

FERNANDA DE OLIVEIRA MENEZES

**Produção de ROS e sistema antioxidante enzimático
na bromélia CAM *Acanthostachys strobilacea*
(Schultz f.) Klotzsch & Otto exposta à seca.**

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

FERNANDA DE OLIVEIRA MENEZES

**Produção de ROS e sistema antioxidante enzimático
na bromélia CAM *Acanthostachys strobilacea*
(Schultz f.) Klotzsch & Otto exposta à seca.**

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

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

Menezes, Fernanda de Oliveira
M536p Produção de ROS e sistema antioxidante enzimático na bromélia CAM
Acanthostachys strobilacea (Schultz f.) Klotzsch & Otto exposta à seca /
Fernanda de Oliveira Menezes -- São Paulo, 2019.
41p. il.

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

1. Bromeliaceae. 2. Estresse oxidativo. 3. Metabolismo ácidos das
Crassuláceas. I. Título.

CDU: 582.564

AGRADECIMENTOS

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

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

À minha orientadora Dra. Catarina C. Nievola pela oportunidade de desenvolver este projeto. Agradeço também por todos os ensinamentos, conversas e conselhos.

À Dra. Helenice Mercier do Laboratório de Fisiologia Vegetal do Instituto de Biociências da USP pelo auxílio prestado durante o projeto.

A Dra. Marília Gaspar do Núcleo de Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica de São Paulo, pela parceria neste trabalho que foi conciliado em conjunto a aluna de iniciação científica Victória Alves.

Ao Dr. Marco Aurelio Tiné do Núcleo de Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica de São Paulo, por disponibilizar as dependências do laboratório para a realização das análises de atividade enzimática.

A Dra. Marina Crestana Guardia do Núcleo de Pesquisas em Sementes, por disponibilizar as dependências do laboratório, para as análises de potencial hídrico do substrato.

Ao Dr. Cláudio José Barbedo do Núcleo de Pesquisas em Sementes e aos seus alunos de pós-graduação pelo auxílio prestado durante as análises de potencial hídrico do substrato.

Aos funcionários, colegas e amigos do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais do Instituto de Botânica pelos momentos de descontração e apoio. A Joyce Oliveira, Gabriela M. Cabral, Guilherme Vasconcelos e Sabrina Vanessa Andrade por tornarem o convívio no laboratório muito mais alegre. Em especial a Victoria Carvalho, pela companhia e por ter me ensinado as análises bioquímicas que foram de grande importância para o desenvolvimento do trabalho.

A aluna de iniciação científica Victória Alves, por toda a ajuda e disponibilidade durante a execução dos experimentos.

A Daniela Soares dos Santos e Camila Pereira de Carvalho pelo apoio, amizade, ensinamentos e incentivo durante a pós-graduação.

À minha família, em especial minha mãe pelo apoio e paciência durante a pós-graduação.

RESUMO

Os eventos associados ao aquecimento global envolvem um cenário de menor disponibilidade hídrica devido ao aumento de temperatura, estabelecendo condições estressantes que podem comprometer a sobrevivência de certas espécies, como é o caso das bromélias epífitas. Dentre as espécies de bromélia encontradas no Brasil está a ornamental *Acanthostachys strobilacea* (Schult. & Schult.f.) Klotzsch. Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa identificaram a plasticidade dessa espécie quanto às variações da disponibilidade hídrica, o que pode estar relacionado ao fato dessa espécie apresentar a fotossíntese CAM (Metabolismo Ácido das Crassuláceas).

O metabolismo CAM é uma via fotossintética que promove tolerância à seca, permitindo altas taxas de fixação de CO₂ pelas plantas em condições de diminuição da disponibilidade de água. O estudo com bromélias epífitas em estágio inicial pode revelar os ajustes fisiológicos necessários à permanência de populações de espécies mesmo sob restrição hídrica. É possível supor que estas plantas devam apresentar rápidos ajustes de tolerância quando expostas à seca, tem sido constatado que bromélias epífitas CAM podem apresentar variações nas atividades do sistema antioxidante em condições de suspensão hídrica o que facilitaria sua sobrevivência nessa condição. De fato, quando as plantas empregam um sistema eficiente de defesa antioxidante que incluem enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), glutatona redutase (GR), os danos de membrana ocasionados por ROS (do inglês “reactive oxygen species”) como o superóxido, podem ser evitados. Além disso, existe a hipótese de que CAM pode agir como mecanismo de prevenção à produção excessiva de ROS. O objetivo do presente estudo foi avaliar a resposta ao déficit hídrico moderado e reidratação em plantas jovens da bromélia *A. strobilacea* por meio da análise de atividade do sistema antioxidante enzimático e das enzimas do CAM, fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) e malato desidrogenase (MDH).

Primeiramente, um lote de plantas foi mantido em irrigação diária e outro lote em suspensão de rega por oito dias. Após esse período as plantas mantidas em suspensão de rega foram reidratadas por 1 dia. Apesar de haver redução do conteúdo relativo de água não foram observadas quedas nos valores de potencial osmótico dos tecidos das plantas não irrigadas. Em plantas irrigadas e submetidas a suspensão de rega, foi observado diferenças na atividade das enzimas PEPC e MDH no início e final do dia, porém não foi observado diferenças na atividade dessas enzimas em relação à disponibilidade hídrica. Contudo, foi observado um aumento na atividade das enzimas do sistema antioxidante e diminuição de peroxidação lipídica (LPO),

revelando a necessidade de ativação do sistema antioxidante para redução de danos de membrana em condições de estresse moderado.

Após a reidratação as plantas recuperaram o conteúdo hídrico em níveis similares às plantas irrigadas e foi observado um aumento significativo nos níveis de superóxido e LPO. Apesar da atividade da CAT ter diminuído, as atividades da APX, SOD e GR foram maiores. Sugerindo que o período avaliado não foi adequado para a recuperação da atividade das enzimas do sistema antioxidantes em níveis similares aos observados na condição irrigada. Os resultados apresentados sugerem que, em plantas jovens de *A. strobilacea*, submetidas à seca moderada, as enzimas antioxidantes seriam as principais responsáveis pela eliminação de ROS e a diminuição da peroxidação lipídica aponta para essa situação como sendo mais favorável ao controle da homeostase celular em comparação às plantas que são mais hidratadas.

Palavras-chave: Bromeliaceae, estresse oxidativo, metabolismo ácidos das crassuláceas.

ABSTRACT

Events associated to global warming involve a scenario of lower water availability due to the increase in temperature, establishing stressful conditions that may compromise the survival of certain species, such as epiphytic bromeliads. Among the bromeliad species found in Brazil is the ornamental *Acanthostachys strobilacea* (Schult. & Schult.f.) Klotzsch. Studies performed by our research group have identified the plasticity of this species when exposed to variations in water availability, which may be related to the fact that this species presents CAM (Crassulacean Acid Metabolism) photosynthesis.

CAM is a photosynthetic pathway that promotes drought tolerance, allowing high rates of CO₂ fixation by plants under decreased water availability conditions. The study with juvenile epiphytic bromeliads may reveal the physiological adjustments necessary for the survival of the species under water restriction. It can be assumed that these plants present fast tolerance adjustments when exposed to drought. It has been observed that CAM epiphytic bromeliads show variations in the activities of the antioxidant system under drought conditions, which may facilitate its survival in this condition. In fact, when plants employ an efficient antioxidant defense system that includes enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), glutathione reductase (GR), membrane damage caused by ROS (reactive oxygen species) such as the superoxide radical, for example, may be prevented. Furthermore, it is hypothesized CAM may act as a mechanism for preventing the overproduction of ROS. The objective of this study was to evaluate the response of young plants of the bromeliad *A. strobilacea* to moderate water deficit and rehydration by analyzing the activity of the enzymatic antioxidant system and of CAM enzymes, phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) and malate dehydrogenase (MDH). First, plants were maintained under daily irrigation and without irrigation for eight days. After this period, plants without irrigation were irrigated for one day. Although there was a reduction in the relative water content, the osmotic potential was not reduced in the tissues of plants without irrigation. There were differences in PEPC and MDH activities between the beginning and end of the day, but water availability did not affect the activities of these enzymes. However, there was an increase in the activities of the enzymatic antioxidant system and a decrease in lipid peroxidation (LPO) levels, suggesting that the antioxidant system was activated under moderate stress to reduce membrane damage.

After rehydration plants quickly recovered water content to similar levels of daily-irrigated plants and was observed a significant increase in superoxide and LPO content. Although CAT

activity decreased, APX, SOD and GR activity was higher. Suggesting that the evaluated period was not adequate for the recovery of antioxidant enzymes activity at similar levels to those observed in the irrigated condition

The results show that, in young *A.strobilacea* plants, subjected to moderate drought the antioxidant enzymes are the main responsible for the elimination of ROS, and the decrease of the lipid peroxidation show this situation like more favorable to control of the cellular homeostasis in comparison to irrigated plants.

Keywords: Bromeliaceae, estresse oxidativo, metabolismo ácidos das crassuláceas.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: análise de variância

APX: ascorbato peroxidase

AsA, ASC: ácido ascórbico/ascorbato

ATP: adenosina trifosfato

C3: ciclo de Calvin-Benson

Ca (CO)₃: carbonato de cálcio

CAM: metabolismo ácido das crassuláceas

CAT: catalase

CO₂: dióxido de carbono

DHA: dehidroascorbato

DHAR: DHA redutase

d.p.: desvio padrão

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

Fe⁺²: íon divalente de ferro

Fe⁺³: íon trivalente de ferro

GR: glutathione redutase

GSH: glutathione reduzida

GSSG: glutathione oxidada

H₂O: água

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

H₂SO₄: ácido sulfúrico

IRRIGADA: plantas mantidas em regime de rega diária

LPO: peroxidação lipídica

MDH: malato desidrogenase

MDHA: monodehidroascorbato

MDHAR: MDHA redutase

MF: Massa fresca

MgCl₂: cloreto de magnésio

MS: massa seca

MT: Massa turgida

N₂: nitrogênio

NADP⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

NaOH: hidróxido de sódio

NBT: cloreto de nitrotetrazólio azul

O₂: oxigênio molecular

O₂^{•-}: radical superóxido

OAA: oxaloacetato

OH[•]: radical hidroxila

PEPC: fosfoenolpiruvato carboxilase

PFD: densidade de fluxo fotossintético

RE: tratamento de reidratação

ROS: espécies reativas de oxigênio

Rubisco: ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase

RWC: conteúdo relativo de água

SOD: superóxido dismutase

SR: Plantas mantidas em suspensão hídrica

TCA: ácido tricloroacético

Tris-HCl: tris(hidroximetil)aminometano cloridrato.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1. Mecanismos de adaptação à seca: CAM e ROS	1
1.2. Resistência de bromélias à seca	5
2. Objetivo	10
3. Materiais e métodos	10
3.1. <i>Material vegetal e condições de cultivo</i>	10
3.2. <i>Condições para o estabelecimento do período de suspensão de rega e reidratação</i> ...	11
3.3. <i>Avaliação do estado hídrico das plantas: Conteúdo relativo de água, potencial osmótico foliar, temperatura dos tecidos e medidas do potencial hídrico do substrato</i>	13
3.4. <i>Análise de CAM</i>	14
3.4.1. <i>Atividades das enzimas PEPC e MDH</i>	14
3.4.2. <i>Acidez titulável:</i>	15
3.5. <i>Análise das enzimas de CAM (PEPC e MDH) em plantas submetidas à suspensão hídrica e reidratação</i>	15
3.6. <i>Avaliação de ROS, LPO, enzimas antioxidantes</i>	16
3.6.1. <i>Superóxido</i>	16
3.6.2. <i>Peroxidação lipídica (LPO):</i>	16
3.7. <i>Enzimas do Sistema antioxidante</i>	17
3.8. <i>Análise estatística</i>	18
4. Resultados	18
4.1. <i>Seleção do período de suspensão de rega e reidratação</i>	18
4.2. <i>Avaliação do estado hídrico das plantas: Conteúdo relativo de água, potencial osmótico foliar e potencial hídrico do substrato.</i>	20
4.3. <i>Parâmetros de CAM</i>	24
4.4. <i>Superóxido e Peroxidação lipídica</i>	25
4.5. <i>Enzimas do sistema antioxidante</i>	26
5. Discussão	27
6. Considerações finais e perspectivas	31
7. Referências	34
8. ANEXOS	41
8.1. <i>Anexo 1:</i>	41

1. Introdução

1.1. Mecanismos de adaptação à seca: CAM e ROS

A seca é considerada o principal fator limitante do crescimento e desenvolvimento de plantas. A capacidade de sobrevivência das plantas à seca dependerá de “estratégias” da espécie para tolerar ou evitar o estresse, mas também da duração e severidade do período de seca. Dessa forma as plantas desenvolverem ao longo do processo evolutivo diversas adaptações que as permitem resistir e sobreviver a períodos de escassez de água (Cruz de Carvalho, 2008; Cushman, 2017).

Dentre as adaptações metabólicas à seca, a via fotossintética CAM (Metabolismo ácidos das Crassuláceas) é uma das mais distribuídas dentre o reino das plantas, onde é estimada ser utilizada por cerca de 6% das plantas vasculares, que incluem principalmente espécies de ambientes mais áridos como cactos e suculentas (Silvera *et al.*, 2010; Crayn *et al.*, 2015). A eficiência da fotossíntese CAM em ambientes secos está principalmente relacionada à alta eficiência no uso da água (razão de CO₂ assimilado: água transpirada), sendo cerca de seis vezes maior do que a observada no mecanismo de plantas C3 (Nobel 1996). Essa alta eficiência no uso de água é decorrente da fixação de CO₂ durante a noite quando os estômatos estão abertos, sendo que ficam fechados durante o dia, evitando a perda excessiva de água pela transpiração (Borland *et al.*, 2011), enquanto plantas C3 abrem seus estômatos durante o dia para fixar o CO₂ atmosférico.

O ciclo diário de CAM é dividido em quatro fases distintas (Fig.1) (Osmond, 1978). A fase I ocorre durante o período escuro, quando os estômatos se abrem permitindo a entrada de CO₂ atmosférico, que é fixado no citosol pela enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) em oxaloacetato (OAA). O oxaloacetato é então convertido a malato pela enzima malato desidrogenase (MDH), podendo também levar à produção de citrato na mitocôndria (Gawronska and Niewiadomska, 2015). O malato e citrato são então armazenados no vacúolo na forma de ácidos orgânicos, diminuindo o pH da célula durante o período noturno. A fase II, ocorre no início do período de luz. Período em que os estômatos ainda estão abertos, ocorrendo à redução da atividade da PEPC e o aumento da atividade da enzima RIBULOSE 1,5-BISFOSFATO CARBOXILASE/OXIGENASE (RUBISCO), podendo o carbono ser fixado por meio das duas enzimas (Winter and Tenhunen, 1982). A fase III corresponde ao restante do período de luz, quando os estômatos se fecham e os ácidos orgânicos são liberados no citosol

para serem descarboxilados, resultando em CO_2 . O CO_2 pode então ser refixado através da Rubisco e via C3 para síntese de carboidratos. A fase IV ocorre no do período de luz, quando o conteúdo de ácidos orgânicos já foi exaurido e os estômatos abrem novamente, permitindo a entrada de CO_2 atmosférico e a transição de sua fixação pela Rubisco para a PEPC (Borland et al., 2011). Assim, o consumo de principalmente malato durante o dia seguido por seu acúmulo crescente à noite é uma das principais características que diferenciam as plantas CAM daquelas que aplicam a via C3 de forma exclusiva para fixação de carbono (Winter and Tenhunen, 1982), em que tal flutuação não ocorre.

