

URSULA CAROLINE SALVATERRA BATISTA

Respostas morfofisiológicas e metabólicas de
Acanthostachys pitcairnioides (Mez) Rauh &
Barthlott (Bromeliaceae) ao déficit hídrico

Dissertação apresentada ao Instituto de Pesquisas Ambientais, da Secretaria de Meio Ambiente, Infraestrutura e Logística, 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

2022

URSULA CAROLINE SALVATERRA BATISTA

Respostas morfofisiológicas e metabólicas de
Acanthostachys pitcairnioides (Mez) Rauh &
Barthlott (Bromeliaceae) ao déficit hídrico

Dissertação apresentada ao Instituto de Pesquisas Ambientais, da Secretaria de Meio Ambiente, Infraestrutura e Logística, 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: DRA. MARÍLIA GASPAR

Ficha Catalográfica elaborada pelo NÚCLEO DE BIBLIOTECAS E MAPOTECAS

B333r Batista, Ursula Caroline Salvaterra
Resposta morfofisiológicas e metabólicas de *Acanthostachys pitcairnioides* (Mez) Rauh & Barthlott (Bromeliaceae) ao déficit hídrico / Ursula Caroline Salvaterra Batista - - São Paulo, 2023.
72p.; il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Pesquisas Ambientais da Secretaria de Meio Ambiente, Infraestrutura e Logística, 2023.
Bibliografia.

1. CAM. 2. Epífita. 3. Osmorregulação. I. Título.

CDU: 582.564

BANCA EXAMINADORA

Dra. Marília Gaspar (Orientador)

Dra. Catarina Carvalho Nievola

Dr. Kleber Resende Silva

Dedico este trabalho à Guilherme Santos de Andrade (☆08/10/1998 - †07/07/2022) e aos, aproximadamente, 40,18% de estudantes que podem entrar para a estática de suicídio entre os pós-graduandos. Dedico também à Dr^a Cátia por segurar em minha mão e não me permitir entrar para a estatística.

Eu larguei meu escudo frente à multidão
Eu expus meus segredos, meus defeitos e não
Eu não tenho mais medo, eu me fiz canção

O meu corpo é poeira, minha voz é trovão

- Quando Eu Caí,
Lucas Silveira (Fresno)

Agradecimentos

Inicialmente, agradeço ao Instituto de Pesquisas Ambientais (IPA) de São Paulo e ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente pelo suporte e infraestrutura fornecidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

À minha orientadora, Dra. Marília Gaspar, que aceitou me orientar mesmo sem eu ter experiência. Obrigada por todos os ensinamentos, conselhos, acolhimento e preocupação comigo, principalmente em um momento tão delicado como o que passamos. Agradeço todos os esforços que a senhora fez para me ajudar a chegar até aqui.

Ao Dr. Evandro Vieira, que me auxiliou em cada passo dado nesta trajetória. Obrigada por cada procedimento ensinado, por cada dia em laboratório me ensinando e acompanhando, por cada discussão de dados comigo, por todo o conhecimento e paciência que me permitiram chegar até esse momento. Obrigada por me oferecer, também, tranquilidade e paz, que o universo te retorne tudo isso também.

À Dra. Adriana Hissae Hayashi agradeço sua dedicação e todo o tempo que gastou me instruindo, me acompanhando em cada procedimento e me ensinando, com bastante carinho, a fazer um bom trabalho. Obrigada por todo conhecimento, paciência e palavras amigas trocadas.

Ao Dr. Eduardo Purgatto, do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela colaboração que permitiu a realização das análises de perfil metabólico neste projeto.

Agradeço aos meus colegas do Instituto de Pesquisas Ambientais, em especial o querido, Gustavo, que tem o hábito de alegrar qualquer ambiente e ser uma companhia tão agradável que as horas voam. A amada, Luiza, que me ofereceu uma abertura imensa para que eu pudesse falar sobre minhas angústias e medos e como retorno me transmitiu amor e carinho, as vezes sem dizer uma única palavra. Ao adorável, Otávio, com quem pude passar momentos agradáveis e divertidos dentro e fora do Instituto. Não posso deixar de citar também os meus amados, Cauê, Bruna, Giovanna e Evilli, obrigado pelas risadas.

Não posso deixar de agradecer à minha psicóloga, Dra. Cátia. Sua escuta, conselhos e afeto por mim me fazem acreditar no melhor dos outros e de mim mesma, obrigada por me ajudar a manter a sanidade.

Agradeço também aos meus pais e minha irmã. Obrigada por sempre me oferecerem todo o apoio que podiam. Mesmo nas dissonâncias eu sinto que sou bem quista e principalmente respeitada.

Minha gratidão se estende à família que escolhi. Gabriela, pela escuta e carinho que viajam 173Km para acalmar minha cabeça e colocar os pensamentos em ordem. Lais, por estar presente em todos os momentos da minha vida, não sei mais separar a minha história da sua e para mim essa é uma das coisas mais bonitas que podem acontecer. E ao Cadu, que no auge dos seus 3 anos me faz uma tia mais babona e feliz a cada visita.

Meus amigos de RPG, Samuel, Thacio, Thiago, Wellingson e Daniel. De todas as *dungeons* que passamos essa eu jamais atravessaria sem ajuda de vocês.

E para encerrar com o que tenho de mais precioso, meu amado Ícaro, a luz da minha vida. Obrigada pelo seu ombro, seus ouvidos e seu coração. Eu definitivamente sou uma pessoa melhor e mais feliz graças a sua vida.

Obrigada a todos e cada um de vocês

Resumo

Alterações climáticas drásticas têm sido previstas para o final deste século, com um declínio de chuvas em diversas regiões do globo, e aumento na frequência e intensidade de eventos extremos, como a seca, em regiões tradicionalmente úmidas. A Mata Atlântica é um *hotspot* mundial que abriga um grande número de espécies vulneráveis e ameaçadas de extinção e seu contínuo desmatamento, associado às mudanças do clima, põe em risco a biodiversidade deste bioma. Mais de 70% das bromélias ocorrem na Mata Atlântica, dentre elas a espécie alvo deste estudo, *Acanthostachys pitcairnioides*, endêmica dessa região. *A. pitcairnioides* é uma bromélia epífita pertencente à subfamília Bromelioideae. Nas bromélias epífitas, as folhas são o principal meio de obtenção e armazenamento de carbono, nutrientes e água, esta última na forma de neblina ou água da chuva. Embora *A. pitcairnioides* seja classificada como tendo metabolismo fotossintético do tipo C3, em função de análises de $\delta^{13}C$ (Crayn et al. 2015), a espécie, além da proximidade filogenética com *A. strobilaceae* e outras bromélias CAM, apresenta características foliares de plantas suculentas e outras adaptações visando evitar a perda de água. Em função do aumento de secas intermitentes previsto pelo IPCC em seu ambiente natural de ocorrência, nós hipotetizamos que *A. pitcairnioides* apresente tolerância à seca e que o CAM seja um dos mecanismos induzidos nestas condições. Tendo em vista que a disponibilidade de água é o fator mais limitante para o crescimento e sobrevivência das epífitas, o presente estudo objetivou avaliar as respostas morfológicas, fisiológicas e metabólicas de *A. pitcairnioides* à seca, assim como as respostas de recuperação da espécie após a reidratação, simulando um evento extremo de seca com posterior ocorrência de chuva. Para tal, plantas cultivadas em casa de vegetação foram submetidas a 42 dias de seca por suspensão de rega, sendo reidratadas após esse período. Mesmo com a completa extinção da água do solo e queda do teor relativo de água da folha para 47%, a espécie foi capaz de tolerar o estresse hídrico imposto. A seca causou a plasmólise do parênquima aquífero, mas não do parênquima clorofiliano, sugerindo a ocorrência de um transporte de água entre esses tecidos, que preservou o aparato fotossintético e o metabolismo da planta. Queda significativa do potencial osmótico foliar foi observada somente no 42º dia de seca, que coincide com as concentrações aumentadas de importantes osmorreguladores, como sacarose, mio-inositol, galactinol, xilitol e prolina. O acúmulo de acidez titulável, de oxaloacetato e malato reforçam o metabolismo CAM

para a espécie, descrito anteriormente por análises de $\delta^{13}\text{C}$. Foi observada uma limitação fotoquímica à medida que a seca se tornou mais intensa, com diminuição do conteúdo de clorofilas, da máxima eficiência quântica do fotossistema II e da taxa de transporte de elétrons aos 42 dias. Entre 28 e 42 dias de seca, foi observado acúmulo de compostos antioxidantes, como carotenóides, ácidos graxos, ácido ascórbico e ácidos fenólicos. Embora os experimentos tenham sido conduzidos em casa de vegetação, a presença de diversas adaptações morfofisiológicas e a ativação de diferentes mecanismos de proteção indicam alta tolerância de *A. pitcairnioides* à seca e sugerem que a mesma seja capaz de se adaptar e sobreviver à intensificação de episódios de seca intermitente ao qual a espécie está sujeita em seu ambiente natural.

