. 2007. Tropical inselbergs: habitat types, adaptive strategies and diversity patterns. *Revista Brasileira de Botânica* V.30, n.4, p.579-586. Reece, J. B., *Biologia de Campbell*. 10ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2015..

Rapacz, M., Sasal, M., Gut, M., 2011. Chlorophyll fluorescence-based studies of frost damage and the tolerance for cold-induced photoinhibition in freezing tolerance analysis of triticale (*Triticosecale* Wittmack). *J. Agron. Crop Sci* 197, 378-389. doi: 10.1111/j.1439-037X.2011.00472.x

Rapaez, M. Regulation of frost resistance during cold de-acclimation and re-acclimation in oilseed rape. A possible role is PSII redox state. *Physiologia Plantarum*, v.115, p. 236-243, 2002.

Roessner U, Wagner C, Kopka J, Trethewey RN, Willmitzer L. 2000. Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. *Plant Journal*, 23:131–42.

Ruelland, E., Zachowski, A., How plants sense temperature. *Environmental and Experimental Botany*, v.69, n.3, p.225-232, 2010.

Shah, N.H., Paulsen, G.M. Interaction of drought and high temperature on photosynthesis and grain-filling of wheat. *Plant and soil*, 257, p. 219-226, 2003

Shatters, R.G.JR.; Abdelghany, A.; Elbagoury, O. Soybean seed deterioration and response to priming: changes in specific enzyme activities in extracts from dry and germinating seeds. *Seed Science Research*, Wallingford, v. 4, n.1, p. 33-41, 1994.

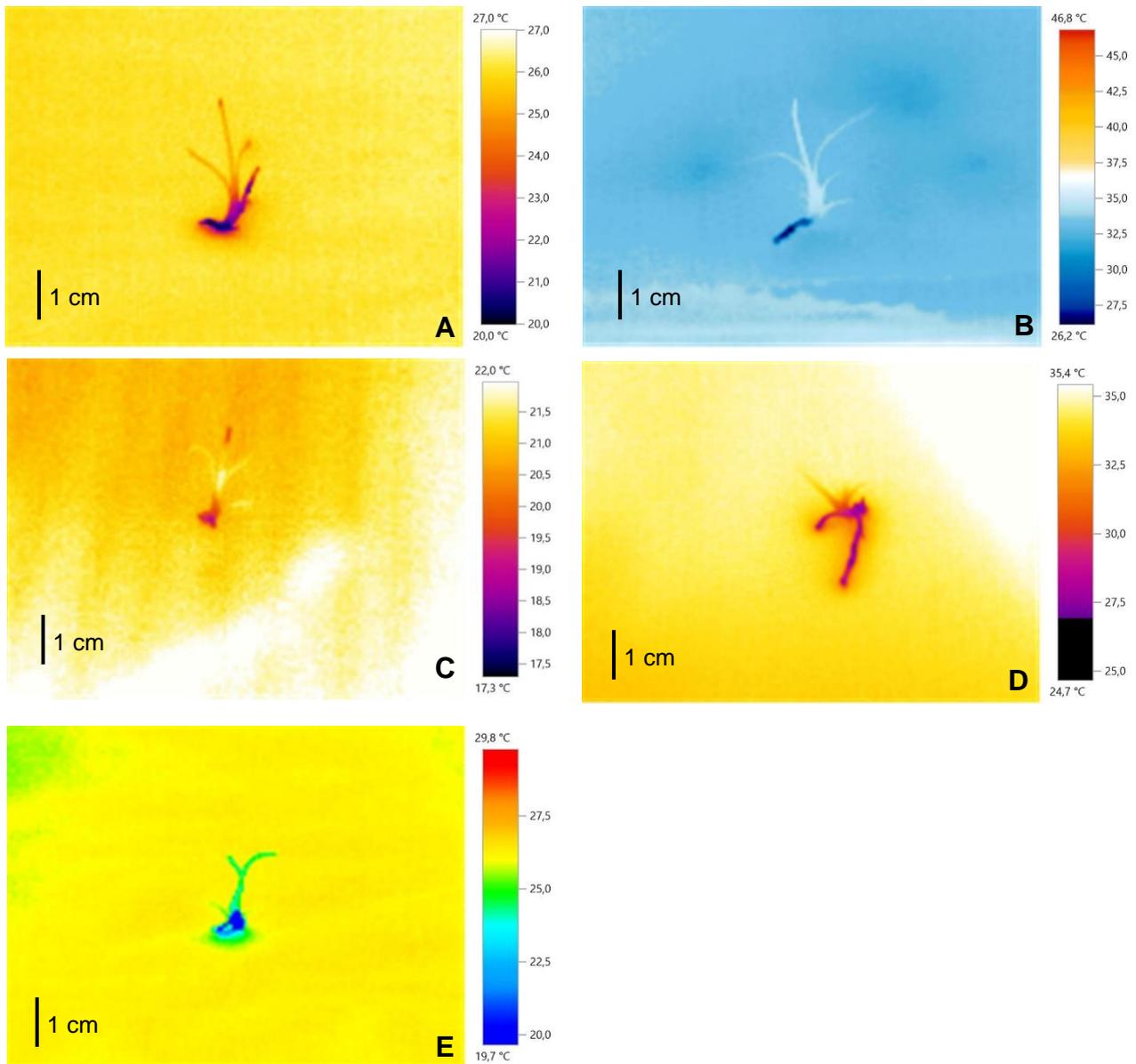
Weatherburn, M.W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry* 39: 971-974. Yamada, M., Hidaka, T., & Fukamachi, H. 1996. Heat tolerance in leaves of tropical fruit crops as measured by chlorophyll fluorescence. *Scientia Horticulturae*, 67:39–48.

Yamada, M., Hidaka, T., & Fukamachi, H. 1996. Heat tolerance in leaves of tropical fruit crops as measured by chlorophyll fluorescence. *Scientia Horticulturae*, 67:39–48.

Zhong, C.; Cao, X. Nitrogen Metabolism in Adaptation of Photosynthesis to Water Stress in Rice Grown under Different Nitrogen Levels. *Front. Plant Sci.* 2017, 8, 1079

## 7. Anexos

### Anexo 1



**Figura 11-** Imagens termográficas de *Alcantarea imperialis*. A) 25 °C, B) 37 °C/15 °C, C) 15 °C, D) 37 °C, e E) 25 °C de-aclimatação.