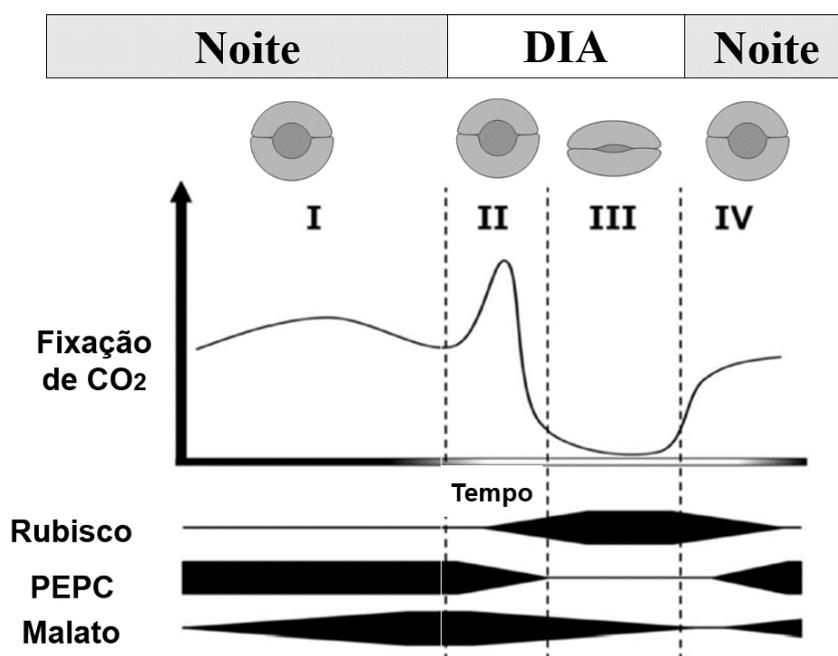


Figura 1. Fases Temporais de CAM (I, II, III e IV) ao longo de um fotoperíodo de 24 horas, as principais características das atividades de fixação de CO_2 , Rubisco, PEPC e acúmulo de malato. As formas pretas abaixo do eixo x indicam o período em que os processos descritos acima estavam ocorrendo (adaptado de (Matiz et al., 2013)).

Espécies que utilizam a via fotossintética do CAM naturalmente apresentam grande plasticidade metabólica, pois são capazes de modular a magnitude de expressão e duração de cada fase do ciclo diário deste mecanismo de acordo com as condições ambientais (Dodd et al., 2002 ;Borland et al., 2011).

A exposição à seca em que plantas estão sujeitas, pode resultar em efeitos relacionados à perda de água dos tecidos, como por exemplo, aumento excessivo na produção de espécies reativas de oxigênio ROS (Cruz de Carvalho, 2008; Hasanuzzaman et al., 2013), que resultam em estresse oxidativo (Gill and Tuteja, 2010; Miller et al., 2010).

Em plantas, a produção de ROS ocorre principalmente nos cloroplastos, iniciando-se pela incorporação de elétrons em excesso da cadeia transportadora ao oxigênio molecular (O_2),

gerando o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). A presença deste radical pode levar à produção de outras ROS como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a hidroxila (OH^{\bullet}). O H_2O_2 é formado pela redução espontânea de $O_2^{\bullet-}$ ou através da enzima superóxido dismutase (SOD); e os radicais OH^{\bullet} são gerados a partir de uma reação entre H_2O_2 e íons de ferro ou outros metais de transição (Hajiboland, 2014) (Figura 2.). Além dos cloroplastos, esta sequência de produção de ROS são naturalmente formadas em outras organelas com alto metabolismo, como as mitocôndrias e peroxissomos (Gill and Tuteja, 2010). Particularmente nos peroxissomos, há grande formação de H_2O_2 através do mecanismo da fotorrespiração, iniciado pela função de oxigenase da Rubisco (Noctor et al., 2002). E essa produção excessiva de ROS pode causar danos a proteínas, lipídios, carboidratos e DNA, levando à morte celular (Hancock' et al., 2001; Mittler, 2002); (Gill and Tuteja, 2010). Dentre os principais danos ocasionados pelas ROS está a peroxidação lipídica, que é a reação entre os lipídios poliinsaturados das membranas com, principalmente, o radical OH^{\bullet} (Gill and Tuteja, 2010).

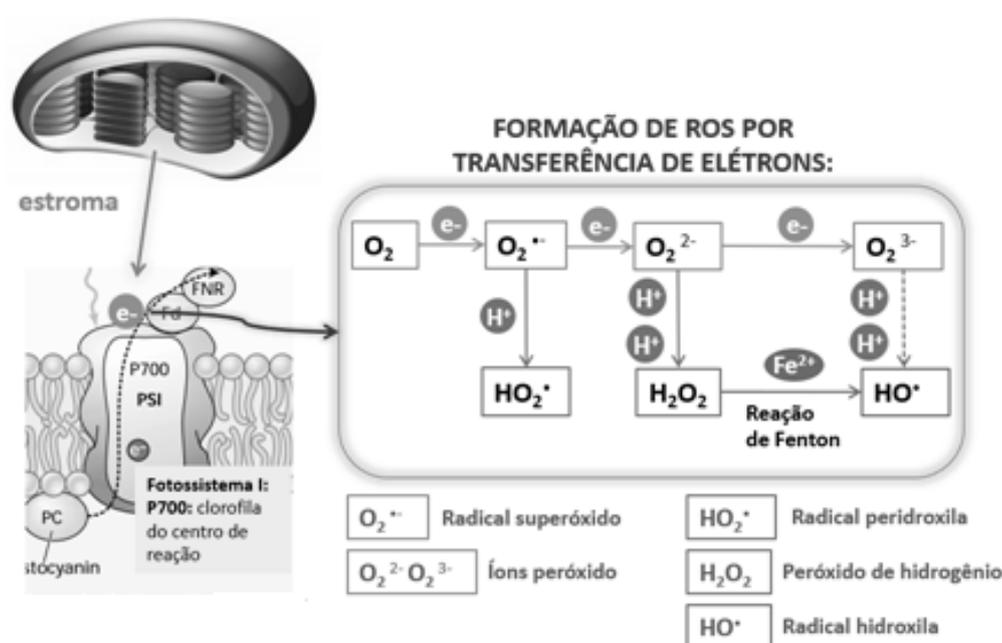


Figura 2: Formação de ROS nos cloroplastos pela incorporação de elétrons em excesso da cadeia transportadora ao oxigênio molecular (O_2) (Taiz e Zeiger 2013, Gill e Tuteja, 2010; Hajiboland, 2014; Carvalho, 2015 Adaptado).

Para se proteger contra essas ROS as células e suas organelas como cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos empregam um sistema de defesa antioxidante que incluem componentes enzimáticos e não enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos incluem superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), monodehidroascorbato (MDHAR), dehidroascorbato redutase (DHAR), glutathiona redutase (GR) e antioxidantes não enzimáticos são glutathiona reduzida (GSH), ácido ascórbico/ascorbato (AsA) (ambos solúveis

em água), carotenoides e tocoferóis (lipossolúveis) (Mittler et al., 2004); (Gill and Tuteja, 2010). Essas enzimas fornecem às células um eficiente sistema de desintoxicação.

A superóxido dismutase (SOD) é a enzima intracelular antioxidante mais eficaz, e está presente em todos os organismos aeróbicos e em todos os compartimentos subcelulares propensos ao estresse oxidativo mediado por ROS. Atualmente é bem estabelecido que vários estresses ambientais frequentemente levam ao aumento da geração de ROS e a SOD tem sido considerada importante para as plantas na tolerância ao estresse oxidativo por fornecer a primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos de níveis elevados de ROS (Gill and Tuteja, 2010). A SOD atua na remoção do $O_2^{\cdot-}$ liberando H_2O_2 e O_2 . Em seguida, as moléculas de H_2O_2 produzidas são removidas pela CAT e APX (Fig. 3A). Esta última enzima também atua dentro do ciclo ascorbato-glutationa juntamente com a GR e diversos outros componentes enzimáticos (Fig. 3B), onde são responsáveis por regenerarem o ascorbato (ou ácido ascórbico) e a glutathiona reduzida (Gill and Tuteja, 2010); (Groß et al., 2013). Estes metabólitos não enzimáticos são importantes para a eliminação dos radicais OH^{\cdot} , considerados as mais reativas e danosas formas das ROS (Foyer and Noctor, 2011). Os pigmentos fotossintéticos carotenoides também são antioxidantes não enzimáticos cruciais para eliminar as principais ROS precursoras da peroxidação lipídica, que pode danificar as membranas na região dos cloroplastos (Smirnov, 2005).

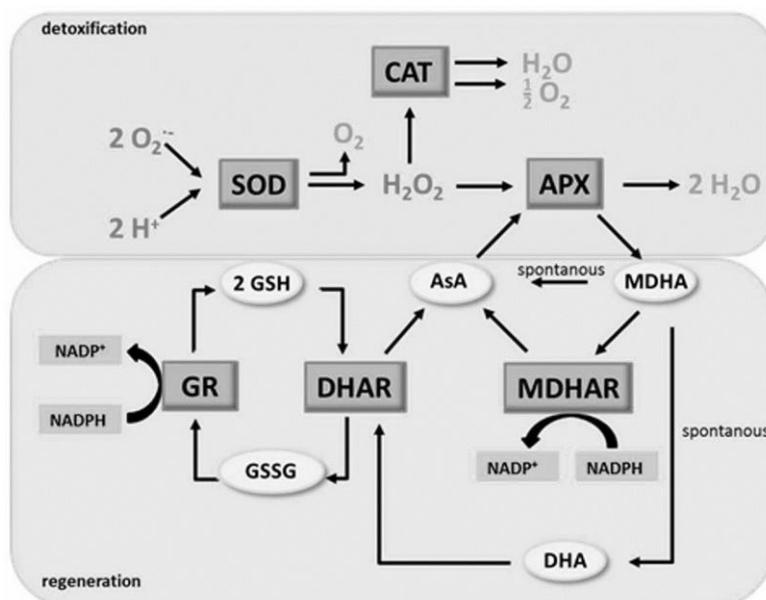


Figura 3. Principais componentes enzimáticos do sistema antioxidante em plantas. *A*) Etapas de detoxificação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), *B*) componentes do ciclo ascorbato-glutationa. SOD, superóxido dismutase; O_2 , oxigênio molecular; CAT, catalase; H_2O , água; APX, ascorbato peroxidase; AsA, ácido ascórbico/ascorbato; MDHA, monodehidroascorbato; MDHAR, MDHA redutase; DHA, dehidroascorbato; DHAR, DHA redutase; GR, glutathiona redutase; GSH glutathiona reduzida; GSSG, glutathiona oxidada (Groß et al., 2013).

Segundo Ślesak, (2007) estas enzimas do sistema antioxidante são reguladas no período diurno por processos bioquímicos similares aos de enzimas envolvidas em CAM, indicando uma possível interação entre o sistema antioxidante e essa via fotossintética (Keles and Oncel, 2002). De fato, existe a hipótese de que CAM atue como um mecanismo de prevenção do estresse oxidativo (Niewiadomska and Borland, 2008). Neste caso, a energia fotoquímica em excesso seria utilizada na incorporação do CO₂ obtido da descarboxilação de ácido málico no ciclo de Calvin durante o dia com os estômatos fechados, o que preveniria o encaminhamento dos elétrons em excesso para a formação de ROS a partir de moléculas de O₂ (Griffiths et al., 1989; Sunagawa et al., 2010).

Além da característica protetora de CAM contra ROS, existem relatos que associam a resistência ao estresse oxidativo observado nas plantas CAM à maior atividade de enzimas do sistema antioxidante (Castillo, 1996). Por exemplo, Habibi and Hajiboland, (2011) verificaram um aumento na atividade das enzimas SOD e APX após manter plantas da suculenta *Rosularia elymaitica* em déficit hídrico por 12 dias, o que foi relacionado à indução de CAM devido ao aumento da acidez titulável observado no mesmo período. No entanto, também é proposto que o CAM pode levar a um aumento na produção de ROS. Esta hipótese provém do fato de que a ocorrência da etapa fotoquímica durante o dia enquanto os estômatos estão fechados, ou seja, durante a fase III de CAM, faz com que haja um acúmulo de O₂ (aumento de sua concentração interna em até 42%). Isto então, aumentaria a produção das ROS (Niewiadomska and Borland, 2008b). Conforme observado para plantas de *Sedum praealtum* mantidas em altas concentrações de CO₂ (Spaldin, et al., 2007). Ou seja, CAM pode proteger ou não contra a ação de ROS.

1.2. Resistência de bromélias à seca

Atualmente, previsões indicam que as futuras alterações climáticas levarão à ocorrência mais rápida, intensa e frequente de períodos de seca, principalmente em locais de clima mais quente e árido, com episódios de tempestades súbitas (IPCC, 2014; Trenberth et al., 2014) estabelecendo condições estressantes que podem comprometer a sobrevivência de certas espécies, como as bromélias epífitas que são mais suscetíveis às alterações climáticas por não terem contato direto com o solo, o que as deixam muito vulneráveis a alterações de umidade. Além desses fatores, as bromélias epífitas podem ser consideradas adequadas aos estudos de mudanças climáticas globais, por estas possuírem alta dependência da disponibilidade de água em forma de chuva, neblina e orvalho (Andrade, 2003; Graham and Andrade, 2004; Cach-Pérez

et al., 2014). Portanto, é essencial compreender as respostas fisiológicas de bromélias epífitas, frente às variações na disponibilidade hídrica causada pelas mudanças climáticas globais. Uma vez que, a sobrevivência destas espécies dependerá da capacidade em realizar ajustes rápidos em seu metabolismo, de forma a adaptá-lo às condições de seca e recuperá-lo quando o fornecimento de água for restabelecido, para que possam retomar o crescimento e desenvolvimento (Xu et al., 2010). Portanto, supõe-se que espécies com metabolismo plástico estarão mais aptas à sobrevivência em vista da intensificação da seca prevista para o futuro.

A família Bromeliaceae apresenta o segundo maior número de epífitas após Orchidaceae (Givnish et al., 2014), sendo que a presença de CAM já foi descrita para diversas bromélias deste hábito (Martin, 1994); (Crayn et al., 2015). Além disso, a importância deste metabolismo para a tolerância à seca em bromélias epífitas pode ser averiguada pelo fato de que a incidência de CAM aumenta dentre espécies de florestas tropicais mais secas (Lüttge, 2004), sendo considerado principais respostas evolutivas de plantas que crescem em ambientes áridos e com escassez de água.

Além da flexibilidade metabólica, as bromélias apresentam outras características adaptativas à escassez de água, que incluem adaptações anatômicas, morfológicas e fisiológicas que as permitem lidar com as condições adversas do epifitismo, como a presença de tricomas absortivos, que funcionam como uma via de único sentido para a entrada de água e nutrientes nela dissolvido conferindo as folhas uma propriedade de permeabilidade (Benzing et al., 1978). Outra adaptação é a presença do phytotelmata ou “tanque” formado pelo imbricamento das folhas, que permitem o acúmulo de água da chuva para ser utilizada pela planta posteriormente em situações de seca, assim como a absorção de nutrientes (Matiz et al., 2013; Benzing, 2000).