Palavras-chave: CAM; Epífita; Mata Atlântica; Osmorregulação; Seca

Abstract

Drastic climate changes have been predicted for the end of this century, with a decline in rainfall in several regions of the globe, and an increase in the frequency and intensity of extreme events, such as drought, in traditionally humid regions. The Atlantic Forest is a global hotspot that is home to a large number of vulnerable and endangered species and its continuous deforestation, associated with climate change, puts the biodiversity of this biome at risk. More than 70% of bromeliads occur in the Atlantic Forest, among them the target species of this study, *Acanthostachys pitcairnioides*, endemic to this region. *A. pitcairnioides* is an epiphytic bromeliad belonging to the subfamily Bromelioideae. In epiphytic bromeliads, leaves are the main means of obtaining and storing carbon, nutrients and water, the latter in the form of fog or rainwater. Although *A. pitcairnioides* is classified as having type C3 photosynthetic metabolism, based on $\delta^{13}\text{C}$ analyzes (Crayn et al. 2015), the species, in addition to its phylogenetic proximity to *A. strobilaceae* and other CAM bromeliads, presents foliar characteristics of succulent plants and other adaptations aimed at preventing water loss. Due to the increase in intermittent droughts predicted by the IPCC in its natural environment, we hypothesize that *A. pitcairnioides* presents drought tolerance and that CAM is one of the mechanisms induced in these conditions. Considering that water availability is the factor more limiting for the growth and survival of epiphytes, the present study aimed to evaluate the morphological, physiological and metabolic responses of *A. pitcairnioides* to drought, as well as the recovery responses of the species after rehydration, simulating an extreme drought event with subsequent occurrence Of rain. To this end, plants grown in a greenhouse were subjected to 42 days of drought by suspending irrigation, being rehydrated after this period. Even with the complete extinction of soil water and a drop in the relative water content of the leaf to 47%, the species was able to tolerate the water stress imposed. The drought caused plasmolysis of the aquifer parenchyma, but not of the chlorophyll parenchyma, suggesting the occurrence of water transport between these tissues, which preserved the photosynthetic apparatus and the plant's metabolism. A significant drop in leaf osmotic potential was observed only on the 42nd day of drought, which coincides with increased concentrations of important osmoregulators, such as sucrose, myo-inositol, galactinol, xylitol and proline. The accumulation of titratable acidity, oxaloacetate and malate reinforces the CAM metabolism for the species, previously described by $\delta^{13}\text{C}$ analyses. A photochemical limitation was observed as the

drought became more intense, with a decrease in the chlorophyll content, the maximum quantum efficiency of photosystem II and the electron transport rate at 42 days. Between 28 and 42 days of drought, an accumulation of antioxidant compounds was observed, such as carotenoids, fatty acids, ascorbic acid and phenolic acids. Although the experiments were conducted in a greenhouse, the presence of several morphophysiological adaptations and the activation of different protection mechanisms indicate high tolerance of *A. pitcairnioides* to drought and suggest that it is capable of adapting and surviving the intensification of episodes of intermittent drought to which the species is subject in its natural environment.

Keywords: Atlantic Forest; CAM; Drought; Epiphyte; Osmoregulation.

Lista De Abreviaturas

ABA – Ácido abscísico

Abs - Absorbância

ATP – Adenosina trifosfato

C – Controle

CA – Anidrase Carbônica

CAM – Metabolismo ácido das crassuláceas

Chl *a* – Clorofila *a*

Chl *b* – Clorofila *b*

CO₂ – Dióxido de carbono

DD – Deficiente de dados

ERO – Espécies reativas de oxigênio

ETR – Taxa relativa de transporte de elétrons

F0 – Fluorescência mínima

FAA- Formaldeído-ácido acético glacial-etanol

Fm - Fluorescência máxima

IPCC – Intergovernmental Panel on Climate Change (Painel intergovernamental de mudança climática)

K⁺ - Íon potássio

MDH – Malato desidrogenase

MSTFA - N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide

NAD – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADP(ME) - Nicotinamida adenina dinucleotídeo dependente de enzima málica

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NaOH – Hidróxido de Sódio

NPQ – *quenching* não-fotoquímico

PC1 – Primeiro componente

PC2 – Segundo componente

PCA – Análise de componentes principais

PEP - fosfoenolpiruvato

PEPC – fosfoenolpiruvato carboxilase

PEPCK - fosfoenolpiruvato carboxiquinase

PF – Peso fresco

PS – Peso seco

PSI – Fotossistema I

PSII – Fotossistema II

PT – Peso turgido

qP – *quenching* fotoquímico

R – Tratamento reidratação

RNS - Espécies reativas de nitrogênio

S – Tratamento de seca

TCA – Ácido tricarboxílico

TDR – Reflectometria no domínio do tempo

TRA – Teor relativo de água

VU – Vulnerável

Ψ_s – Potencial osmótico

Lista De Figuras

Figura 1: Alterações nas variáveis precipitação de alta intensidade (a) e secas em regiões propensas à seca (b) em função dos cenários de aumento de temperatura previstos pelo IPCC.	12
Figura 2: Impactos humanos recentes na biodiversidade dos <i>hotspots</i> terrestres... ..	13
Figura 3: Plantas de <i>Acanthostachys pitcairnioides</i> em cultivo no Laboratório de Ecofisiologia e Bioquímica do Instituto de Pesquisas Ambientais..	17
Figura 4: Diferenças no padrão de abertura e fechamento estomático de plantas C3 e CAM..	18
Figura 5: Fluxos metabólicos nos quatro modos de fotossíntese: (A) C3, (B) CAM, (C) CAM cycling e (D) CAM idling.....	20
Figura 6: Aspecto das plantas de <i>A. pitcairnioides</i> onde: (a) controle, com rega em dias alternados. (b) 14 dias de déficit hídrico. (c) 28 dias de déficit hídrico. (d) 42 dias de déficit hídrico. (e) comparação entre plantas controle (C) à esquerda e déficit hídrico (S) à direita..	32
Figura 7: (a) Umidade relativa do solo em vasos de plantas de <i>A. pitcairnioides</i> submetidas a seca. (b) Teor relativo de água (TRA) foliar. (c) Potencial osmótico (PO).	33
Figura 8: Parâmetros de fluorescência em <i>A. pitcairnioides</i> submetidas a seca. (a) Rendimento Quântico Máximo do PSII (F_v/F_m); (b) Taxa Relativa de Transporte de Elétrons (ETR); (c) Quenching fotoquímico (qP). (d) Quenching não-fotoquímico (NPQ).	35

Figura 9: Pigmentos fotossintéticos de <i>A. pitcairnioides</i> submetidas a seca. (a) clorofila a ($\text{mg.g}^{-1}\text{MS}$); (b) clorofila b ($\text{mg.g}^{-1}\text{MS}$); (c) razão clorofila a-clorofila b ($\text{mg.g}^{-1}\text{MS}$); (d) carotenoides ($\text{mg.g}^{-1}\text{MS}$).	37
Figura 10: Lâmina foliar de <i>Acanthostachys pitcairnioides</i> de material dissociado (a, b), impressão de epiderme (c) e seções transversais (d, e)... ..	39
Figura 11: Seções transversais da lâmina foliar de <i>Acanthostachys pitcairnioides</i> expostas aos tratamentos controle (a, b), seca (c, d, e) e reidratação (f.).	40
Figura 12: Delta de acidez titulável de plantas de <i>A. pitcairnioides</i> submetidas a seca..	41
Figura 13: Mudanças gerais no perfil metabólico de folhas de <i>A. pitcairnioides</i> submetidas à seca por período de 42 dias e 96 h após a reidratação..	42
Figura 14: Análise de componentes principais (PCA) da matrix de dados metabólicos de folhas de <i>A. pitcairnioides</i> submetidas à seca por período de 42 dias e 96 h após a reidratação.	44
Figura 15: <i>Heatmap e clustering tree</i> das mudanças no perfil metabólico em folhas de <i>A. pitcairnioides</i> submetidas à seca por período de 42 dias e 96 h após a reidratação ..	66
Figura 16: Análise de enriquecimento de metabólitos em folhas de <i>A. pitcairnioides</i> submetidas à seca por período de 42 dias e 96 h após a reidratação.	67