A ocorrência destas características define o tipo morfológico da planta, onde bromélias com phytotelmata são do tipo tanque, enquanto aquelas cujas folhas são finas e lanceoladas que não formam esta estrutura são do tipo atmosférico (Benzing, 2000). A ausência do tanque para estocagem de água em bromélias atmosféricas as torna mais suscetíveis ao déficit hídrico. Entretanto, estas plantas possuem folhas cobertas por um maior número de tricomas do que indivíduos tanque, permitindo rápida reidratação durante os períodos de maior umidade (Schmidt and Zotz, 2001). Assim, é provável que bromélias atmosféricas tenham estratégias primariamente metabólicas para resistirem aos períodos de seca e se recuperarem frente à rápida absorção de água pelos tricomas após serem reidratadas.

Adaptações metabólicas à seca como o CAM podem ser consideradas altamente importantes para bromélias epífitas em seu estágio inicial de desenvolvimento, propiciando resistência à exposição repetida de falta de água decorrente do ambiente epifítico, o que pode

se agravar devido às alterações climáticas. De fato, plantas jovens de bromélias são mais suscetíveis à perda de água que as adultas por terem baixa razão de superfície/volume de suas folhas e por apresentarem menos adaptações morfológicas e anatômicas visando à prevenção do déficit hídrico (Schmidt and Zotz, 2001; Bader et al., 2009). Assim, o estudo com bromélias epífitas em estágio inicial pode revelar os ajustes fisiológicos necessários à permanência de populações de espécies em um determinado ambiente. Pelo fato de plantas jovens de bromélias perderem água de forma mais intensa que plantas adultas (Bader et al., 2009); (Schmidt and Zotz, 2001), é possível imaginar que estas devam apresentar rápidos ajustes de tolerância quando expostas à seca. Em um trabalho com plantas jovens da bromélia epífita *Guzmania monostachia*, foi verificado uma redução na captação de CO₂ e um aumento significativo no conteúdo de acidez titulável, indicativos de aumento na atividade de CAM, já após o primeiro dia de suspensão de rega, o que ilustra alta plasticidade metabólica de jovens bromélias epífitas ao estresse hídrico (Beltrán et al., 2013) .

Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa mostraram resultados similares a este. Foi verificado que plantas jovens dessa espécie, quando submetidas ao déficit hídrico induzido intensificaram o metabolismo CAM. Entretanto, após reidratação as plantas de *G monostachia* não restabeleceram o seu metabolismo fotossintético semelhante à condição inicial de pré-estresse (hidratadas), não reduzindo a atividade de CAM (Carvalho et al., 2017). Além disso, há de se considerar que o fato das bromélias apresentarem tamanhos pequenos e facilidade de manejo no campo e no laboratório as fazem adequadas à investigação das respostas fisiológicas rápidas às variações ambientais (Cach-Pérez et al., 2014), que podem ocorrer em intervalos diários.

Apesar de existirem alguns trabalhos sobre a avaliação do sistema antioxidante em bromélias epífitas expostas à seca (González-Salvatierra et al., 2010; Carvalho et al., 2017; Abreu et al., 2018) os resultados relatados são opostos, justificando a necessidade de ampliar esses estudos. De acordo com (González-Salvatierra et al., 2010), a atividade de CAM pode ser intensificada, juntamente com a do sistema antioxidante nas bromélias adultas. Entretanto, um estudo realizado por nosso grupo, mostrou que plantas jovens da bromélia epífita *G. monostachia* apresentaram redução na atividade das enzimas antioxidantes ao ser expostas a oito dias de suspensão de rega, o que foi concluído ser derivado da maior ativação de CAM e sua função protetora contra ROS (Carvalho et al., 2017). Sabe-se que a produção de ROS e atividade antioxidante em uma planta são altamente dependentes na duração e intensidade do estresse, assim como na espécie e idade da planta (Cruz de Carvalho, 2008). Assim, mais estudos são necessários para entender de que maneira ocorrem os ajustes na produção de ROS

e enzimas do sistema antioxidante de modo a garantir a sobrevivência dessa espécie durante o seu estágio inicial de desenvolvimento.

Dentre as espécies de bromélia encontradas no Brasil está a ornamental *Acanthostachys strobilacea* (Schultz f.) Klotzsch & Otto, que pode ser epífita ou saxícola, desenvolvendo-se preferencialmente nas bifurcações dos troncos (Reitz, 1983). Ocupando os domínios de Cerrado e Mata Atlântica (Stehmann et al., 2009), o que indica a grande adaptabilidade da espécie quanto às variações ambientais. Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa no Núcleo de Pesquisas em Plantas Ornamentais (NPPO) do Instituto de Botânica de São Paulo identificaram a plasticidade dessa espécie quanto às variações da disponibilidade hídrica (Menezes et al. 2014; Hagiwara et al. 2015). Nestes estudos, foi verificado que esta espécie é altamente tolerante a longos períodos de déficit hídrico severo. Plantas jovens (com aproximadamente 3 meses de idade) foram cultivadas in vitro em um potencial hídrico de -6,93 MPa induzido pela adição de Polietilenoglicol 6000 (PEG) ao meio de cultura e apresentaram 100% de sobrevivência por um período de 42 dias, o que foi associado a uma redução significativa no crescimento (duas vezes menor) quando comparadas às plantas do tratamento controle (sem PEG) (Menezes et al., 2014). Essa tolerância ao déficit hídrico pode estar relacionada ao fato dessa espécie apresentar a fotossíntese CAM (Crayn et al., 2015), que é uma importante adaptação metabólica à seca presente nas bromélias (Benzing, 2000; Luttge, 2010; Silvera et al., 2010).



Figura 4: (A) *Acanthostachys strobilacea* (Schultz f.) Klotzsch & Otto na Reserva Biológica e Estação; (B) Utilização de *A. strobilacea* como planta ornamental, foto extraídas da internet. Fonte: <https://www.agaveville.org/viewtopic.php?f=58&t=6360>; (C) Semente de *A. strobilacea*.

Poucos trabalhos estudam o metabolismo de bromélias epífitas durante o seu estágio inicial, tornando de suma importância estudos que avaliem as respostas fisiológicas dessas plantas frente às alterações climáticas, uma vez que essas respostas podem determinar o estabelecimento de uma espécie vegetal no ambiente (Cach-Pérez et al., 2014).

Como já mencionado, o ambiente epifítico é sujeito a rápido estabelecimento de períodos de seca, o que pode se acentuar devido a alterações climáticas; portanto, o estudo da influência da seca sobre o metabolismo de plantas jovens de bromélias epífitas como *A. strobilacea*, que ocupa os domínios do Cerrado e Mata Atlântica, locais que variam de um clima anual predominantemente úmido e um ambiente com estações de seca prolongada (Stehmann et al., 2009), é essencial para averiguar sua capacidade de aclimação às futuras condições ambientais e, conseqüentemente, suas chances de permanência no ambiente caso este seja alterado.

Compreender os mecanismos relacionados à tolerância de *A. strobilacea* exposta a falta de água pode revelar importantes ajustes fisiológicos de bromélias epífitas ao déficit hídrico, como produção de ROS. Sendo assim, a caracterização da atividade fotossintética de CAM e sua possível associação com produção de espécies reativas de oxigênio nessa bromélia podem revelar as razões da tolerância desta espécie ao déficit hídrico.

Este trabalho baseou-se nas hipóteses de que (i) os ajustes fisiológicos de plantas jovens de *A. strobilacea* em resposta à falta de água inclua uma estratégia fotossintética CAM, que estaria atuando em conjunto com enzimas do sistema antioxidante contra a produção excessiva de ROS derivada da perda de água pelos tecidos; e de que (ii) estas plantas conseguem recuperar as condições de pré-estresse em termos de atividade de CAM, produção de ROS e atividade enzimática antioxidante quando reidratadas após a seca. Com isto, visamos responder as seguintes questões:

a) A atividade de enzimas antioxidantes e a produção de ROS em plantas jovens de *A. strobilacea* seriam intensificadas de forma concomitante à perda de água e intensificação de CAM em resposta à suspensão de rega?

b) Plantas jovens de *A. strobilacea* apresentariam alterações na atividade de CAM, produção de ROS e atividade enzimática antioxidante quando reidratadas após exposição ao estresse hídrico moderado?

Assim, a proposta deste trabalho foi avaliar a possível relação entre a atividade da fotossíntese CAM e o metabolismo antioxidante em plantas da bromélia *A. strobilacea* quando submetidas à falta de água e à posterior reidratação. Pretende-se criar subsídios para compreensão dos mecanismos fisiológicos relacionados ao comportamento das bromélias

frente às mudanças ambientais que podem levar ao aumento dos episódios de falta de água, indicando espécies tolerantes que poderão ser mantidas em um cenário futuro alterado.

2. Objetivo

O objetivo do presente estudo foi avaliar a resposta à falta de água e à reidratação posterior em plantas de jovens da bromélia *A. strobilacea* por meio da análise de atividade do sistema antioxidante e da fotossíntese CAM.

3. Materiais e métodos

3.1. Material vegetal e condições de cultivo

Foram utilizadas sementes de *Acanthostachys strobilacea* (Schultz f.) Klotzsch & Otto armazenadas no Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais do Instituto de Botânica de SP, provenientes da coleção do Instituto de Botânica de São Paulo.

As sementes foram cultivadas *in vitro* por 15 dias em meio de cultura (Murashigue and Skoog, 1962) conforme descrito por (Santos et al., 2010) e posteriormente, após as plantas atingirem 2 cm de altura foram transferidas para bandejas contendo casca de *pinus* como substrato e mantidas em sala de cultura sob as seguintes condições: 25 ± 2 °C, com densidade de fluxo fotossintético de $100 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoper\u00edodo de 12 horas. Todas as plantas foram regadas diariamente com \u00e1gua destilada e adubadas com fertilizante comercial (Plant Prod) a cada 15 dias durante tr\u00eas meses.



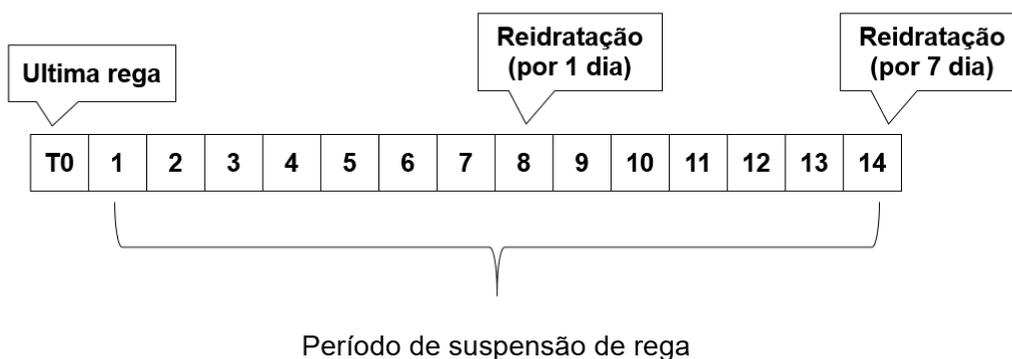
Figura 5: Condições de cultivo: A) Germinação *in vitro* de plantas de *A.strobilacea*; B) Transferência das plantas para o substrato; C) Aclimação em sala de cultura durante 3 meses.

3.2. Condições para o estabelecimento do período de suspensão de rega e reidratação

Após 3 meses de cultivo, foi montado um experimento para a determinação do período que representasse a perda de água, mas dentro do limite de um estresse moderado (conteúdo relativo de água das folhas em torno de 70%) (Silva et al., 2015), causado pela suspensão de rega. Posteriormente, foi avaliado o período de reidratação que coincidissem com a recuperação do conteúdo hídrico, devido ao fornecimento de água, até atingir a capacidade de campo.

Suspensão de rega (SR): Cerca de 300 plantas foram mantidas sob irrigação diária (Irigada) durante todo o experimento. Outras 300 plantas foram submetidas ao tratamento de suspensão de rega por 14 dias de forma a induzir diminuição no conteúdo relativo de água que antecede o déficit hídrico. Para esses tratamentos foram realizadas coletas diárias durante 10 dias consecutivos e em 14 dias.

Reidratação (RE): Posteriormente, 100 plantas provenientes do lote exposto a suspensão de rega foram hidratadas no oitavo dia, pela manhã e coletadas para as análises 24 horas após reidratação (ver item 3.2). Após 14 dias de suspensão de rega, partes das plantas foram reidratadas e as amostras foram coletadas no sétimo dia de reidratação.



Obs.: Controle → Plantas irrigadas diariamente e coletadas nos mesmos pontos de suspensão de rega e reidratação

Figura 6: Fluxograma experimental. As plantas de todos os tratamentos foram coletadas durante 10 dias consecutivos e após 14 dias de suspensão de rega. As plantas reidratadas no oitavo dia foram coletadas 1 dia após a retomada de rega e as plantas hidratadas no decimo quarto dia foram coletadas 7 dias após a retomada de rega. T0= Período de início do experimento. n= 25 plantas por coleta.

De acordo com os resultados obtidos no experimento descrito anteriormente, foram estabelecidos os períodos de suspensão de rega e reidratação. Então, após 3 meses de cultivo, cerca de 100 plantas foram mantidas sob irrigação diária (Irigada) e cerca de 150 plantas foram submetidas ao tratamento de suspensão de rega (SR) por oito dias consecutivos de forma a induzir o déficit hídrico moderado. Posteriormente, parte das plantas expostas a oito dias de suspensão (cerca de 50 plantas) foi utilizada para o tratamento de reidratação (RE), onde a irrigação foi retomada por mais um dia. Plantas expostas à seca e irrigadas diariamente foram coletadas para a análise após oito dias de tratamento. As plantas submetidas a reidratação foram coletadas um dia após a rega ser retomada. As amostras foram coletadas uma hora após o início do período de luz e uma hora antes do final do período de luz devido a planta ser CAM. Para as análises, foram utilizadas amostras compostas de folhas obtidas de 5 plantas por ponto de coleta (início e final do dia) dos tratamentos (Irigada, SR e RE), cujos resultados foram comparados entre si.



Figura 7: Fluxograma experimental para análises de ROS e enzimas do sistema antioxidante.

3.3. Avaliação do estado hídrico das plantas: Conteúdo relativo de água, potencial osmótico foliar, temperatura dos tecidos e medidas do potencial hídrico do substrato

Os métodos descritos neste item foram realizados para todos os experimentos descritos anteriormente (item 3.2).

O conteúdo relativo de água (CRA) foi determinado conforme descrito por Fleta-Soriano et al. (2015) Amostras de 0,2g de folhas foram utilizadas para determinar massa fresca, túrgida e seca em quadrados com área foliar de 0,5 cm². Inicialmente as amostras foram avaliadas quanto à determinação da massa fresca (MF) em seguida essas amostras foram armazenadas em tubos criogênicos contendo 3ml de água destiladas e mantidas durante 24h a 4 °C no escuro.

Após o período descrito anteriormente, as amostras secas previamente com papel filtro para a retirada do excesso de água, foram utilizadas para a determinação da massa túrgida (MT). Posteriormente as amostras foram mantidas durante 72 horas em estufa a 60 °C. após esse

período as amostras tiveram a massa seca determinada (MS). O conteúdo relativo de água (CRA) foi calculado segundo a equação: $100 \times (MF-MS) / (MT-MS)$.

As medidas de potencial osmótico foram realizadas no suco de 0,2g de folhas frescas, obtidos por maceração e armazenado em microtubos, sendo mantidos a -20°C até a realização das medidas. Ao final do experimento, o potencial osmótico de todas as amostras foi determinado utilizando-se um osmômetro de pressão de vapor modelo 5520 VAPRO (Wescor, Logan, Utah, EUA). Para cada medida foram utilizadas alíquotas de 10 μL de suco celular. Os valores obtidos em mmol kg^{-1} foram convertidos em potencial osmótico, por meio da equação de Van't Hoff ($\Psi_s = -C \times 2.58 \times 10^{-3}$), onde C é o valor de osmolalidade obtido em 10 μL de suco de célula em cada medição.

O potencial hídrico do substrato de cultura foi medido em um potenciômetro WP4 (Decagon), baseado na temperatura do ponto de orvalho do ar em equilíbrio com a amostra examinada. As medições foram feitas no substrato das plantas mantidas em irrigação diária (Irrigada) em suspensão de rega (SR) e após a reidratação (SE).

A temperatura dos tecidos foi medida com uma câmera infravermelha Testo 875-1i (Lenzkirch, Alemanha), que adquire imagens térmicas e coleta medições de temperatura sem entrar em contato com as plantas. A câmera possui uma resolução de 320×240 pixels e uma lente embutida de 32° , com uma sensibilidade térmica de 50 mK a 30°C e uma resolução de temperatura de $\pm 2^{\circ}\text{C}$. Optou-se por registrar a temperatura dos tecidos devido à possível variação térmica dos tecidos vegetais em função da diminuição do conteúdo hídrico, conforme descrito em (Costa et al., 2013).

3.4. Análise de CAM

A identificação do CAM foi realizada a partir da determinação do conteúdo acidez titulável, atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) e malato desidrogenase (MDH), conforme descrito nos itens seguintes. Foram realizadas 8 coletas durante o período de 24 horas (intervalos de 3 h) nas plantas irrigadas antes do início do experimento.

3.4.1. Atividades das enzimas PEPC e MDH

Para medir as atividades das enzimas fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC, EC 4.1.1.31), e malato desidrogenase (MDH, EC 1.1.1.37), as amostras de plantas foram moídas em nitrogênio líquido e extraídas em um tampão contendo 100mM de Tris-HCl (pH 8,0), 1mM

de EDTA (pH 8,0), 1mM de dithiothreitol I (DTT), 10mM de MgCl₂. O extrato foi centrifugado durante 15 min (11000 x g, 4°C) O sobrenadante resultante foi coletado e em seguida, utilizado para determinar as atividades das enzimas PEPC e MDH (Nievola et al., 2005).

O ensaio da MDH foi realizado em um meio de reação contendo 50mM de Tris-HCl (pH 8.0), 4mM de oxaloacetato 0,075mM de NADH. A reação foi iniciada pela adição de 3 µL de extrato. Para PEPC, o meio de reação continha 100mM de Tris-HCl (pH 8.0), 1mM de EDTA, 0,05mM de dithiothreitol, 10mM de MgCl₂, 10mM de NaHCO₃, 3mM de fosfoenolpiruvato e 0,4mM de NADH. A reação foi iniciada pela adição de 40 µL de extrato. As atividades de PEPC e MDH foram calculadas por µmol de NADH consumido em 120 minutos por micrograma de proteína, quantificados em espectrofotômetro (340nm). As medições foram feitas a partir de cinco plantas diferentes (Cuevas and Podestá, 2000; Nievola et al., 2005). A proteína total nos extratos foi quantificada com o reagente de Bradford (Sigma-Aldrich) e albumina de soro bovina como padrão.

3.4.2. *Acidez titulável:*

Para determinar o acúmulo noturno de acidez (H⁺), 20 mg de folhas foram maceradas em nitrogênio líquido e depois homogeneizadas com 2mL de água destilada fervida. Os extratos brutos foram fervidos durante 20 min e centrifugados durante 10 min (11000 x g). A titulação dos extratos de água foi realizada com 0,02 N de NaOH até um ponto final de pH 9,0. As medições foram feitas em triplicatas e os resultados foram expressos em mmol H⁺ g⁻¹ de massa seca (Freschi et al., 2010b).

3.5. Análise das enzimas de CAM (PEPC e MDH) em plantas submetidas à suspensão hídrica e reidratação

Análise de PEPC e MDH foram realizadas em plantas irrigadas diariamente por oito dias (Irigadas), submetidas à suspensão de rega por oito dias (SR) e naquelas reidratadas por um dia após terem sido mantidas sem água por oito dias (RE). Conforme descrito no item 3.4.1.

3.6. *Avaliação de ROS, LPO, enzimas antioxidantes*

3.6.1. *Superóxido*

Para as medidas de superóxido as amostras foram maceradas em N₂ líquido e extraídas 1,5 ml de solução de extração contendo 65mM tampão de fosfato de potássio buffer (pH 7.8) e PVPP (aproximadamente 2%). Os extratos homogeneizados foram centrifugados a 16100 rcf, 4°C, 25 min. Os extratos foram incubados por 30 minutos no escuro para geração de nitrito a partir da reação de superóxido + hidrocloreto de hidroxilamina com a adição de 125µL do sobrenadante a 125µL de tampão fosfato de potássio 65mM (pH 7,8) e 25µL de cloridrato de hidroxilamina 10mM. (Wu et al., 2010).

A reação ocorreu no escuro durante 30 minutos com a adição de 275µl de reagente de Griess (0,1% de dicloridrato de naftiletlenodiamina e 1% de sulfanilamida) aos extratos incubados. As absorbâncias foram lidas a 540 nm em nmol O²⁻/g de massa seca (Antoniou et al., 2018).

3.6.2. *Peroxidação lipídica (LPO):*

A ocorrência de peroxidação lipídica nos tecidos indica danos de membranas (Gill and Tuteja, 2010), e nesse estudo foi utilizado o método que se quantifica LPO nos estágios iniciais baseando-se na oxidação do Fe⁺² para Fe⁺³ por hidroperóxidos lipídicos em pH ácido, o qual reage com o xilenol laranja, produzindo um cromóforo que tem absorção máxima em 560 nm.

Amostras de tecidos vegetais provenientes de plantas irrigadas, submetidas à suspensão de rega e reidratadas congeladas em -80 °C foram maceradas em N₂ líquido, 100mg foram homogeneizadas em 2mL de etanol a 80% (v/v), seguido por centrifugação a 3000 g, 25°C for 10 min. Posteriormente, 60 µL do sobrenadante foi adicionado a 240 µL de um mix de reação contendo 100% (v/v) metanol, 0.1mM xilenol laranja (Sigma-Aldrich), 25mM H₂SO₄, 4mM butylated hydroxytoluene (BHT), e 0.25mM Fe(II)SO₄NH₄. As soluções resultantes foram incubadas à temperatura ambiente por 20 min e misturadas por inversão a cada 3 min. As absorbâncias foram lidas em 560 nm em um leitor de microplaca e os níveis de LPO foram expressos como equivalentes de hidro peróxido cumene (mmol cumene g⁻¹ DW). (Jiang et al., 1991).

3.7. Enzimas do Sistema antioxidante

Para mensurar as atividades das enzimas antioxidantes, folhas frescas de 200 mg foram trituradas com 2mL de solução de extração contendo 1M de tampão fosfato de potássio (pH 7,5), 1mM de EDTA-Na₂, 50mM de NaCl e 1mM de ácido ascórbico presente em uma pitada de PVPP (aprox. 2%). Os extratos homogeneizados foram centrifugados a 11000 g, 4°C durante 30 minutos (Souza et al., 2013).

A atividade da catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) foi calculada com base na diminuição da absorbância a 240nm por 2 min, devido ao consumo de H₂O₂. O sistema de reação continha tampão fosfato de potássio 100mM (pH 7,5), H₂O₂ 10mM e 100 µL de extrato enzimático em um volume final de reação de 1mL (LUCK, 1974). A atividade da CAT foi calculada com coeficiente de extinção de 0,4 mM⁻¹ cm⁻¹ e expressa em µmol H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

A atividade da ascorbato peroxidase (APX) (EC 1.11.1.11) foi calculada com base na diminuição da absorbância a 290 nm durante 2 min, devido a oxidação do ascorbato. O sistema de reação continha tampão fosfato de potássio 50mM (pH 7,0), EDTA-Na₂ 0,1mM, ácido ascórbico 0,5mM, H₂O₂ 0,2mM e 40µL de extrato enzimático em volume final de 1mL conforme descrito por (Nakano and Asada, 1981) e modificado por (Weng et al., 2007). A atividade foi calculada com coeficiente de extinção de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ e expressa em nmol de ascorbato min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

A atividade da glutathiona redutase (GR) (EC 1.8.1.7) foi calculada com base na diminuição da absorbância a 340nm durante 2 min, devido à oxidação de NADPH. O sistema de reação consistiu em tampão Tris-HCl 50mM (pH 7,5), NADPH 0,15mM, glutathiona oxidada 0,5mM, MgCl₂ 3mM e 100µL de extrato enzimático em um volume final de reação de 1mL (Schaedle and Bassahm, 1977). A atividade foi calculada com coeficiente de extinção de 6,2 mM⁻¹ cm⁻¹ e expressa em nmol NADP + min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

A superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1) foi determinada de acordo com (Beauchamp and Fridovich, 1971) com modificações de (Balen et al., 2009). A mistura de reação continha fosfato de potássio 50mM (pH 7,8), EDTA 0,1mM, cloreto azul de nitrotetrazólio 0,07mM (NBT, Sigma-Aldrich), metionina 13mM e riboflavina 0,002mM. 260µL da mistura de reação foi misturado com 40µL de extrato e colocado sob luz fluorescente de 23 watts (Phillips®) por 5 min. A atividade da SOD foi determinada em 560 nm e expressa em unidades mg⁻¹ de proteína. Uma unidade de atividade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a redução de NBT em 50% por minuto.

3.8. Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado e todos os dados são apresentados como média \pm SEM. Os dados foram submetidos à análise de variância one-way (ANOVA) com variação entre as médias comparados usando o teste de Tukey ($P < 0,05$).

4. Resultados

4.1. Seleção do período de suspensão de rega e reidratação

A figura 8 mostra os resultados das medidas do conteúdo relativo de água (RWC) expressos em porcentagem e potencial osmótico expressos em megapascal (MPa) em plantas de *A. strobilacea* irrigadas diariamente (Irigada), submetidas à suspensão de rega durante quatorze dias (SR), reidratadas por 1 dia após oito dias de suspensão de rega e reidratadas por 7 dias após quatorze dias de suspensão de rega (RE). O CRA começou a decrescer em 5 dias de suspensão de rega, sendo observado uma redução de 20,35% do CRA em oito dias de suspensão de rega quando comparado ao controle. Porém só foram observadas mudanças significativas no potencial osmótico em nove e quatorze dias de suspensão de rega. Após a reidratação o CRA só foi recuperado a níveis similares às plantas irrigadas diariamente em 8 dias de suspensão de rega.

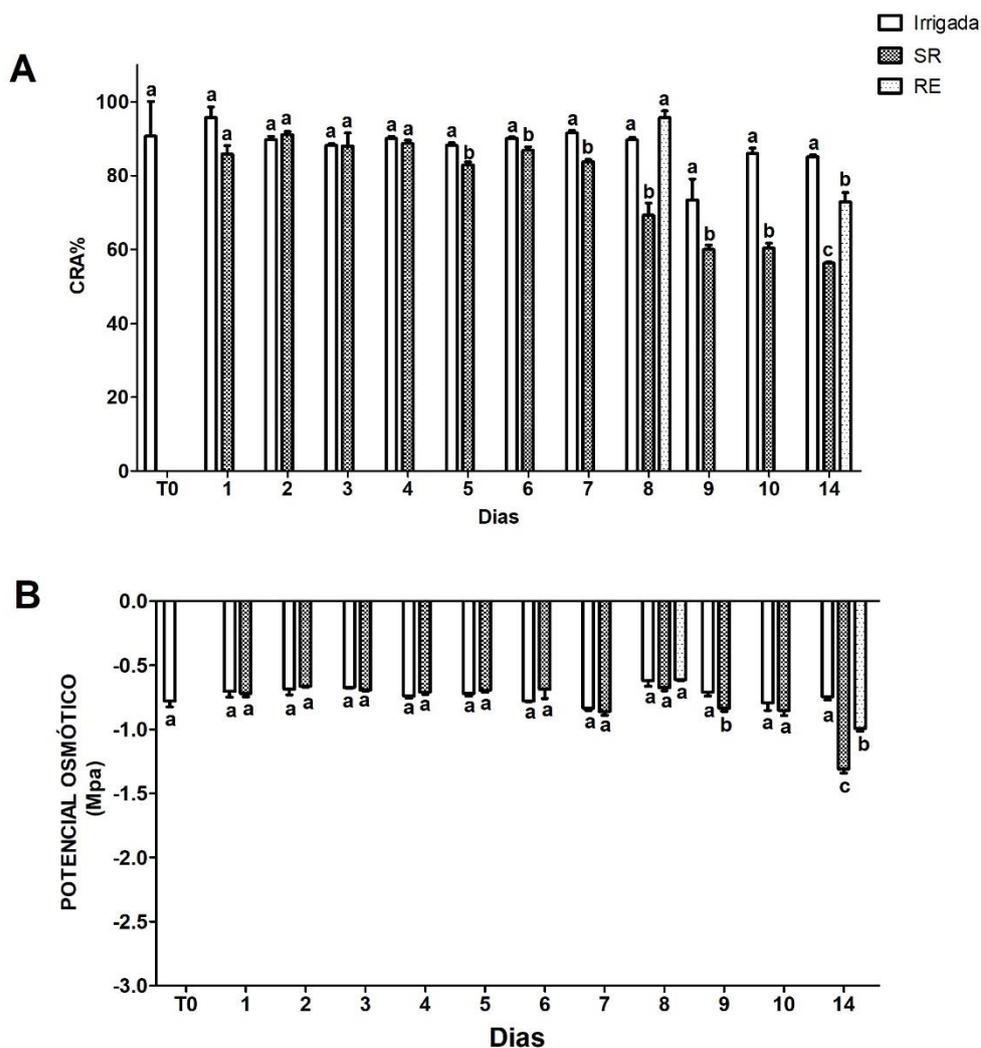


Figura 8: A) Conteúdo relativo de água (CRA); B) Potencial osmótico em plantas jovens de *Acanthostachys strobilacea* (Schultz f.) Klotzsch & Otto em rega diária durante quatorze dias (Irigada), em quatorze dias de suspensão de rega (SR) e reidratadas em 8 e 14 dias após a suspensão de rega (RE). Valores são médias \pm SEM. ($n = 5$). Segundo ANOVA e teste Tukey ($P < 0.05$).

A figura 9 mostra a temperatura dos tecidos foliares em plantas de *A. strobilacea* submetidas à suspensão de rega por oito e quatorze dias e reidratadas após oito e quatorze dias. Em oito e quatorze dias de suspensão de rega foi observado um aumento na temperatura dos tecidos foliares. Após 14 dias de suspensão de rega seguido de sete dias de reidratação a temperatura dos tecidos foliares diminuiu. De modo interessante, a termografia mostra que as raízes têm temperatura menor que a parte aérea. É possível supor que a presença de água diminui a temperatura dos tecidos em *A. strobilacea*. Então as raízes ainda poderiam estar mais frias no momento do registro das fotos, que ocorre imediatamente à retirada das plantas do substrato.