Sumário

Resumo	20
Abstract.....	22
1. Introdução	12
2. Objetivos.....	26
3. Materiais e Métodos	27
4. Resultados.....	32
5. Discussão	45
6. Conclusão e Perspectivas.....	51
7. Referências	53
8. Anexos	66

1. Introdução

1.1. Mudanças Climáticas

A estabilidade dos biomas e a biodiversidade vêm sendo ameaçadas em todo o mundo, devido às mudanças climáticas. De 2006 a 2015 as atividades humanas elevaram a temperatura global em cerca de 0,87°C e, caso a taxa de aquecimento mantenha os níveis atuais, a temperatura média da Terra se elevará 1,5°C até o ano de 2100, em comparação com período pré-industrial, levando-se em conta um cenário intermediário projetado no último relatório do IPCC (Arias *et al.* 2021).

Além do aumento de temperatura, as concentrações de dióxido de carbono têm aumentado significativamente desde a revolução industrial, atingindo no ano de 2020 concentrações da ordem de 410 ppm, um aumento de aproximadamente 30% em relação ao período pré-industrial. As concentrações atuais são maiores do que as medidas nos núcleos de gelo nos últimos 800.000 anos (Arias *et al.* 2021).

Essas alterações de gases de efeito estufa e temperatura impactam a disponibilidade de água, levando à alteração do regime de chuvas, com maior duração e intensificação dos períodos de seca, desertificação em algumas áreas e aumento de pluviosidade em outras (Figura 1) (Arias *et al.* 2021).

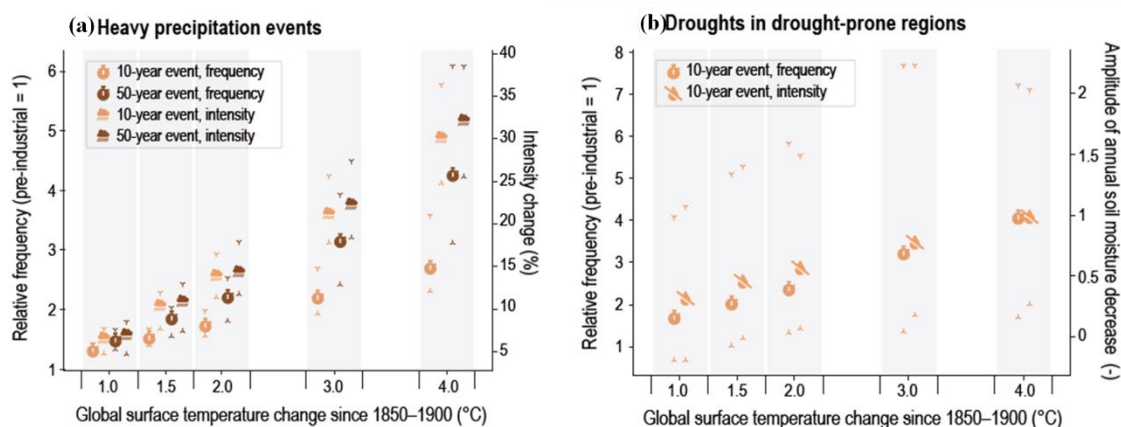


Figura 1: Alterações nas variáveis precipitação de alta intensidade (a) e secas em regiões propensas à seca (b) em função dos cenários de aumento de temperatura previstos pelo IPCC (Arias *et al.* 2021).

As alterações climáticas, associadas ao desmatamento contínuo de biomas tropicais, como Cerrado e Mata Atlântica, *hotspots* mundiais que incluem um grande

número de espécies vulneráveis e ameaçadas de extinção, têm provocado perda acentuada de biodiversidade (Follador *et al.* 2018; Costello *et al.* 2022) (Figura 2).

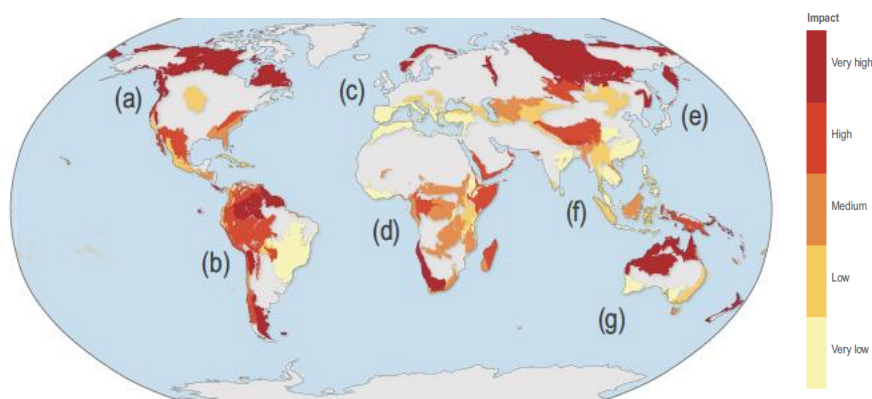


Figura 2: Impactos humanos recentes na biodiversidade dos *hotspots* terrestres. Em cores, estão assinalados os *hotspots*; cinza não são *hotspots*. Os impactos estão escalonados em 5 categorias equivalentes de 20%. (a) América do Norte; (b) América do Sul; (c) Europa; (d) África; (e) Ásia (Norte); (f) Ásia (Sudeste); (g) Arquipélagos da Ásia, Austrália e Nova Zelândia (Costello *et al.*, 2022).

Um estudo recente que compila 1819 trabalhos cobrindo toda a extensão da Mata Atlântica mostrou que mais de 80% destes aponta perda de biomassa da floresta e riqueza de espécies. Em média, foi observada diminuição de 25-32% em biomassa florestal, 23-31% em número de espécies e 42% em número de espécies endêmicas (de Lima *et al.* 2020).

Com as alterações das temperaturas médias globais e dos índices pluviométricos, uma série de respostas biológicas já têm sido observadas em estudos de monitoramento em campo ou em condições controladas, envolvendo estresses individuais ou combinados. Como diferentes estresses podem ativar/reprimir diferentes sensores, vias de transdução de sinal, hormônios, redes regulatórias e/ou respostas metabólicas que levarão a diferentes estratégias de aclimação e/ou defesa (por exemplo, escape, evitação, tolerância, senescência e/ou morte celular programada), uma combinação de dois ou mais estresses pode ter resultados distintos (Zandalinas *et al.* 2021).

Além das respostas morfofisiológicas, bioquímicas e moleculares que vêm sendo estudadas, alterações dos padrões fenológicos e de distribuição das espécies também têm sido descritas com o agravamento das alterações climáticas. Por um lado, a distribuição de muitas espécies mudou para regiões historicamente mais frias nas regiões polares e de altitude (Burrows *et al.* 2014; Fadrique *et al.* 2018; Anderson & Wadgymar 2020). Por outro, muitas espécies agora emergem e se reproduzem significativamente mais cedo no ano, em resposta a invernos mais curtos, início precoce

da estação de crescimento e secas prolongadas, como atestam observações em campo e estudos de coleções de herbário (Wadygmar *et al.* 2018; Lima *et al.* 2021).

Em revisão recente, Anderson & Song (2020) listaram lacunas nas pesquisas de adaptação de plantas às mudanças climáticas e sugeriram que é necessário expandir o foco de pesquisa de espécies modelo para uma variedade de espécies ecologicamente e agronomicamente importantes. Os autores ressaltam ainda a importância de identificar genes candidatos, visando validar funções e elucidar mecanismos moleculares, assim como expandir o foco dos estudos para múltiplos estresses, com a contribuição das ferramentas ômicas (metabolômica, proteômica, transcritômica e genômica) (Anderson & Song, 2020).