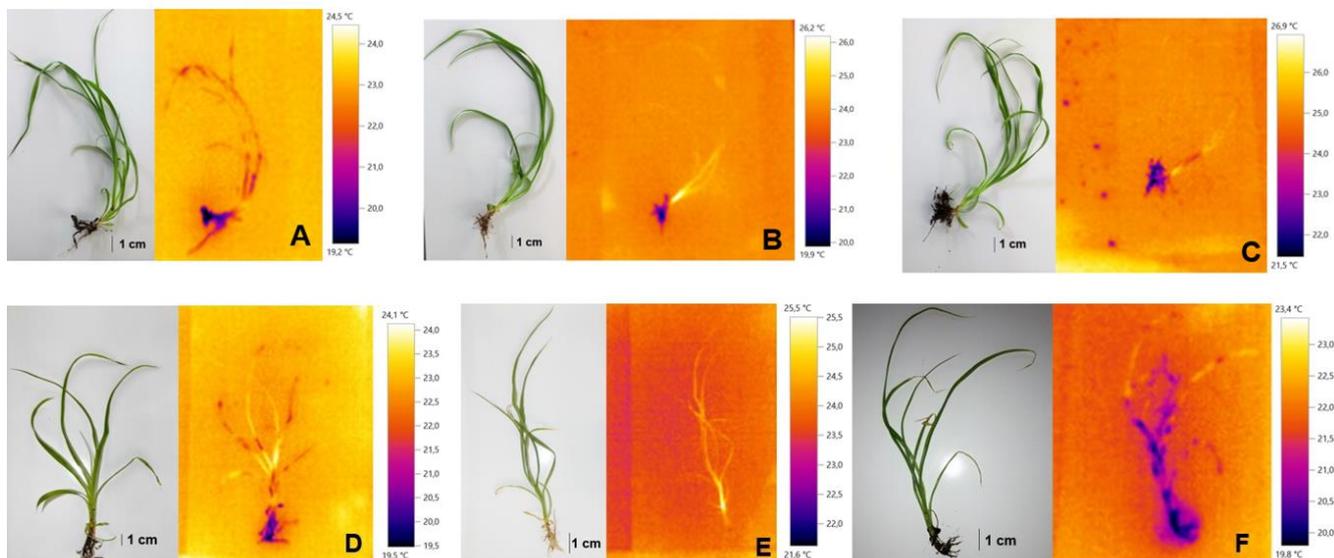


Figura 9: *Imagens termográficas. A) Plantas de A. strobilacea irrigadas diariamente durante oito dias (Irigadas); B) Plantas submetidas a suspensão de rega por oito dias (SR); C) Plantas submetidas a suspensão de rega por oito dias seguido de hidratação por 1 dia de reidratação (RE); D) Plantas irrigadas diariamente durante 14 dias (Irigada); E) Plantas submetidas a suspensão de rega por 14 dias (SR); F) Plantas submetidas a suspensão de rega por 14 dias seguido de hidratação por 7 dias (RE). A escala de cores mostra a temperatura nos tecidos foliares em °C.*

4.2. Avaliação do estado hídrico das plantas: Conteúdo relativo de água, potencial osmótico foliar e potencial hídrico do substrato.

A figura 10-A. mostra os valores dos conteúdos relativos de água (CRA) em plantas de *A. strobilacea* irrigadas diariamente (Irigada), suspensão de rega (SR) e reidratação (RE). Em oito dias de suspensão de rega foi possível observar uma redução significativa de 21,92% do CRA quando comparado às plantas do tratamento controle. Após um dia da retomada de rega foi observada uma recuperação do CRA em níveis similares às plantas irrigadas. Não foram observadas alterações significativas no potencial osmótico das folhas das plantas irrigadas e submetidas à suspensão de rega por 8 dias. Após a reidratação potencial osmótico foi maior quando comparado as plantas irrigadas e em suspensão de rega (Figura 10-B).

Foi observado uma redução significativa no potencial hídrico do substrato das plantas que ficaram em suspensão de rega (-114,73 MPa), quando comparado ao de plantas irrigadas diariamente (-0,03 MPa). Após a retomada de rega o potencial hídrico do substrato retornou a níveis similares ao das plantas irrigadas de -0,04MPa (Figura 11).

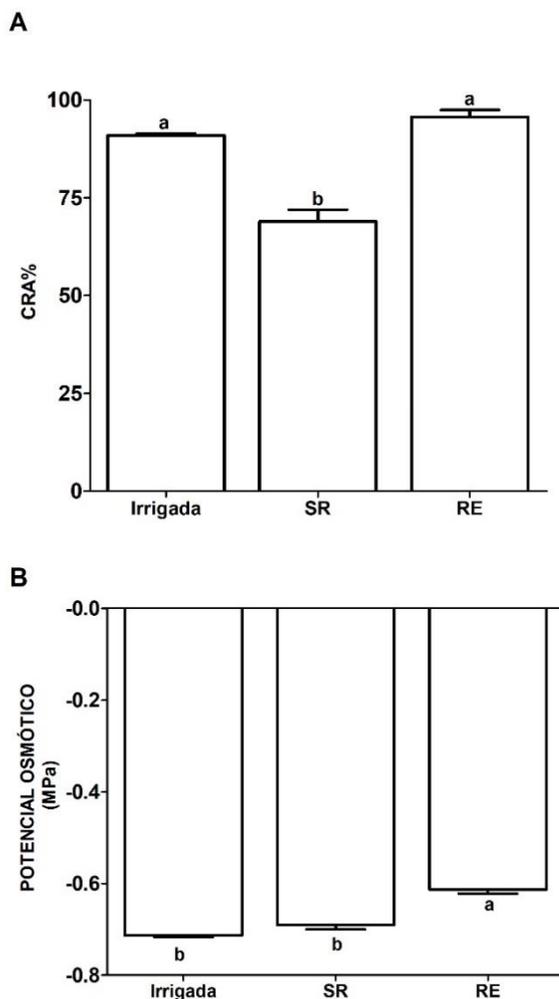


Figura 10. A) Conteúdo relativo de água (CRA); B) Potencial osmótico em plantas jovens de *Acanthostachys strobilacea* (Schultz f.) Klotzsch & Otto em rega diária (Irrigada), em oito dias de suspensão de rega (SR) e 24h após a retomada de rega (RE). Valores são médias \pm SEM. (n = 5). Segundo o teste ANOVA e teste Tukey ($P < 0.05$).

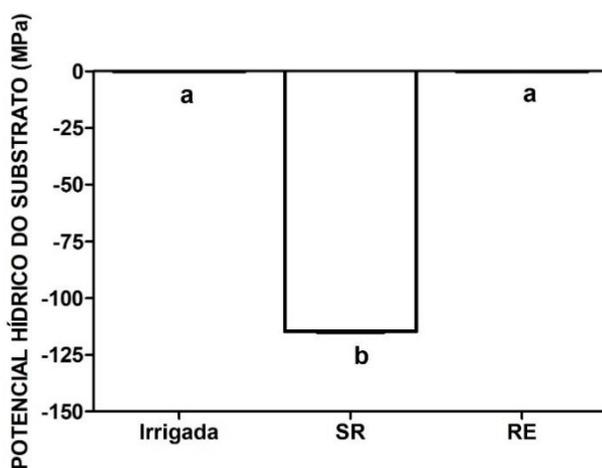


Figura 11. Médias do potencial hídrico do substrato (MPa) durante oito dias de cultivo em regime de rega diária (Irrigada), em suspensão de rega (SR) e 24h após a retomada do regime de rega após oito dias de suspensão hídrica (RE). Valores são médias \pm SEM. (n = 3). Segundo o teste ANOVA e teste Tukey ($P < 0.05$).

A figura 12 e a tabela 1 mostram a temperatura dos tecidos foliares e das raízes em plantas irrigadas diariamente (Irigada), plantas submetidas à suspensão de rega por oito dias (SR) e em plantas irrigadas por 1 dia após oito dias de suspensão de rega (RE). Em oito dias de experimento foi observado um aumento de 2,2 °C nas raízes, 2,9 °C no eixo caulinar e 1,8 °C nas folhas de plantas submetidas à suspensão de rega (SR) quando comparado às plantas que receberam rega diariamente (Irigada). Após a retomada do regime de rega não foram observadas alterações na temperatura dos tecidos foliares (M2 e M3), e foi observado um aumento de 1,1 °C nas raízes (M1) quando comparado as plantas que permaneceram em suspensão de rega durante oito dias.

Tabela 1. Temperatura dos tecidos foliares e radiculares de plantas jovens da bromélia *A.strobilacea*. Plantas irrigadas diariamente durante 8 dias (Irigada), plantas submetidas a suspensão de rega por 8 dias (SR), plantas reidratadas por 1 dia após 8 dias de suspensão de rega (RE).

Tratamento	Temperatura °C		
	M1	M2	M3
Irigada	20,2 °C	21,9 °C	22,4 °C
SR	22,4 °C	24,8 °C	24,2 °C
RE	23,5 °C	24,9 °C	24,5 °C

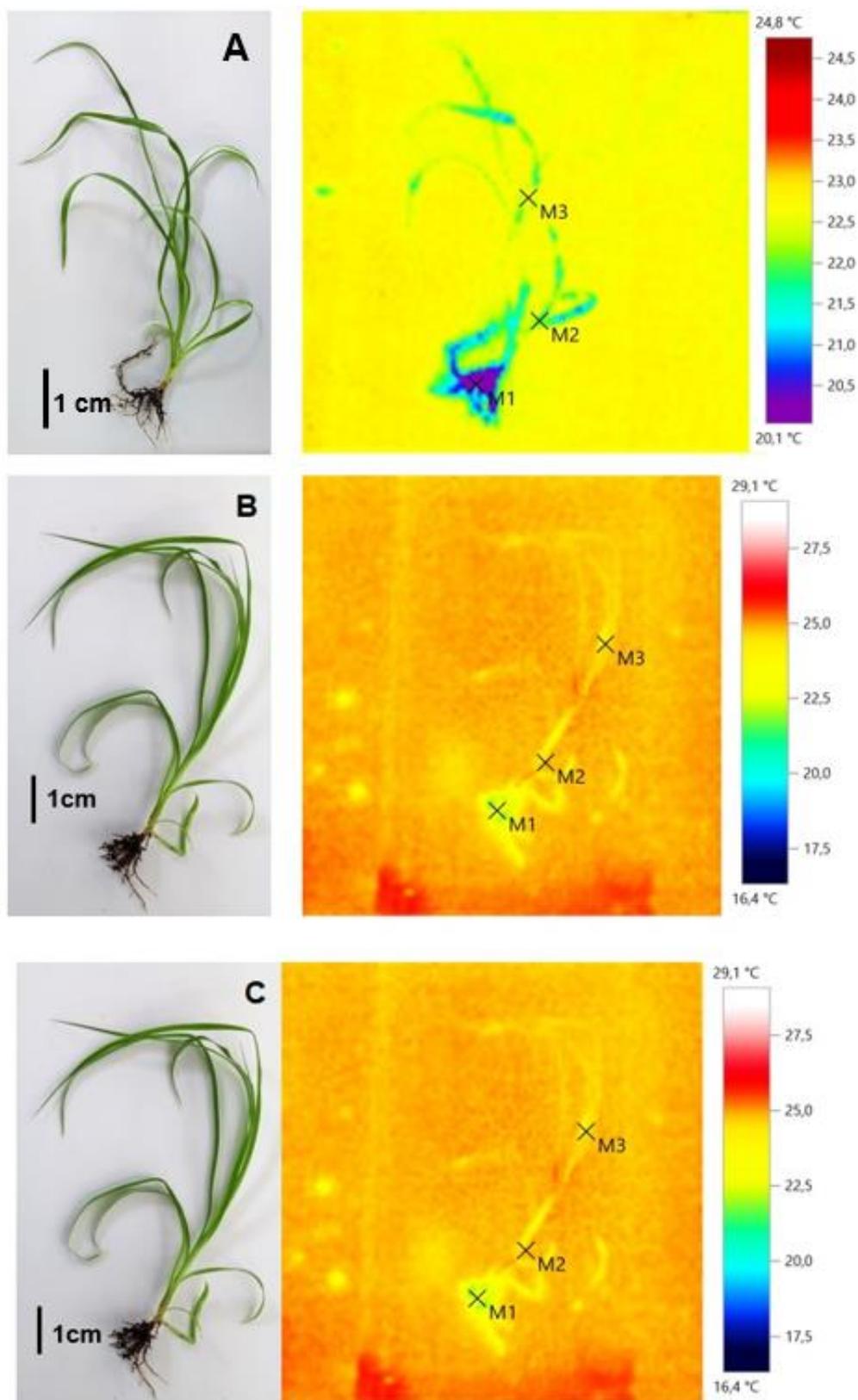


Figura 12. *Imagens termográficas. Temperatura dos tecidos foliares e radiculares de plantas jovens da bromélia A.strobilacea.* (A) Plantas irrigadas diariamente durante oito dias (Irrigada), (B) plantas submetidas a suspensão de rega por oito dias (SR), (C) plantas reidratadas por um dia após 8 dias de suspensão de rega (RE).

4.3. Parâmetros de CAM

O Anexo 1 mostra a variação no conteúdo de acidez titulável, atividade da enzima PEPC e MDH durante o período 24h (fotoperíodo 12 h) em plantas hidratadas antes do início do experimento. O conteúdo de acidez titulável e a atividade das enzimas (PEPC e MDH), apresentaram variações ao longo do período de 24h. Sendo observado um acúmulo de ácidos e maior atividade da PEPC durante o período noturno.

A figura 13 mostra a atividade das enzimas PEPC e MDH 1h após o início do período de luz (início do dia) e 1h antes do início final do período de luz (final do dia), em plantas irrigadas diariamente (Irigada), submetidas a suspensão de rega por oito dias (SR) e após a retomada de rega (RE). Foram observadas variações na atividade da enzima PEPC e MDH durante o início e final do dia em todos os tratamentos. Porém não foram observadas diferenças significativas na atividade da enzima PEPC e MDH em suspensão de rega quando comparadas às plantas irrigadas. Após a reidratação foi observado um aumento significativo na atividade da PEPC no início do dia e um aumento na atividade da MDH quando comparado aos demais tratamentos.

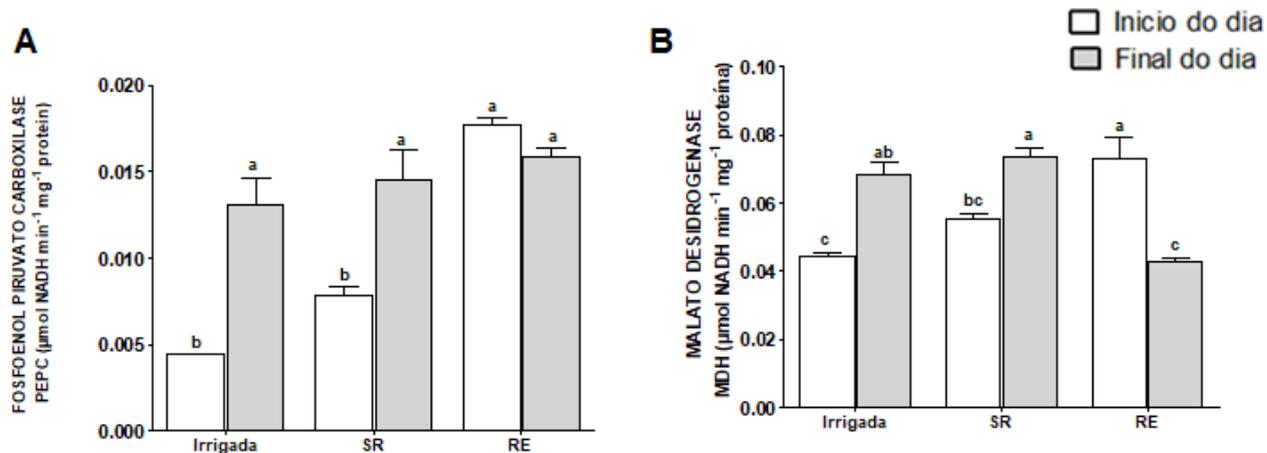


Figura 13. Modulação do CAM. A) Atividade das enzimas PEPC no início do período de luz e no final do período de luz em plantas bem hidratadas (Irigada) submetidas a suspensão de rega por oito dias (SR) e irrigadas por 1 após oito dias de suspensão de rega (RE). B) Atividade da enzima MDH no início do período de luz e no final do período de luz em plantas bem hidratadas (Irigada) submetidas a suspensão de rega por oito dias (SR) e irrigadas por 1 após oito dias de suspensão de rega (RE). Os dados são expressos como a média (\pm SEM) de três amostras replicadas. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as médias seguidos por ANOVA e teste Tukey ($P < 0.05$).

4.4. *Superóxido e Peroxidação lipídica*

A figura 14 mostra os resultados de superóxido uma hora após o início do dia em plantas irrigadas diariamente (Irigada), submetidas à suspensão de rega (SR) durante oito dias, e reidratadas durante um dia após oito dias de suspensão de rega (RE). Não foram observadas diferenças significativas entre o controle e a suspensão de rega. Após a reidratação foi observado um aumento de superóxido.

A figura 15 mostra os resultados de peroxidação lipídica uma hora após o início do dia em plantas irrigadas (Irigada) submetidas a suspensão de rega (SR) durante oito dias, e reidratadas durante um dia após oito dias de suspensão de rega (RE). Após a suspensão de rega (SR) a peroxidação lipídica diminuiu (LPO) quando comparado às plantas irrigadas. Após a reidratação foi observado um aumento em LPO, quando comparado às plantas em suspensão de rega, mas esses valores foram similares aos observados nas plantas irrigadas.

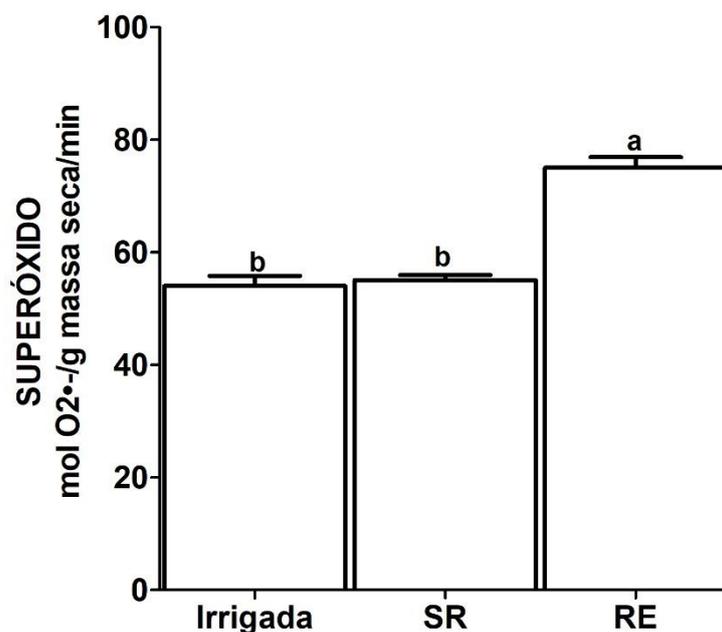


Figura 14. Conteúdo de superóxido em plantas bem hidratadas (Irigada) submetidas a suspensão de rega por oito dias (SR) e irrigadas por 1 dia após oito dias de suspensão de rega (RE). Os dados são expressos como a média (\pm SEM) de três amostras replicadas. Letras diferentes indicam diferença significativa entre médias seguidos pelo teste, ANOVA e teste Tukey ($P < 0.05$).

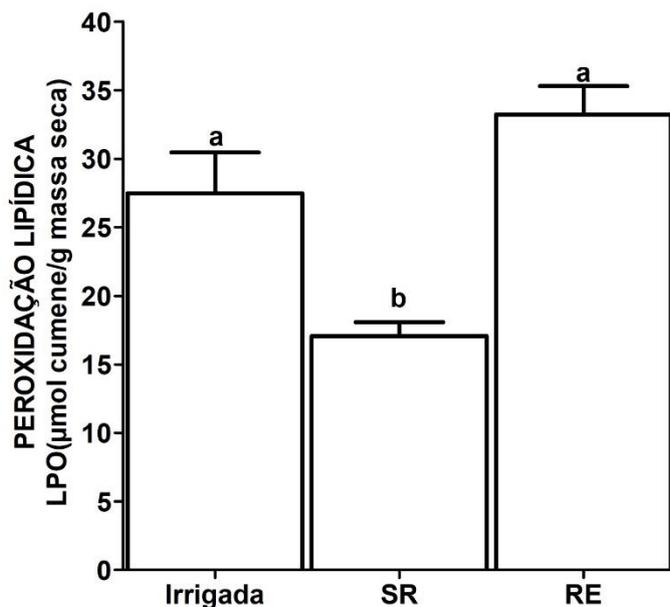


Figura 15. Peroxidação lipídica em plantas bem hidratadas (Irrigada) submetidas a suspensão de rega por oito dias (SR) e 24h após a reidratação (RE). Os dados são expressos como a média (\pm SEM) de três amostras replicadas. Letras diferentes indicam diferença significativa entre médias seguidos pelo teste, ANOVA e teste Tukey ($P < 0.05$).

4.5. Enzimas do sistema antioxidante

A figura 16 mostra a atividade das enzimas antioxidantes uma hora após o início do período de luz (Início do dia) em plantas irrigadas (Irrigada) submetidas à suspensão de rega (SR) durante oito dias e reidratadas durante um dia após oito dias de suspensão de rega (RE). As atividades da CAT e APX aumentaram em SR quando comparadas às plantas irrigadas. Embora a atividade das enzimas SOD e GR não tenham mostrado diferenças significativas, foi possível verificar uma tendência a um aumento na atividade dessas enzimas. Após a reidratação (RE) a atividade da CAT diminuiu e as atividades da APX, SOD e GR, aumentaram quando comparadas a atividade dessas enzimas em plantas irrigadas e em SR.

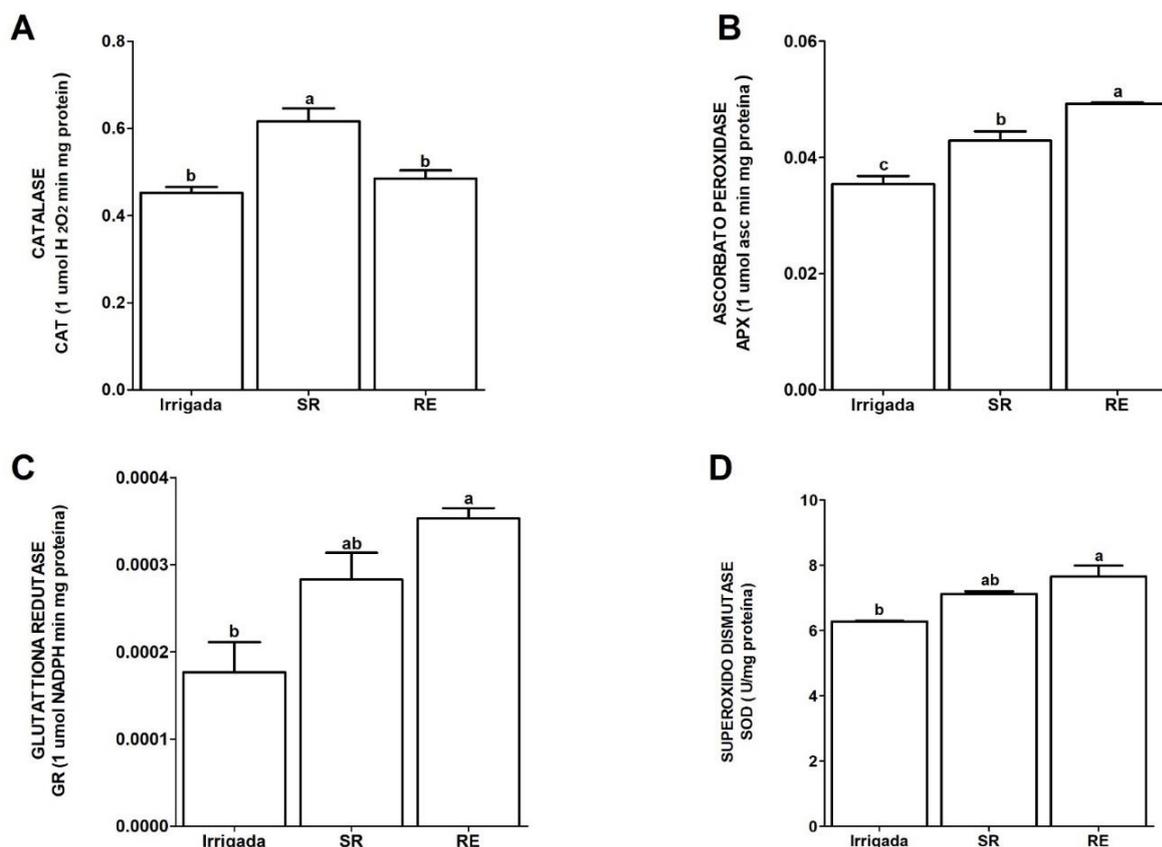


Figura 16. Atividade das enzimas do sistema antioxidante. (A) Catalase (CAT), (B) ascorbato peroxidase (APX), (C) glutatona redutase (GR) (D) superóxido dismutase (SOD). Os dados são expressos como a média (\pm SEM) de três amostras replicadas. Letras diferentes indicam diferença significativa entre médias seguidos pelo teste ANOVA e teste Tukey ($P < 0.05$).

5. Discussão

Plantas jovens de *A. strobilacea* apresentaram resistência ao período de restrição hídrica (14 dias). Apesar de haver redução do conteúdo relativo de água, só foram observadas quedas nos valores de potencial osmótico dos tecidos das plantas não irrigadas durante 9 e 14 dias.

Após a reidratação as plantas de *A. strobilacea* foram capazes de recuperar o conteúdo hídrico em níveis similares às plantas bem hidratadas em oito dias de suspensão de rega (período de estresse moderado), resultados similares foram observados para plantas de *Guzmania monostachia* submetidas à suspensão de rega por oito dias seguido de reidratação (Carvalho et al., 2017; Abreu et al., 2018). Assim, o período de 8 dias, estabelecido neste trabalho, foi adequado às análises das repostas ao estresse moderado em *A. strobilacea*.

Em plantas CAM da bromélia epífita *Tillandsia utriculata* submetidas a suspensão hídrica por 2 meses (Stiles and Martin, 1996), foi verificado que os potenciais hídricos foliares permaneceram altos durante o período de suspensão hídrica e diminuíram apenas -0,5 MPa após

dois meses sem água. Esses autores atribuíram esses resultados à alta manutenção de turgescência que reduz os efeitos negativos do estresse hídrico. Assim como outras adaptações ao estresse hídrico, como o ajuste osmótico e baixas taxas de transpiração que ocorre em espécies CAM devido à alta eficiência no uso de água.

A tolerância de *A.strobilacea* ao déficit hídrico moderado, pode estar relacionada com o fato dessa bromélia apresentar fotossíntese CAM, que é uma importante adaptação metabólica à seca presente em cerca de 70% de bromélias epífitas (Martin 1994; Benzing 2000; Luttge 2010). A resistência de plantas CAM a estresses abióticos como (seca, salinidade, alta temperatura, alta intensidade de luz, etc.) se deve ao fato de que o mecanismo de concentração de CO₂ permite que as plantas CAM realizem a assimilação do carbono fotossintético em níveis elevados mesmo sob condições desfavoráveis (Hatch et al., 1988).

Variações na atividade da enzima PEPC durante o período de 24 horas e o acúmulo de acidez noturna são observadas em plantas CAM e a análise desses fatores é utilizada como parâmetro importante para identificar esse metabolismo que ocorre em muitas espécies vegetais (Niramo, 2009). Em plantas da bromélia *Tillandsia pohliana* (Freschi et al., 2010a) foram observadas mudanças no conteúdo de acidez titulável durante o dia e um aumento gradual durante o período escuro, seguido por uma diminuição progressiva durante a fase de luz. Também foram verificadas flutuações na atividade da enzima PEPC ao longo de 24h, sendo observado maior atividade dessa enzima no período noturno. A atividade da enzima MDH não mostrou variações ao longo desse período. Os autores concluíram que as plantas de *T. pohliana* realizaram um ciclo CAM típico para carboxilação noturna de ácidos e regulação das atividades de PEPC. Resultados semelhantes foram observados em plantas de *A.strobilacea*. O acúmulo noturno de acidez titulável e as variações na atividade da PEPC ao longo do período de 24h evidenciados nesse estudo em plantas jovens, logo no início da parte experimental (ANEXO 1), indicam a presença do metabolismo CAM, conforme já foi descrito para indivíduos adultos dessa espécie (Crayn et al., 2015).

Muitas bromeliáceas adultas apresentam uma sobreposição de folhas formando o denominado tanque, onde água é retida e fica disponível durante os períodos de seca (Benzing, 2000). Entretanto, essa possibilidade não ocorre em *A. strobilaceae* pois essa espécie não forma tanque (fig.4). Assim, a presença de CAM nos estágios adulto e jovem deve ser uma importante alternativa para que essa espécie resista à seca, classificando-a como CAM constitutiva, assim como observado para *Tillandsia pohliana* (Tamaki and Mercier 1997).

Além de reduzir a perda de água, o CAM pode atuar como um mecanismo adaptativo para evitar o estresse oxidativo, derivado da descarboxilação do malato durante o dia que auxilia

na prevenção da redução dos elétrons em excesso na cadeia de transporte para a formação ROS. (Griffiths et al., 1989).

Conforme relatado por (Sunagawa et al. (2010a) em um estudo com plantas selvagens e mutantes deficientes em CAM de *Mesembryanthemum crystallinum* submetidas ao estresse salino . Nesse estudo foi verificado que a transcrição de um gene que codifica Cu / Zn superóxido dismutase (SOD), que é um marcador de produção de ROS, foi maior nas folhas de plantas mutantes (deficientes em CAM) do que em plantas selvagens (plantas CAM). A atividade de ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) foram maiores nos mutantes deficientes em CAM do que nas plantas do tipo selvagem. Estes resultados indicaram que a presença de CAM foi acompanhada por níveis mais baixos de ROS, aliviando o estresse oxidativo sob condições de falta de água, possivelmente provocada pelo estresse salino.

Em um estudos realizado pelo nosso grupo de pesquisa com plantas jovens da bromélia epífita *G. monostachia*, induzidas ao CAM por suspensão de rega (déficit hídrico moderado) foi observado uma diminuição na atividade da CAT, APX e SOD em oito dias de suspensão de rega e uma diminuição no conteúdo de H₂O₂ (Carvalho et al., 2017). Segundo os autores, para essa espécie o CAM parece ser um componente mais importante para a manutenção do sistema de eliminação de ROS em déficit hídrico, em decorrência da descarboxilação intensificada do malato e da fotorrespiração diminuída do que as enzimas do sistema antioxidante.