1.2. Bromeliaceae: *Acantosthachys* como modelo de estudo

Estudos com espécies que possuem mecanismos de tolerância à seca prolongada e adaptação e sobrevivência frente às mudanças climáticas são importantes para a identificação de estratégias adaptativas em plantas. As espécies da família Bromeliaceae, comumente conhecidas como bromélias, são consideradas boas indicadoras biológicas, primeiramente afetadas pela degradação ambiental e contribuem para a ciclagem de nutrientes e manutenção da biodiversidade, em função de sua interação com pequenos invertebrados, como formigas, cupins e besouros, até anfíbios, lagartos, serpentes e aves, criando uma rede de interações entre esses grupos (Benzing *et al.*, 2000, 2012; Müller *et al.* 2019).

A família Bromeliaceae possui 82 gêneros, com aproximadamente 3751 espécies (Gouda *et al.* 2023), que estão distribuídas por toda a América tropical e subtropical, com centro de diversidade na Mata Atlântica no sudeste do Brasil, ocupando habitats terrestres, litofíticos e epifíticos (Givnish *et al.* 2011; Jacques-Félix, 2000; Versieux *et al.* 2020). Para o Brasil são descritas 1387 espécies, distribuídas em 56 gêneros, sendo que 1.187 destas são endêmicas (Krahl *et al.*, 2013). Em uma compilação de dados globais de caracteres morfofisiológicos funcionais de epifitismo, Hietz *et al.* (2022) descreveram Bromeliaceae como a segunda maior família em número de espécies epífitas, atrás apenas de Orchidaceae, com 1.958 espécies apresentando esse hábito.

As espécies de hábito epifítico ocupam nichos ecológicos restritos, em função de sua ocorrência na interface entre vegetação e atmosfera. A disponibilidade de água pode

ser fonte de estresse, principalmente em períodos de escassez de chuvas, portanto, as mudanças climáticas podem potencialmente alterar a diversidade de bromélias epífitas (Benzing *et al.*, 2000; Zotz, 2013, 2016). Muitas epífitas vasculares são intolerantes à seca, sendo drasticamente afetadas quando expostas a períodos prolongados de baixa disponibilidade hídrica (Bartels & Chen, 2012). No entanto, algumas espécies epífitas se destacam por tolerar o déficit hídrico, tendo desenvolvido diferentes mecanismos de obtenção e eficiência no uso da água, pois são altamente dependentes da disponibilidade de água na forma de chuva, nevoeiro ou orvalho (Wagner & Zoltz, 2018). Diferentes combinações de via fotossintética (C₃ e/ou CAM), presença ou ausência de tanque, tricomas absortivos e suculência foliar, podem ser observados em bromélias, ampliando a capacidade de adaptação de espécies dessa família aos mais diversos ambientes (Ohrui *et al.* 2007; Crayn *et al.* 2015; Males & Griffiths, 2017^b), dentre eles o epifítico.

O gênero *Acanthostachys* tem seu nome derivado de ‘*akanthos*’, espinho e ‘*stachys*’, espiga; pelas folhas espinhosas e pela arquitetura das inflorescências. O gênero pertence à subfamília Bromelioide (Eggli, 2020). Análises filogenéticas da família Bromeliaceae, baseadas em caracteres estruturais e marcadores nucleares e plastidiais, incluem geralmente *Acanthostachys strobilacea* como representante do gênero, sendo que a posição filogenética de *Acanthostachys*, que é descrito como grupo irmão das Eubromelioides em árvores consenso, permanece incerta (Schulte *et al.* 2009). Evans *et al.* (2015) não puderam confirmar a monofilia do gênero por falta de resolução, e suas espécies são mostradas em uma extensa politomia em seu clado Eubromelioide.

Smith & Downs (1979) reconheceram inicialmente apenas uma espécie para o gênero, *Acanthostachys strobilacea* (Schult. & Schult.f.) Klotzsch. A segunda, *A. pitcairnioides* (Mez) Rauh & Barthlott, foi tratada anteriormente no subgênero *Aechmea* (Smith & Downs, 1979) e posteriormente transferida para *Acanthostachys* por Rauh e Barthelott (1983). É endêmica do Brasil e ocorre em áreas de Mata Atlântica no nordeste da Bahia e sudeste do Espírito Santo (Forzza *et al.* 2012). *A. calcicola* Marcusso & Lombardi foi descrita recentemente, tendo sido identificada em região de Cerrado do Tocantins (Marcusso *et al.* 2020). As duas primeiras espécies podem apresentar o hábito epifítico ou saxícola, enquanto *A. calcicola* foi identificada somente com o hábito saxícola até o momento. A maioria das sinapomorfias que definem o clado *Acanthostachys* são características reprodutivas. As inflorescências condensadas, sésseis ou longas, e os frutos agregados em uma infrutescência em forma de cone, são diagnósticos (Eggli, 2020).

A. strobilacea já vem sendo estudada quanto à sua tolerância ao déficit hídrico, sobretudo indivíduos jovens. Plantas adultas dessa espécie suportam condições adversas devido à presença de adaptações à seca como suculência (Eggli, 2020) e tricomas foliares absortivos (Derwidueé & Gonzalez, 2010). A presença do metabolismo CAM foi descrita para a espécie por meio de análises de isotopia (Crayn *et al.* 2015). Estudos com plantas jovens da espécie mostram um acúmulo de ácidos no período noturno, com significativo incremento em situação de déficit hídrico, que sugerem a existência de CAM (Menezes *et al.*, 2020). Embora plantas jovens de *A. strobilacea* não tenham a mesma suculência e os tricomas ainda não estejam formados, elas possuem um considerável grau de resistência à seca em função de ajustes metabólicos rápidos, que incluem mobilização de amido, acúmulo de carboidratos solúveis, ativação do sistema antioxidante e modulação do teor de ácido abscísico (Menezes *et al.* 2020; Carvalho *et al.* 2021b).

A. strobilacea e *A. pitcairnioides* tiveram seus genomas recentemente sequenciados com o uso de 3 tecnologias de sequenciamento distintas (Santos & Gaspar, dados não publicados). Análises de citogenética mostram que o genoma diploide dessas duas espécies está organizado em 50 cromossomos, sendo que o tamanho médio do genoma diploide foi estimado em aproximadamente 350 Mb por citometria de fluxo. Após finalização da montagem primária e completude dos genomas, *A. strobilacea* e *A. pitcairnioides* apresentaram tamanhos genômicos próximos de 317 e 352 Mb, respectivamente, próximos ao do abacaxi, com 382 Mb (Ming *et al.* 2015).



Figura 3: Plantas de *Acanthostachys pitcairnioides* em cultivo no Laboratório de Ecofisiologia e Bioquímica do Instituto de Pesquisas Ambientais. A. Plantas adultas; B. Planta adulta; C. Detalhe da flor; D. Detalhe dos frutos; E. Sementes.

1.3. Metabolismo ácido das crassuláceas

O metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) é frequentemente associado a espécies adaptadas a ambientes secos, sendo relacionado também à maior eficiência de uso de água e CO_2 (Crayn *et al.* 2015). Considera-se que o CAM é um evento recente na evolução e que a fotossíntese C_3 é ancestral às fotossínteses C_4 e CAM. Em Bromeliaceae, a evolução do CAM está relacionada com a evolução do epifitismo. Embora o CAM seja muito eficiente na adaptação a estresses associados ao epifitismo, tanto o CAM quanto o epifitismo evoluíram independentemente várias vezes nas três subfamílias de Bromeliaceae (Luttge, 2003).

O CAM, ao longo de seu ciclo, pode ser dividido em quatro fases: (I) período escuro, onde a condutância estomática é mais alta, ocorre degradação glicolítica de carboidratos armazenados e formação do aceitador de CO_2 (fosfoenolpiruvato, PEP), assim como assimilação do CO_2 atmosférico pela fosfoenolpiruvato carboxilase

(PEPC), levando à síntese e armazenamento no vacúolo do ácido málico; (II) próximo ao amanhecer, pode ocorrer um pico na condutância estomática além de fixação de CO_2 diretamente pela Rubisco; (III) durante o período luminoso, os estômatos permanecem fechados, o ácido málico acumulado no vacúolo durante o período noturno é liberado no citosol. Após descarboxilação do malato, o CO_2 liberado é assimilado via Rubisco. Ocorre redução e regeneração dos carboidratos de armazenamento em compostos de 3 carbonos (piruvato ou PEP); (IV) ao entardecer, os estômatos podem ser abertos, para uma fixação direta de CO_2 pela Rubisco, caso as condições ambientais sejam favoráveis (Figura 4). Entretanto esses padrões podem sofrer variações individuais, intraespecíficas e interespecíficas (Males & Griffiths, 2017^b).

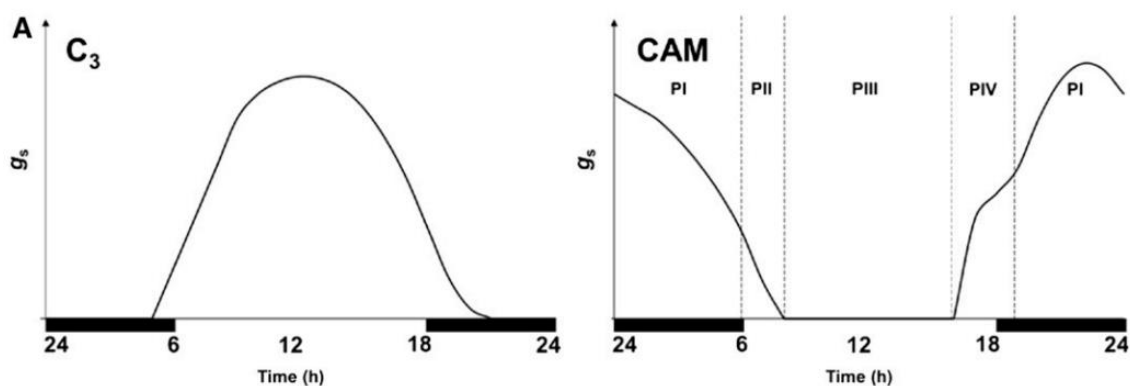


Figura 4: Diferenças no padrão de abertura e fechamento estomático de plantas C₃ e CAM. Curvas de condutância estomática (g_s) em um período de 24 horas, sendo 12 horas de escuro (noite) e 12 horas de luz (dia). As fases de troca gasosa de plantas CAM são exibidas (Fases I-IV; Osmond, 1978) (Males & Griffiths, 2017^a).

Ao analisar o metabolismo CAM, é possível identificar ao menos três tipos principais: CAM clássico, CAM *cycling* e CAM *idling*. O CAM clássico corresponde ao padrão acima descrito. O CAM *cycling* apresenta padrão de abertura estomática similar ao observado em plantas C₃, entretanto, taxas ligeiramente elevadas de fixação de CO_2 no período escuro resultam em acúmulo de ácidos orgânicos, mas a fixação noturna de CO_2 não é suficiente para compensar a perda respiratória de CO_2 . Já no CAM *idling* as trocas gasosas com a atmosfera são praticamente inexistentes e o metabolismo se mantém utilizando o CO_2 respiratório como fonte de carbono. Esse metabolismo CAM

costuma ocorrer em plantas de ambientes extremamente áridos (Winter & Holtum, 2002; Matiz *et al.* 2013; Tay *et al.* 2021).

A fotossíntese CAM pode ser facultativa, ou seja, reversível e induzida pelas condições ambientais, ou obrigatória. O metabolismo CAM pode ser induzido e desligado inúmeras vezes durante o ciclo de vida da planta, em função do chamado contínuo C₃-CAM: C₃, CAM cycling, CAM fraco, CAM idling e CAM forte (Bräutigam *et al.* 2017). Segundo Bräutigam *et al.* (2017), os requisitos para CAM estão todos presentes em plantas C₃ no ciclo diurno e só precisam ser aperfeiçoados para que ocorra absorção noturna de CO₂, flutuações diurnas de ácidos orgânicos, expressão aumentada de PEPC e enzimas málicas, fluxo aumentado através de vias glicolíticas e gliconeogênicas e vacúolo de armazenamento.

A relação entre CAM e anatomia foliar de suculentas tem sido estabelecida por diversos estudos. Entre as adaptações teciduais é possível observar lacunas de ar, que atravessam o mesofilo e se alternam com os feixes vasculares. Entre as funções das lacunas destacam-se o transporte de água em fase gasosa, principalmente em bromélias sem tanque, e a circulação de gases no interior da lâmina foliar, que confere também mais flexibilidade (Tomlinson, 1969), além de proporcionar maior evapotranspiração, favorecendo a fotossíntese (Brighigna *et al.* 1984). As lacunas de ar são observadas com maior frequência em espécies que possuem folhas finas, enquanto as folhas com maior suculência tendem a ter poucas ou nenhuma lacuna de ar (Tomlinson, 1969). As lacunas de ar atuam também na transferência de água por capilaridade, das raízes para as folhas, visando o armazenamento no parênquima aquífero (Krahl *et al.* 2013).

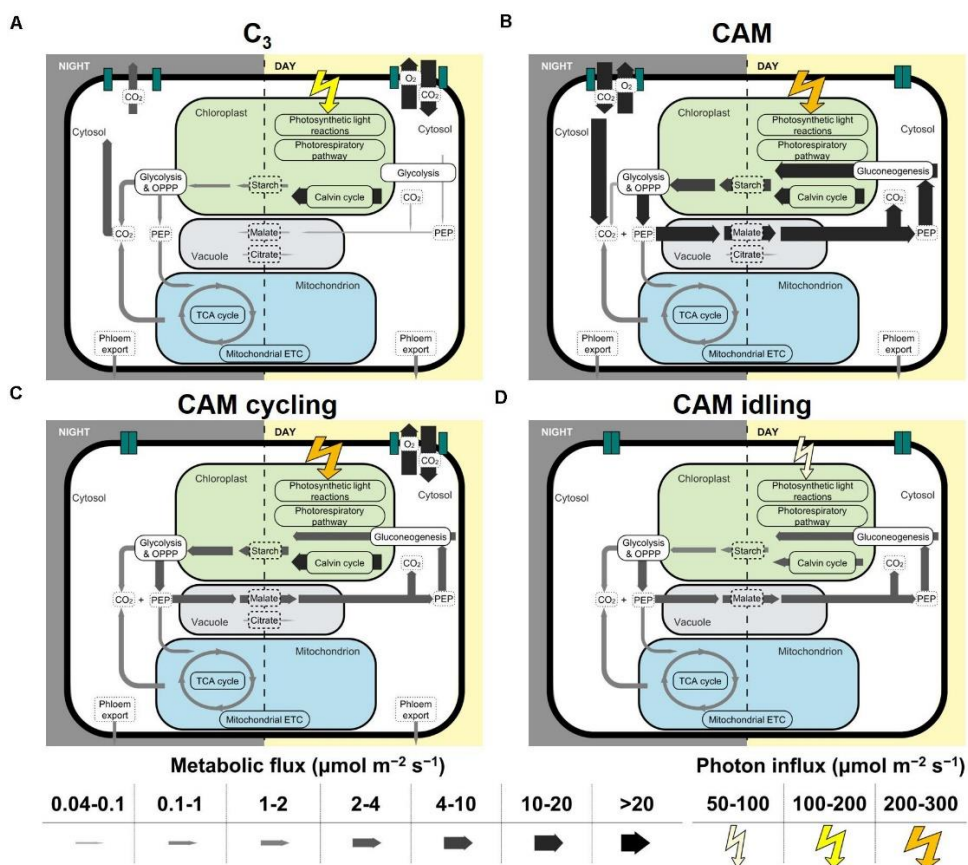


Figura 5: Fluxos metabólicos nos quatro modos de fotossíntese: (A) C₃, (B) CAM, (C) CAM cycling e (D) CAM idling. A largura das setas representa a magnitude do fluxo de reação de acordo com a escala na parte inferior da figura em $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A via fotorrespiratória é mostrada no cloroplasto visando simplificar, sendo que na realidade abrange vários compartimentos. O fluxo de 3-fosfoglicerato para PEP foi considerado como o fluxo para glicólise e gliconeogênese. O fluxo para a succinato desidrogenase foi considerado como o fluxo do ciclo do TCA. Observa-se que apenas o modo cíclico do ciclo TCA foi representado. O fluxo de RuBisCO carboxilase foi considerado como o fluxo através do ciclo de Calvin-Benson (Tay, *et al.*, 2021).