Diferente das espécies citadas, que apresentam o metabolismo CAM em condições de estresse, *A. strobilacea* apresenta esse metabolismo mesmo em condições bem hidratadas (Irigadas), e os mecanismo de resistência a seca moderada envolvem inicialmente a modulação de enzimas antioxidantes. Os resultados obtidos no presente trabalho, revelam que em condição de seca moderada, não houve alterações significativas na atividade das enzimas PEPC, MDH, e conteúdo de superóxido. Porém foi observado um aumento na atividade da CAT e APX. Embora as enzimas SOD e GR não tenham apresentado diferenças significativas quando comparadas as plantas irrigadas foi possível verificar uma tendência a um aumento na atividade dessas enzimas e uma diminuição de LPO em suspensão de rega. Ou seja, é possível supor que a falta de água por um período pequeno (8 dias) não desencadeie alterações significativas em CAM que possam ser relacionadas a variações do sistema antioxidante. Estas, por sua vez, seriam as principais responsáveis pelo ajuste às alterações ambientais relacionadas à falta de água durante o período avaliado para *A. strobilacea*. A diminuição do LPO aponta para essa situação como sendo mais favorável ao controle da homeostase celular em comparação às plantas que são mais hidratadas. Conforme observado para plantas de *Medicago sativa* L. (Liu

et al., 2018), no qual foram avaliadas as respostas ao déficit hídrico induzido por polietilenoglicol (PEG-6000) em 3 variedades diferentes. Dentre elas *Medicago sativa L. cv. Longzhong* (tolerante à seca), *Longdong* (moderadamente tolerante à seca) e *Gannong* (sensível à seca). Em 9 dias de déficit hídrico *Longzhong* (tolerante à seca) apresentou menor peroxidação lipídica e maior atividade de enzimas antioxidantes quando comparada as variações *Longdong* (Moderadamente tolerante à seca) e *Gannong* (sensível à seca), em que a atividade das enzimas antioxidantes foi menor e foi observado um aumento na peroxidação lipídica. Segundo os autores o aumento na atividade das enzimas antioxidantes e a diminuição de LPO desempenharam um papel importante na tolerância à seca nessa espécie.

Epífitas apresentam diversas características adaptativas à escassez de água (adaptações anatômicas, morfológicas e fisiológicas), portanto é possível supor que elas precisem de uma quantidade menor de água para a sua sobrevivência (Benzing, 2000), de modo que a condição de déficit hídrico moderado imposta para plantas de *A.strobilacea* nesse experimento parece ser o estado mais semelhante à condição natural. Sugerindo que a imposição ao déficit hídrico proporcionou um funcionamento melhor do sistema antioxidante para a eliminação de ROS, revelando estes como sendo os mecanismos que indicam a necessidade de ativação da proteção ao estresse súbito moderado, como descrito para outras espécies que mostraram respostas similares estresse oxidativo (Cruz de Carvalho, 2008; Hasanuzzaman et al., 2013; Gill and Tuteja, 2010; Miller et al., 2010).

O aumento na atividade da CAT e APX observado em plantas de *A.strobilacea* em seca moderada, pode estar relacionado a um aumento de H₂O₂, seu substrato, decorrente da suspensão hídrica. Considerando que a regulação do teor de H₂O₂ no interior das células de organismos submetidos a condições de estresse deve se a ação da SOD (Gill and Tuteja, 2010). A atividade da CAT e APX podem ter aumento durante a suspensão de rega decorrente da tendência ao aumento da SOD. Para confirmar tal hipótese medidas do teor de H₂O₂ devem ser realizadas. No entanto essas medidas não foram realizadas devido ao fato de não termos conseguido realizar as análises com os protocolos testados.

Após a reidratação as plantas recuperaram rapidamente (24h) o conteúdo hídrico em níveis similares ao controle e foi observado um aumento do potencial osmótico. De maneira interessante, as plantas de *A. strobilacea* reidratadas mostraram um aumento significativo nos níveis de superóxido e apesar da atividade da CAT ter diminuído a atividade da APX, SOD e GR foram maiores. Estes resultados indicam que, embora as plantas tenham recuperado o conteúdo hídrico, o período de reidratação não foi suficiente para que as atividades das enzimas do sistema antioxidante se igulassem aos níveis similares das plantas irrigadas.

Os resultados apresentados mostram que, sob condições de seca moderada, não foi observado estresse oxidativo, devido ao funcionamento do sistema de defesa antioxidante, que funcionou de maneira eficaz nessa condição reduzindo a peroxidação lipídica. Estas enzimas, por sua vez, seriam as principais responsáveis pelo ajuste às alterações ambientais relacionadas à falta de água durante o período avaliado para *A strobilacea*. A diminuição do LPO aponta para essa situação como sendo mais favorável ao controle da homeostase celular em comparação às plantas que são mais hidratadas. Além disso, o metabolismo CAM mantém a conservação de água e por isso os valores de potencial osmótico são mantidos.

Após a reidratação as plantas recuperaram o conteúdo hídrico rapidamente, no entanto o período avaliado não foi suficiente para que o sistema antioxidante apresentasse atividades similares às das plantas do controle.

6. Considerações finais e perspectivas

A bromélia epífita *Acanthostachys strobilacea* (Schultz f.) Klotzsch & Otto, se mostrou resistente a suspensão hídrica por um período de quatorze dias. No entanto elas só foram capazes de recuperar o conteúdo relativo de água das folhas após a reidratação em oito dias de suspensão de rega (déficit hídrico moderado) Durante o período de restrição hídrica as plantas foram capazes de manter o ajuste osmótico, evitando perdas no potencial hídrico foliar por 8 dias. Essa capacidade de resistência pode estar relacionada ao fato dessa bromélia apresentar o metabolismo CAM, conforme relatado por (Crayn et al., 2015), e conforme verificado neste trabalho por meio da atividade das enzimas PEPC, MDH e acidez titulável.

A figura 17 sintetiza os principais resultados discutidos. Em déficit hídrico moderado foi verificado que diferente do que é relatado para espécies que utilizam a via C3/CAM facultativa *A. strobilacea* apresenta inicialmente variações nas enzimas do sistema antioxidante. Segundo Ślesak et al., 2007 estas enzimas do sistema antioxidante são reguladas no período diurno por processos bioquímicos similares aos de enzimas envolvidas em CAM, indicando uma possível interação entre o sistema antioxidante e essa via fotossintética. Como *A. strobilacea* apresenta o metabolismo CAM mesmo na condição pré estresse é possível supor que em suspensão de rega ela ative preferencialmente o metabolismo antioxidante para a eliminação de ROS e como consequência desse aumento nas enzimas do sistema antioxidante a peroxidação lipídica é diminuída, embora esse padrão de regulação ainda não esteja totalmente claro *A. strobilacea* mostrou-se eficiente na eliminação de ROS, uma vez que não foram observadas alterações nos níveis de LPO ao ponto de ocasionarem dano oxidativo

Após a reidratação a reidratação as plantas recuperaram o conteúdo hídrico, mas as atividades das enzimas do sistema antioxidante aumentaram, sugerindo que o período avaliado não foi adequado para avaliar a capacidade de recuperação das atividades das enzimas do sistema antioxidante em níveis similares aos observados na condição irrigada.

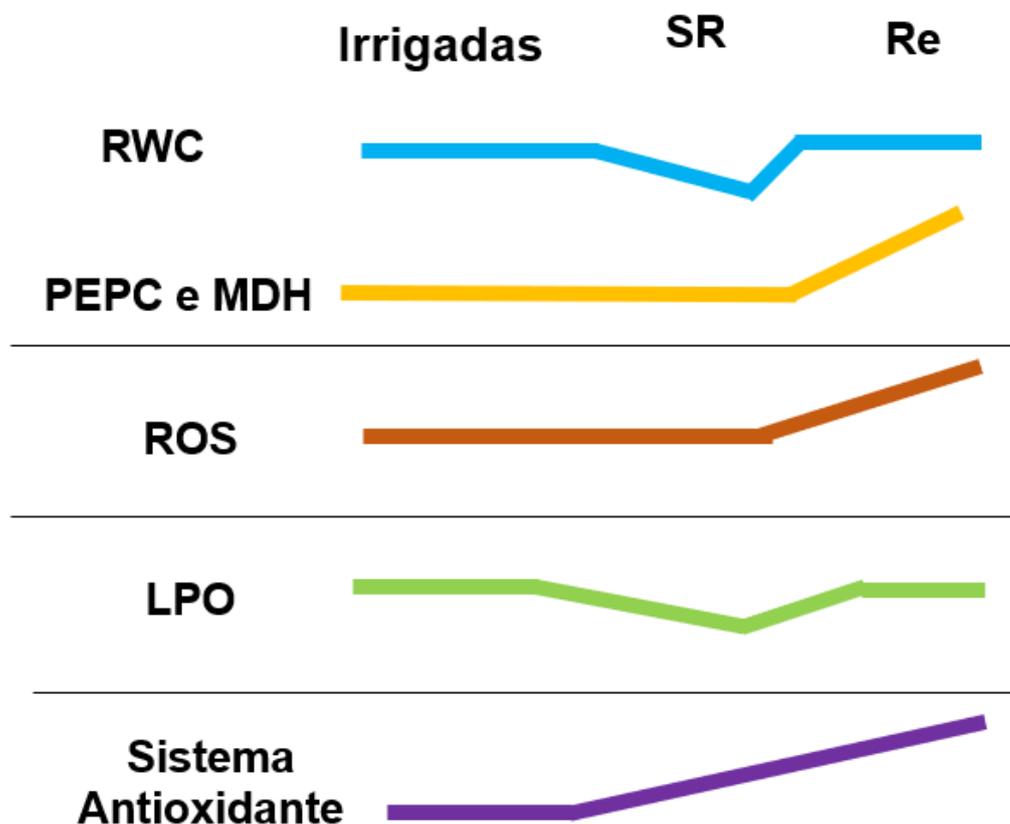


Figura 17. Síntese dos resultados. Atividade das enzimas do CAM (PEPC e MDH), Conteúdo de superóxido (ROS) e atividade das enzimas do sistema antioxidante em plantas de *A. strobilacea* bem hidratada (irrigada), submetidas a suspensão de rega (SR) e após a reidratação (RE).

Visando esclarecer o funcionamento do CAM e das enzimas do sistema antioxidante após a retomada de rega, faz-se necessário a análise desses parâmetros por um período de reidratação mais longo. Também seria ideal avaliar se em suspensão hídrica e após a reidratação ocorrem variações no conteúdo de ácidos orgânicos, tendo em vista que plantas CAM são caracterizadas por um acúmulo de malato e citrato no período noturno, deste modo seria possível verificar se o padrão de CAM foi alterado. É possível supor que os carboidratos estejam atuando em conjunto na osmorregulação, tendo em vista que alguns trabalhos evidenciam o acúmulo de carboidratos em condições de déficit hídrico. Desse modo em trabalhos futuros devem-se considerar o papel dos carboidratos na manutenção do potencial osmótico foliar para essa espécie.

De modo geral, os resultados obtidos nesse trabalho mostram que em seca moderada, os mecanismo de defesa ao estresse oxidativo envolvem inicialmente o aumento das enzimas do sistema antioxidante, para essa espécie estudada, o que ocasiona uma eliminação de ROS mais eficiente, a diminuição da peroxidação lipídica aponta para essa situação como sendo mais favorável ao controle da homeostase celular em comparação às plantas que são mais hidratadas.

7. Referências

- Abreu, M.E., Carvalho, V., Mercier, H.** 2018. Antioxidant capacity along the leaf blade of the C₃-CAM facultative bromeliad *Guzmania monostachia* under water deficit conditions. *Funct. Plant Biol.* 45, 620-629. doi:10.1071/FP17162.
- Andrade, J.L.** 2003. Dew deposition on epiphytic bromeliad leaves: An important event in a Mexican tropical dry deciduous forest. *J. Trop. Ecol.* 19, 479–488. doi:10.1017/S0266467403003535.
- Antoniou, C., Savvides, A., Georgiadou, E.C.** 2018. Spectrophotometric Quantification of Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur Species in Plant Samples 1694, 155–161. doi:10.1007/978-1-4939-7398-9.
- 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, 472–479. doi:10.1111/j.1365-2435.2009.01547.x.
- Balen, B., Tkalec, M., Pavoković, D., Pevalek-Kozlina, B., Krsnik-Rasol, M.** 2009. Growth conditions in in vitro culture can induce oxidative stress in *mammillaria gracilis* tissues. *J. Plant Growth Regul.* 28, 36-45. doi:10.1007/s00344-008-9072-5.
- Beauchamp, C., Fridovich, I.** 1971. Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. *Anal. Biochem.* 44, 276–287. doi:10.1103/PhysRev.176.1709.
- Beltrán, J.D., Lasso, E., Madriñán, S., Virgo, A., Winter, K.** 2013. Juvenile tank-bromeliads lacking tanks: Do they engage in CAM photosynthesis? *Photosynthetica* 51, 55–62. doi:10.1007/s11099-012-0077-8.
- Benzing, D.** 2000. Bromeliaceae: Profile of an adaptive Radiation. Oberlin Coll. USA. doi:10.1017/CBO9780511565175.
- Benzing, D., Seemann, J., Renfrow, A.** 1978. The Foliar Epidermis in Tillandsioideae (Bromeliaceae) and Its Role in Habitat Selection 65, 359–365.
- Borland, A.M., Barrera Zambrano, V.A., Ceusters, J., Shorrocks, K.** 2011. The photosynthetic plasticity of crassulacean acid metabolism: An evolutionary innovation for sustainable productivity in a changing world. *New Phytol.* 191, 619–633. doi:10.1111/j.1469-8137.2011.03781.x.
- Borland, A.M., Zambrano, V.A.B., Ceusters, J., Shorrocks, K.** 2011. Health policy has “age rating”. *Employee Benefit Plan Rev.* 32, 95.
- Cach-Pérez, J., Andrade, M.J.L., Reyes-García, C.** 2014. La susceptibilidad de las

Bromeliáceas epífitas al cambio climático. *Bot. Sci.* 92, 157–168.