O parênquima aquífero é constituído por células alongadas, aclorofiladas e de paredes delgadas, geralmente disposto na face adaxial das folhas de bromélias. Tem por função armazenar água, que é translocada para outros tecidos em situação de baixa disponibilidade hídrica, a fim de minimizar os impactos do estresse (Krahl *et al.* 2013). A diferenciação entre o parênquima aquífero e o clorofiliano varia de uma espécie a outra e é considerada um indicio de metabolismo CAM (Krahl *et al.* 2013). Este modelo de suculência com diferenciação tecidual foi associado à tolerância à seca, mais do que à sua evitação, uma vez que o parênquima aquífero transfere a água para o parênquima clorofiliano quando ocorre diminuição do potencial hídrico (Benzing *et al.* 2000; Martin *et al.* 2004).

Os vasos condutores de Bromeliaceae estão geralmente imersos no clorênquima e as fibras extra-vasculares são ausentes. Somado a isto têm-se a formação de uma

bainha parenquimática de baixa permeabilidade, restringindo as trocas de água. Deste modo, é esperado que as bromélias apresentem baixa condutância hidráulica em suas folhas (Tomlinson, 1969; Carlquist, 1975; Males & Griffiths, 2017).

Grupos de fibras extravasculares são uma característica comum a diversas espécies de Bromelioideae. Pereira *et al.* (2011) sugerem que esta característica não se trata de uma adaptação significativa ao hábito, corroborando com estudos anteriores de Proença & Sajo (2007). Estes estudos ainda demonstram a presença de bainha de células de parede espessas ao redor dos deixes, podendo ser lignificada ou não.

Células da epiderme com espessura uniforme ao longo de toda a parede e lume grande são raros em Bromeliaceae. Os estômatos raramente são superficiais, embora isso tenha sido observado em espécies de ambientes xéricos (Arruda & Costa, 2003). A posição dos estômatos parece estar mais relacionada com a filogenia do grupo do que com o ambiente de ocorrência da espécie (Monteiro *et al.* 2011). Muitas espécies de Bromeliaceae apresentam tricomas especializados que cobrem a lâmina e a bainha foliar, e que são comumente associados à absorção de água e nutrientes (Benzing *et al.*, 2000). Schulte *et al.* (2009) sugeriram que os tricomas absorventes podem ter surgido mais de uma vez durante a história evolutiva de Bromeliaceae. Da mesma forma, a presença de epiderme esclerificada parece ser uma característica adquirida e perdida em diversos clados independentemente e que não obrigatoriamente está relacionada com a disponibilidade de água, tendo em vista que tanto espécies de ambientes úmidos quanto de ambientes xéricos apresentam essa característica (Monteiro *et al.* 2011).

Embora algumas características anatômicas sejam indicativas do CAM, apenas em conjunto com análises de parâmetros fisiológicos e bioquímicos específicos é possível identificar o metabolismo fotossintético da espécie. A análise por isotopia de carbono determina deltas de carbono 13 ($\delta^{13}\text{C}$) característicos dos diferentes metabolismos fotossintéticos. As plantas CAM e C4 apresentam valores de $\delta^{13}\text{C}$ menos negativos do que as plantas C3. Normalmente, as plantas C3 apresentam valores de $\delta^{13}\text{C}$ na faixa de -23‰ a -31‰, enquanto as plantas CAM ou C4 mostram valores na faixa de -20‰ a -9‰. A distribuição do metabolismo fotossintético em Bromeliaceae foi estimada pelos valores de $\delta^{13}\text{C}$ para 1893 espécies (Crayn *et al.*, 2015). Destas, 43% (819) apresentaram metabolismo CAM, com valores de $\delta^{13}\text{C}$ menos negativos do que -20‰, sendo que *A. strobilacea* foi considerada CAM ($\delta^{13}\text{C}$ -16‰) e *A. pitcairnioides* C₃ ($\delta^{13}\text{C}$ -26‰) (Crayn *et al.* 2015).

O acúmulo e remobilização de ácido málico ao longo de um ciclo de 24 h é indicativo de CAM. A magnitude do acúmulo noturno de malato pode diferir mais de 100 vezes entre as espécies (Cushman & Borland, 2002). Algumas espécies acumulam citrato além de malato, sendo que a proporção entre citrato e malato acumulados durante o período noturno depende de vários fatores, como a disponibilidade de água, intensidade luminosa e alternância de temperaturas diurna e noturna. Os ácidos orgânicos acumulados no vacúolo, além de estoque de carbono, também atuam como mecanismo de ajuste osmótico em situação de seca (Cushman & Borland, 2002).

O acúmulo de transcritos e/ou aumento da atividade das enzimas do CAM, PEPC, malato desidrogenase (MDH) e fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), associados ao acúmulo de ácidos orgânicos, são indicadores bioquímicos do CAM (Mioto *et al.* 2015). A maioria dos estudos avaliou a enzima PEPC, tendo em vista que ela é a enzima mais abundante do CAM e desempenha importante papel regulador dos padrões circadianos de fixação de CO₂, levando à síntese de malato (Nimmo, 2000). No entanto, todos esses parâmetros podem ser modulados em situações de estresse ambiental, incluindo imposição de seca, permitindo a transição do metabolismo C₃ para o CAM ou a indução/intensificação do CAM, conforme observado para diversas espécies estudadas.

1.4. Mecanismos de tolerância à seca

O déficit hídrico nas plantas também pode ocorrer em ambientes em que a água não é limitante (Bray *et al.* 2000), caso das epífitas da Mata Atlântica, que dependem da disponibilidade de água na atmosfera, na forma de chuva, nevoeiro ou orvalho. A adaptação à seca depende da intensidade do déficit hídrico e diversas estratégias podem ser observadas em plantas vasculares de diferentes famílias. Classicamente, as estratégias de resistência das plantas à seca foram classificadas como escape, evitação e tolerância (Levitt, 1972; Turner, 1986). No entanto, essas estratégias não são mutuamente exclusivas e as plantas podem combinar uma variedade de tipos de resposta (Ludlow, 1989).

Plantas que escapam à seca apresentam alto grau de plasticidade de desenvolvimento, sendo capazes de completar seu ciclo de vida antes que ocorra o déficit hídrico. Em espécies tolerantes à seca, o foco está em limitar os danos induzidos pela seca, enquanto, em espécies que evitam a seca, o foco está em evitar déficits de

água nos tecidos (Kramp *et al.* 2022). Algumas estratégias adaptativas para evitar a perda de água são a presença de sistema radicular profundo e ramificado, alterações estomáticas (maior densidade, estômatos menores localizados na superfície abaxial da folha e geralmente protegidos por tricomas ou criptas), enrolamento foliar, cutícula e camada de cera epicuticular espessas, lignificação dos tecidos, entre outros (Bacelar *et al.* 2012).

Dentre as adaptações que permitem que a planta suporte o estresse, com ou sem redução no desempenho, o ajuste osmótico, que se dá por aumento na concentração de diversos solutos, incluindo açúcares, ácidos orgânicos e íons, especialmente K^+ , é considerado um importante mecanismo de tolerância à seca (Bacelar *et al.* 2012). O ajuste osmótico mantém a absorção de água e o turgor celular, sendo considerado um mecanismo-chave para manutenção das taxas fotossintéticas e expansão do crescimento em condições de seca. O aumento da concentração de solutos no simplasto da célula, como consequência do ajuste osmótico, resulta na manutenção da pressão de turgor à medida que o potencial hídrico se torna mais negativo. Apesar do estresse hídrico imposto, o turgor é mantido se o ajuste osmótico puder manter o teor relativo de água (TRA) com uma redução no potencial osmótico (Ψ_s) (Sanders & Arndt, 2012).

Freschi *et al.* (2010) observou a existência de um gradiente estrutural ao longo da lâmina foliar da bromélia sem tanque *Guzmania monostachia*, onde diferentes porções foliares podem desempenhar papéis distintos, a depender de variações significativas de seu habitat. Foi demonstrada uma relação inversa entre a densidade dos estômatos e dos tricomas ao longo da lâmina foliar de modo que as seções basais apresentaram duas vezes mais tricomas absortivos que as porções medianas e apicais. O parênquima aquífero apresentou maior espessura na região basal e suas células eram significativamente maiores quando comparadas as outras seções foliares. Já o parênquima clorofiliano manteve certa uniformidade ao longo de todas as porções foliares, entretanto, o conteúdo de clorofilas e carotenoides variou de maneira acentuada ao longo da lâmina, tendo a base apresentado o valor menor de relação Chl a/b.

Em levantamento visando analisar caracteres de tolerância à seca para 376 espécies de bromélias, dos diferentes tipos funcionais (CAM epífita com tanque, CAM terrestre, CAM epífita atmosférica, C_3 terrestre e C_3 epífita com tanque), de ocorrência em ambientes naturais ou cultivadas em casa de vegetação, Males & Griffiths (2017)^a observaram que o Ψ_s variou de -0,29 MPa a -0,82 MPa. Apesar da natureza tolerante à seca de muitas epífitas, especialmente bromélias, vários estudos indicam que os Ψ_s se

mantêm relativamente altos e que, mesmo em situação de seca, são geralmente menos negativos que -1,0 MPa (Smith & Lüttge, 1985; Smith *et al.* 1986; Martin, 1994; Nowak & Martin, 1997). Ao acrescentar aos trabalhos anteriores a amostragem de Ψ_s de 30 espécies epífitas (licófitas, samambaias e orquídeas), Martin *et al.* (2004) confirmaram a premissa de Ψ_s elevados para epífitas em geral, com valores que variaram de -0,52 a -1,49 MPa, com valor médio de -0,96 MPa.

A fotossíntese é um complexo processo fisiológico que envolve vários componentes, incluindo pigmentos fotossintéticos, e seus mecanismos são severamente afetados pelos estresses ambientais. Tendo em vista que o déficit hídrico afeta o funcionamento do fotossistema II (PSII) direta ou indiretamente, as variáveis de medições da fluorescência da clorofila, associadas aos teores de pigmentos fotossintéticos, são consideradas bons indicadores do desempenho fotossintético da planta em situação de estresse. O rendimento quântico máximo do PSII corresponde ao parâmetro F_v/F_m . Plantas com seu aparelho fotossintético intacto apresentam a razão F_v/F_m entre 0,75 e 0,85, enquanto queda nesta razão indica dano fotoinibitório nos centros de reação do PSII. O quenching fotoquímico (qP) indica a proporção dos centros de reação do PSII que estão abertos, enquanto o quenching não-fotoquímico (NPQ) refere-se ao nível de fluorescência máxima (F_m) no qual a eficiência fotoquímica está no máximo e a dissipação térmica está no mínimo. A taxa de transporte de elétrons (ETR) indica a capacidade da planta em proteger o PSII de danos oxidativos (Cavender-Bares & Bazzaz, 2004; Silva *et al.* 2006).

Estudos de efeito da seca em espécies CAM de diferentes famílias, mostraram a capacidade em manter F_v/F_m praticamente inalterado, assim como o teor de clorofila, em situação de déficit hídrico induzida por diferentes regimes de rega (Herrera *et al.* 2000; Ceusters *et al.* 2019). Plantas da bromélia com tanque *Guzmania monostachia* induzidas ao CAM após 20 dias de suspensão de rega, apresentaram redução no teor de ácidos orgânicos e no NPQ concomitante a um aumento na atividade de descarboxilação e no qP. Apesar da diminuição no TRA e no F_v/F_m , não foram observados danos severos, pois as plantas conseguiram se recuperar após sete dias de reidratação (Pikart *et al.* 2020). Com a restrição da disponibilidade de CO_2 , em função do fechamento estomático, as folhas da orquídea *Phalaenopsis* “Edessa.”, espécie CAM constitutiva, mostraram maior dissipação de energia e inativação parcial dos centros de reação do PSII para reduzir a entrada de energia na cadeia de transporte de elétrons e evitar danos foto-oxidativos (Ceusters *et al.* 2019). Os autores sugerem uma flexibilidade única das

plantas CAM para otimizar as reações de luz sob diferentes condições ambientais, atenuando ou aumentando o fluxo de energia.

Compreender padrões específicos de resposta à seca de uma espécie, individualmente, pode auxiliar na predição de respostas em nível de população, bem como na definição das estratégias de resistência à seca, permitindo o desenvolvimento de modelagens para determinados grupos funcionais ou regiões. Em particular, *A. pitcairnioides* é uma bromélia epífita que cresce na superfície de rochas ou árvores e que, em seu ambiente natural, pode experimentar diferentes níveis de déficit hídrico devido a fatores complexos, como seca atmosférica ou baixa de umidade em períodos de precipitação intermitente. *A. pitcairnioides*, foi considerada "Vulnerável" (VU) na Lista vermelha da Flora do Espírito Santo (Simonelli & Fraga, 2007). e "Deficiente de dados" (DD) na Lista Vermelha do CNCFlora (CNCFlora, 2012). O entendimento dos mecanismos de tolerância de *A. pitcairnioides* ao estresse hídrico pode auxiliar na predição do impacto das mudanças climáticas na distribuição dessa espécie em seu ambiente nativo. Além disso, o estudo das respostas morfofisiológicas e metabólicas de adaptação de *A. pitcairnioides* à seca, em associação com os dados moleculares disponíveis, pode levar à identificação futura de elementos regulatórios, genes e vias envolvidas nas respostas de tolerância, com potencial de assistir estratégias biotecnológicas para o melhoramento de plantas cultivadas.

2. Objetivos

2.1. Gerais

Este trabalho teve por objetivos estudar as respostas morfológicas, fisiológicas e metabólicas de *Acanthostachys pitcairnioides* à seca, assim como as respostas de recuperação da espécie após a reidratação.

2.2. Específicos

- Analisar as relações hídricas, respostas fotossintéticas e alterações anatômicas foliares durante o processo de déficit hídrico e reidratação;
- Determinar as alterações metabólicas relacionadas à tolerância da espécie à seca e ao metabolismo CAM.

3. Materiais e Métodos

3.1. Material vegetal e condições experimentais

Plantas de *Acanthostachys pitcairnioides* com 1,5 anos de idade, foram mantidas na casa de vegetação do laboratório de Ecofisiologia e Bioquímica do Instituto de Pesquisas Ambientais, São Paulo. O experimento contou com 14 vasos, contendo uma planta cada e distribuídos em dois grupos que foram submetidos a dois tratamentos hídricos distintos: plantas com regas em dias alternados (controle - C) e plantas com rega suspensa por 42 dias (S) e posteriormente reidratadas (R).

A coleta de plantas controle e tratadas foram realizadas durante o período de seca nos dias 0, 14, 28 e 42 dias e em 96h (4 dias) após a reidratação, sempre pela manhã. As 3ª e 4ª folhas de maior comprimento e totalmente expandidas de cada vaso foram coletadas

Parte das amostras foliares foi armazenada a -80°C e posteriormente maceradas em nitrogênio líquido para análises bioquímicas e moleculares. Parte foi colocada em água destilada, para a estimativa do peso túrgido e o terço médio foi colocado diretamente em fixador FAA 50 ou etanol 100% para análises anatômicas.

Para as medidas de delta de acidez titulável, foi realizado novo experimento, no qual o tratamento se deu de forma similar ao descrito acima. No entanto, o período de imposição de seca foi de 28 dias, com coletas realizadas em três períodos do dia: 7:30 h, 14:30 h e 21:30 h. As folhas foram coletadas e maceradas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para as análises de CAM.

3.2. Teor relativo de umidade do solo

O teor de umidade do solo foi medido em amostras hidratadas até a capacidade de campo para o tratamento controle, e durante o processo de desidratação e reidratação para o tratamento de seca. O método utilizado para coleta de dados foi o de reflectometria no domínio do tempo (TDR), onde uma sonda de umidade do solo Delta-T Devices (ThetaProbe, ML2X) foi posicionada em três pontos equidistantes de cada um dos vasos em ambos os tratamentos. Os valores em porcentagem foram obtidos por um registrador de dados de umidade (HH2) e a média simples de cada vaso foi calculada.