- Carvalho, V., Abreu, M.E., Mercier, H., Nievola, C.C.** 2017. Adjustments in CAM and enzymatic scavenging of H₂O₂ in juvenile plants of the epiphytic bromeliad *Guzmania monostachia* as affected by drought and rewatering. *Plant Physiol. Biochem.* 113, 32–39. doi:10.1016/j.plaphy.2017.01.024
- Castillo, F.J.** 1996. Antioxidative protection in the inducible CAM plant *Sedum album* L. following the imposition of severe water stress and recovery. *Oecologia* 107, 469–477. doi:10.1007/BF00333937.
- Costa, J.M., Grant, O.M., Chaves, M.M.** 2013. Thermography to explore plant-environment interactions. *J. Exp. Bot.* 64, 3937–3949. doi:10.1093/jxb/ert029
- 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. Linn. Soc.* 178, 169–221. doi:10.1111/boj.12275
- Cruz de Carvalho, M.H.** 2008. Drought stress and reactive oxygen species. Production, scavenging and signaling. *Plant Signal. Behav.* 3, 156–165.
- Cuevas, I.C., Podestá, F.E.** 2000. Purification and physical and kinetic characterization of an NAD⁺-dependent malate dehydrogenase from leaves of pineapple (*Ananas comosus*). *Physiol. Plant.* 108, 240–248. doi:10.1034/j.1399-3054.2000.108003240.x
- Cushman, J.** 2017. CAM Plants. *Encycl. Appl. Plant Sci.* 1, 60–77. doi:10.1016/B978-0-12-394807-6.00092-7.
- Dodd, A.N., Borland, A.M., Haslam, R.P., Griffiths, H., Maxwell, K.** 2002. Crassulacean acid metabolism: plastic, fantastic. *J. Exp. Bot.* 53, 569–580. doi:10.1093/jexbot/53.369.569.
- 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* 10, 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0135391
- Foyer, C.H., Noctor, G.** 2011. Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub. *Plant Physiol.* 155, 2–18. doi:10.1104/pp.110.167569
- Freschi, L., Rodrigues, M.A., Tiné, M.A.S., Mercier, H.** 2010a. Correlation between citric acid and nitrate metabolisms during CAM cycle in the atmospheric bromeliad *Tillandsia pohliana*. *J. Plant Physiol.* 167, 1577–1583. doi:10.1016/j.jplph.2010.06.002
- Freschi, L., Takahashi, C.A., Cambui, C.A., Semprebom, T.R., Cruz, A.B., Mioto, P.T., de Melo Versieux, L., Calvente, A., Latansio-Aidar, S.R., Aidar, M.P.M., Mercier,**

- H. 2010b. Specific leaf areas of the tank bromeliad *Guzmania monostachia* perform distinct functions in response to water shortage. *J. Plant Physiol.* 167, 526–533.
doi:10.1016/j.jplph.2009.10.011
- Gawronska, K., Niewiadomska, E.** 2015. Participation of citric acid and isocitric acid in the diurnal cycle of carboxylation and decarboxylation in the common ice plant. *Acta Physiol. Plant.* 37. doi:10.1007/s11738-015-1807-x
- Gill, S., Tuteja, N.** 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 909–930.
doi:10.1016/j.plaphy.2010.08.016.
- Givnish, T.J., Barfuss, M.H.J., Ee, B. Van, Riina, R., Schulte, K., Horres, R., Gonsiska, P.A., Jabaily, R.S., Crayn, D.M., Smith, J.A.C., Winter, K., Brown, G.K., Evans, T.M., Holst, B.K., Luther, H., Till, W., Zizka, G., Berry, P.E., Sytsma, K.J.** 2014. Adaptive radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 71, 55–78. doi:10.1016/j.ympev.2013.10.010.
- González-Salvatierra, C., Luis Andrade, J., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Manuel Peña-Rodríguez, L.** 2010. Antioxidant content in two CAM bromeliad species as a response to seasonal light changes in a tropical dry deciduous forest. *J. Plant Physiol.* 167, 792–799. doi:10.1016/j.jplph.2010.01.001
- Graham, E.A., Andrade, J.L.** 2004. Drought tolerance associated with vertical stratification of two co-occurring epiphytic bromeliads in a tropical dry forest. *Am. J. Bot.* 91, 699–706. doi: 10.3732/ajb.91.5.699.
- Griffiths, H., Ong, B.L., Avadhani, P.N., Goh, C.J.** 1989. Recycling of respiratory CO₂ during Crassulacean acid metabolism: alleviation of photoinhibition in *Pyrrosia piloselloides*. *Planta* 179, 115–122. doi:10.1007/BF00395778.
- Groß, F., Durner, J., Gaupels, F.** 2013. Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. *Front. Plant Sci.* 4, 1–15. doi:10.3389/fpls.2013.00419.
- Habibi, G., Hajiboland, R.** 2011. Comparison of water stress and UV radiation effects on induction of CAM and antioxidative defense in the succulent *rosularia elymaitica* (Crassulaceae). *Acta Biol. Cracoviensia Ser. Bot.* 53, doi:10.2478/v10182-011-0020-5
- Hagiwara, W., Menezes, F., Nievola, C.** 2015. Sobrevivência de plantas da bromélia *Acanthostachys strobilacea* (Schultz f.) Klotzsch & Otto cultivadas in vitro em alta temperatura constante e déficit hídrico. 22^a Reunião Anual do Instituto de Botânica de São Paulo 22, 2015.
- Hajiboland, R.** 2014. Reactive Oxygen Species and Photosynthesis, Oxidative Damage to

Plants: Antioxidant Networks and Signaling. Elsevier Inc. doi10.1016/B978-0-12-799963-0.00001-0

- Hancock, J., Desikan, R., Neil, S.** 2001. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem. Soc.* 29, Part 2, 345–350. doi: 10.1042/bst0290345
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Gill, S.S., Fujita, M.** 2013. Drought Stress Responses in Plants, Oxidative Stress, and Antioxidant Defense, *Climate Change and Plant Abiotic Stress Tolerance*. doi: 10.1002/9783527675265.ch09
- Hatch, M.D., Agostino, A., Burnell, J.N.** 1988. Photosynthesis in phosphoenolpyruvate carboxykinase-type C4 plants: Activity and role of mitochondria in bundle sheath cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 261, 357–367. doi:10.1016/0003-9861(88)90351-7.
- IPCC**, 2014. Intergovernmental Panel on Climate change 2014. Synthesis report. Versión inglés, *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. doi:10.1017/CBO9781107415324.
- Jiang, Z., Hunt, V. J., Wolff, P. S.** 1991. Ferrous ion oxidation in presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxides in plasma. *Methods Enzymol.* 300, 58–62. doi: 10.1016/S0076-6879(99)00113-5.
- Keles, Y., Oncel, I.** 2002. Response of antioxidative defence system to temperature and water stress combinations in wheat seedlings. *Plant Sci.* 163, 783–790.
- Liu, Z., Shi, S., Zhang, C., Yin, G., Yang, F.** 2018. Drought tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.) varieties is associated with enhanced antioxidative protection and declined lipid peroxidation. *J. Plant Physiol.* 232, 226–240. doi: 10.1016/j.jplph.2018.10.023
- Lüttge, U.** 2010. Ability of crassulacean acid metabolism plants to overcome interacting stresses in tropical environments. *AoB Plants* 2010, plq005-plq005. doi:10.1093/aobpla/plq005
- Lüttge, U.** 2004. Ecophysiology of Crassulacean Acid Metabolism (CAM). *Ann. Bot.* 93, 629–652. doi:10.1093/aob/mch087
- Martin, C.** 1994. Physiological ecology of the Bromeliaceae. *Oceania* 29, 236–237. doi:10.1002/j.1834-4461.1959.tb02969.x
- Matiz, A., Miotto, P.T., Mayorga, A.Y., Freschi, L., Mercier, H.** 2013a. CAM Photosynthesis in Bromeliads and Agaves : What Can We Learn from These Plants ? *Photosynthesis* 91–134. doi:10.5772/56219
- Menezes, F.O., Carvalho, C.P. De, Nievola, C.C.** 2014. Efeitos do déficit hídrico em plantas de *Acanthostachys strobilacea* (Schultz f.) Klotzsch (Bromeliaceae) cultivadas in vitro.

21^a Reunião Anual do Instituto de Botânica.interação ciência e Sociedade. 1–4.

- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., Mittler, R.** 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell Environ.* 33, 453–467. doi:10.1111/j.1365-3040.2009.02041.x
- Mittler, R.** 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress and stress tolerance 7, 405–410. doi:10.1016/S1360-1385(02)02312-9
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F.** 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9, 490–498. doi:10.1016/j.tplants.2004.08.009
- Murashigue, T., Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Nakano, Y., Asada, K.** 1981. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22, 867–880. doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232
- Nievola, C.C., 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. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant.* doi:10.1079/IVP2005694
- Niewiadomska, E., Borland, A.M.** 2008. Crassulacean Acid Metabolism: a Cause or Consequence of Oxidative Stress in Plants? 247–266. doi:10.1007/978-3-540-72954-9_10
- Niramo, H.G.** 2009. Circadian Regulation of a Plant Protein Kinase. *Chronobiol. Int.* 15, 109–118. <https://doi.org/10.3109/07420529808998676>
- Nobel, P. S.** 1996. High productivity of certain agronomic CAM species. In: K. Winter, J. A. C. Smith (eds.). *Crassulacean acid metabolism: biochemistry, ecophysiology and evolution.* SpringerVerlag, Berlin Heidelberg, pp. 255–265.
- Noctor, G., Veljovic-Jovanovic, S., Driscoll, S., Novitskaya, L., Foyer, C.H.** 2002. Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: A predominant role for photorespiration? *Ann. Bot.* 89, 841–850. doi:10.1093/aob/mcf096
- Osmond, C.B.** 1978. Crassulacean Acid Metabolism: A Curiosity in Context. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 29, 379–414. doi:10.1146/annurev.pp.29.060178.002115
- Reitz, R.** 1983. Bromeliáceas e a Malária-Bromélia Endêmica. . Itajaí. *Flora Ilus. Catarinense.* Série 983, 1–808.
- Santos, D.S. dos, Tamaki, V., Nievola, C.C.** 2010. In vitro propagation of the ornamental bromeliad *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Klotzsch via nodal segments. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant* 46, 524–529. doi:10.1007/s11627-010-9325-4
- Schaedle, M., Bassahm, J.** 1977. Chloroplast glutathione reductase. *Plant Physiol.* 59, 1011–

1012.doi:10.1104/pp.59.5.1011

- Schmidt, G., Zotz, G.** 2001. Ecophysiological consequences of differences in plant size: In situ carbon gain and water relations of the epiphytic bromeliad, *Vriesea sanguinolenta*. *Plant, Cell Environ.* 24, 101–111. doi:10.1046/j.1365-3040.2001.00658.x
- Silva, E.N., Silveira, J.A.G., Ribeiro, R. V., Vieira, S.A.,** 2015. Photoprotective function of energy dissipation by thermal processes and photorespiratory mechanisms in *Jatropha curcas* plants during different intensities of drought and after recovery. *Environ. Exp. Bot.* 110, 36–45. doi:10.1016/j.envexpbot.2014.09.008
- Silvera, K., Neubig, K.M., Whitten, W.M., Williams, N.H., Winter, K., Cushman, J.C.** 2010. Evolution along the crassulacean acid metabolism continuum. *Funct. Plant Biol.* 37, 995–1010. doi:10.1071/FP10084
- Ślesak, I., Libik, M., Karpinska, B., Karpinski, S., Miszalski, Z.** 2007. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses 54, 39–50.
- Smirnoff, N.** 2005. Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and. *Antioxidants React. Oxyg. Species Plants* 53–86.
- Souza, S.R., Blande, J.D., Holopainen, J.K.** 2013. Pre-exposure to nitric oxide modulates the effect of ozone on oxidative defenses and volatile emissions in lima bean. *Biotechnol. Anim. Husb.* 33, 111–125. doi: 10.1016/j.envpol.2013.03.065
- Spaldin, H. M., Stumpf, K. D., Ku, M.S.B., Burris H, R., Edwards, E, G.** 2007. Crassulacean Acid Metabolism and Of intenal CO₂ and O₂ concentrations in sedum prealtum DC.
- Stehmann, J., Forzza, R., Salino, A., Sobral, M., Costa, D., Kamino, L.** 2009. Plantas da floresta atlântica. *Jard. Botânico do Rio Janeiro* 1, 3–12.
- Stiles, K.C., Martin, C.E.** 1996. Effects of drought stress on CO₂ exchange and water relations in the CAM epiphyte *Tillandsia utriculata* (Bromeliaceae). *J. Plant Physiol.* 149, 721–728. doi:10.1016/S0176-1617(96)80098-8
- Sunagawa, H., Cushman, J., Agarie, S.** 2010. Crassulacean Acid Metabolism May Alleviate Production of Reactive Oxygen Species in a Facultative CAM Plant, the Common Ice Plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. . *Plant Prod. Sci.* 13, 256–260. doi:10.1626/pp.13.256
- Tamaki, V., Mercier, H.** 1997. Variações na acidez vacuolar e na atividade da PEP-carboxilase em *Tillandsia pohliana* Mez (Bromeliaceae) cultivada in vitro.
- Trenberth, K.E., Dai, A., Schrier, G. Van Der, Jones, P.D., Briffa, K.R., Sheffield, J.** 2014.

Trenberth_etal_2013_Global warming and changes in drought 17–22.

doi:10.1038/NCLIMATE2067

Weng, X.Y., Zheng, C.J., Xu, H.X., Sun, J.Y. 2007. Characteristics of photosynthesis and functions of the water-water cycle in rice (*Oryza sativa*) leaves in response to potassium deficiency. *Physiol. Plant.* 131, 614–621. doi:10.1111/j.1399-3054.2007.00978.x

Winter, K., Tenhunen, J.D. 1982. Light-Stimulated Burst of Carbon Dioxide Uptake following Nocturnal Acidification in the Crassulacean Acid Metabolism Plant *Kalanchoe daigremontiana*. *Plant Physiol* 70, 1718–1722. doi:10.1104/pp.70.6.1718

Wu, G.L., Cui, J., Tao, L., Hong, Y. 2010. Fluroxypyr triggers oxidative damage by producing superoxide and hydrogen peroxide in rice (*Oryza sativa*). *Ecotoxicology* 19, 124–132. doi:10.1007/s10646-009-0396-0

Xu, Z., Zhou, G., Shimizu, H. 2010. Plant responses to drought and rewatering. *Plant Signal. Behav.* 5, 649–54. doi:10.4161/psb.5.6.11398

8. ANEXOS

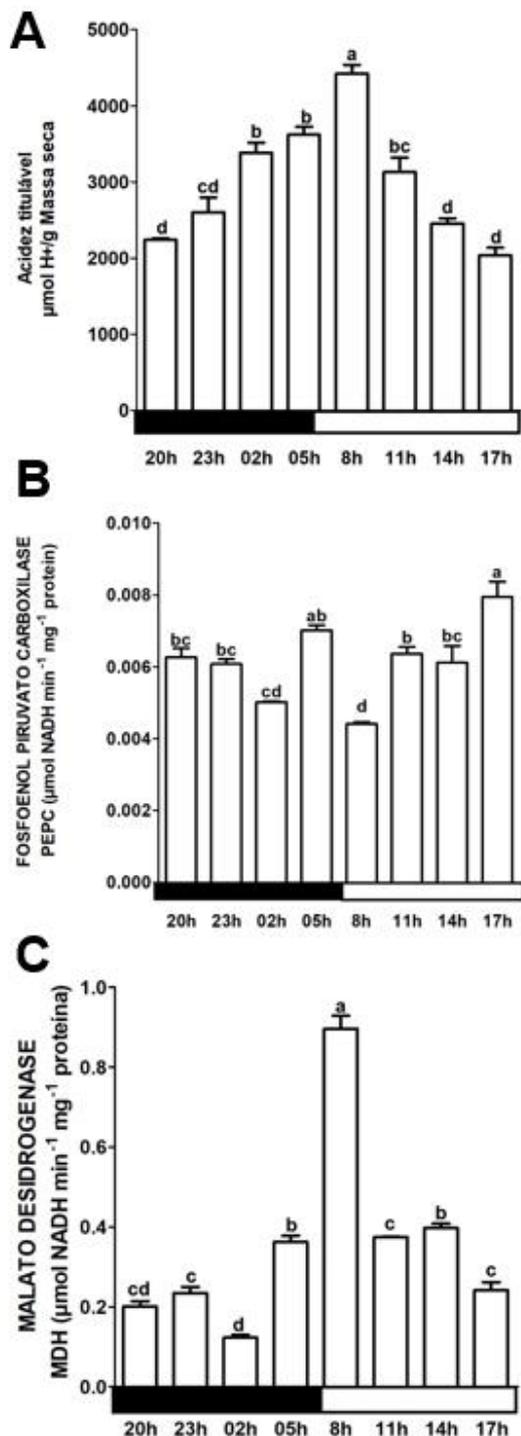
8.1. Anexo I:

Figura 18: Padrão diurno e noturno de acidez titulável (A), atividade das enzimas PEPC (B) e MDH (C) em plantas jovens *A.strobilacea* bem hidratadas (Irigada) antes do período de suspensão de rega. Os dados são expressos como a média (\pm SEM) de três amostras replicadas. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as médias nos diferentes períodos de coleta seguidos pelo teste ANOVA e Tukey ($P > 0,05\%$ teste t).