3.3. Teor relativo de água (TRA)

Para determinar o teor relativo de água, secções foliares foram pesadas imediatamente após a coleta para a obtenção do peso fresco da folha (PF), logo após, as mesmas secções foram imersas em água destilada por 24 h e pesadas em seguida para a obtenção do peso turgido da folha (PT). Estas secções foram então colocadas em estufa a 60°C por 72 h e então pesadas a fim de se obter o peso seco (PS). Foi utilizado o cálculo descrito por Weatherley (1950) que se dá pela seguinte equação:

$$TRA(\%) = \frac{(PF - PS)}{(PT - PS)} \times 100$$

3.4. Potencial osmótico (Ψ_s)

O potencial osmótico foi analisado em todos os pontos de coleta em ambos os tratamentos. As amostras foram maceradas para obtenção do suco celular em seringas BD plastipak® (3 mL) e centrifugadas a 11000 rpm por 10 minutos. Alíquotas de 10 µL do sobrenadante foram submetidas à leitura em osmômetro de pressão de vapor (VAPRO 5520, Wescor).

3.5. Fluorescências de clorofila a

Medidas instantâneas da máxima eficiência quântica do fotossistema II (F_v/F_m), taxa de transporte de elétrons (ETR), *quenching* fotoquímico (qP) e *quenching* não fotoquímico (NPQ) foram realizadas em folhas adaptadas ao escuro por 1 h usando um fluorômetro modulado portátil (OS5p Opti-Sciences). As medidas foram feitas na terceira folha de maior tamanho por meio da emissão de pulso de luz de 1 µmol m⁻² s⁻¹ para obtenção da fluorescência inicial (F_0), seguido por um pulso de luz saturante de 2000 µmol m⁻² s⁻¹ para a emissão de fluorescência máxima (F_m) utilizando o comprimento de onda de 650 nm. A máxima eficiência fotoquímica do PSII foi obtida por meio da fórmula (Scheiber *et al.*, 1994):

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{(F_m - F_0)}{F_m}$$

3.6. Pigmentos fotossintéticos

Para a extração e quantificação de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides foi utilizado o método descrito por Hodgins & Van Huystee (1986). Os fragmentos foliares foram triturados em nitrogênio líquido na ausência de luz. À uma alíquota de 50 mg de material vegetal, foram adicionados 2 mL de acetona a 80% (v/v). As amostras foram misturadas em vórtex, mantidas sob agitação em gelo por 10 minutos e centrifugadas a 1900 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e analisado em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 470nm para carotenoides totais, 646nm para clorofila *b* e 663nm para clorofila *a*.

Para obtenção da concentração de pigmentos foram utilizadas as equações de Wellburn & Lichtenthaler (1983) juntamente com os valores de absorbância (Abs), como descrito a seguir:

Clorofila *a* ($\mu\text{mol g}^{-1}$):

$$C_a = (12,21 \times Abs_{663}) - (2,81 \times Abs_{646})$$

Clorofila *b* ($\mu\text{mol g}^{-1}$):

$$C_b = (20,13 \times Abs_{646}) - (5,03 \times Abs_{663})$$

Carotenoides ($\mu\text{mol g}^{-1}$):

$$C_{x+c} = \frac{(1000 \times Abs_{470}) - (3,27 \times C_a) - (104 \times C_b)}{227}$$

3.7. Acidez titulável

Foi utilizado 50 mg de material vegetal triturado em N₂ líquido, em seguida, 1,5 mL de água ultrapura fervida foi adicionada a cada amostra. Estas foram mantidas em banho-maria por 15 minutos a 100°C e centrifugadas à temperatura ambiente por 15 minutos a 11000 rpm. O sobrenadante foi transferido para tubos Falcon de 15 mL e foi adicionada água ultrapura fervida até que atingisse o volume de 10 mL. Após o resfriamento das amostras, 10 μL de fenolftaleína 2% foram adicionados a cada amostra e estas foram homogeneizadas por leve agitação. Posteriormente, as amostras foram transferidas para béquer, mantidas em agitador magnético e adicionado NaOH (0,02

mol/L) até que a coloração da solução se tornasse rosa (pH entre 8,9 e 9,0) (Freschi *et al.*, 2010).

3.8. Análise de perfil metabólico

As amostras foram trituradas em nitrogênio líquido e alíquotas de 100 mg foram submetidas à extração e derivatização de acordo com Lisec *et al.* (2006). Em cinco amostras de cada tratamento foram adicionados 1,4 mL de metanol 100% e agitadas em vórtex por 10 s. Em seguida foram adicionados 60 µL de Adonitol padrão interno polar (0,2mg/mL). As amostras foram então agitadas por 10 min a 950 rpm e 70°C em termomixer e em seguida centrifugadas a 11000 rpm por 10 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para tubos de 5 mL com tampa de rosca e a ele foi adicionado 0,75 mL de clorofórmio gelado e 1,5 mL de água ultrapura (MilliQ®). Os extratos foram agitados em vórtex e centrifugados por 15 min a 4400 rpm. Uma alíquota de 150 µL do sobrenadante foi transferida para tubos Eppendorf e submetida a secagem em concentrador a vácuo, sem aquecimento, por cerca de 4h.

Para a derivatização, foram adicionados 40 µL de piridina às amostras secas e estas foram agitadas em vórtex por 10 s e incubadas em termomixer a 37°C por 2 h sob agitação constante e depois centrifugadas por 10 min a 11000 rpm. Em seguida foram adicionados 70 µL de MSTFA (N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide) e as amostras foram mais uma vez agitadas em vórtex e incubadas em termomixer a 37°C por 30 min, centrifugadas a 11000 rpm por 10 min e transferidas para *vials* com *inserts* adequados para análise via cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). As amostras derivatizadas foram injetadas em cromatógrafo a gás (HP-6890, Agilent Technologies®) acoplado a um detector de massas (HP-5973, Agilent Technologies®). Os compostos obtidos e suas concentrações foram analisados com o software MassHunter ChemStation v. B.06.00 (Agilent Technologies®) sendo identificados por comparação com a NIST Mass Spectral Library (2011).

3.9. Anatomia foliar

Para as análises anatômicas, amostras da região mediana da folha de 3 indivíduos de cada tratamento foram coletadas e fixadas em FAA (formaldeído - ácido acético glacial - etanol 50%, 1:1:18 v/v) (Johansen, 1940) e conservadas em etanol 70%.

Já as amostras das plantas submetidas a seca de 42 dias foram fixadas em etanol 100% a fim de evitar possível hidratação.

Posteriormente, as amostras armazenadas em etanol 70% foram desidratadas em série etanólica ascendente e, assim como as amostras fixadas em etanol 100%, foram incluídas em historresina (monômero de glicolmetacrilato) e seccionadas transversalmente a 7µm de espessura em micrótomo rotatório Leica RM2245[®] com navalha descartável. Os cortes obtidos foram corados com azul de toluidina 0,05% (Sakai, 1973) em tampão fosfato-citrato (McIlvaine, 1921) e as lâminas permanentes foram montadas em resina sintética (Entelan[®]).

Testes histoquímicos foram realizados em cortes de material fresco, seccionados à mão com auxílio de lâmina de barbear, para a identificação de lignina com floroglucina (Johansen, 1940), substâncias lipofílicas com Sudan IV (Miller, 1968) e substâncias pécicas e mucilagem com vermelho de rutênio (Chamberlain, 1932).

Para a análise da epiderme foliar em vista frontal, foi realizada a impressão de epiderme com adesivo instantâneo (éster de cianoacrilato) (Segatto *et al*, 2004) e, também, a dissociação de epiderme com peróxido de hidrogênio e ácido acético e posterior coloração com safranina 1% em etanol 50% (Franklin, 1945) e montagem em gelatina glicerínada (Kaiser, 1880).

O registro das imagens foi realizado com câmera digital (Olympus SC100[®]) acoplado ao microscópio de luz (Olympus BX41[®]), utilizando o programa de digitalização de imagens Olympus cellSens Standard v.3.2.

3.10. Análise estatística

O déficit hídrico foi considerado um fator (variável independente) e as respostas fisiológicas, bioquímicas e metabólicas, variáveis dependentes. Delineamento inteiramente casualizado foi utilizado, e todos os dados foram submetidos a One-way ANOVA ($p < 0,05$) e comparados pelo teste de Tukey, utilizando o pacote estatístico BioEstat (versão 5.3). A matriz de dados metabólicos foi submetida à análise de mapa de calor de agrupamento hierárquico, análise de componentes principais (PCA) e análise de enriquecimento utilizando o software MetaboAnalyst 5.0.

4. Resultados

4.1. Caracterização da seca

A desidratação resultou em mudanças no aspecto das plantas ao longo do tempo (Figura 6). É possível visualizar a perda do turgor e a aparência de folhas murchas a partir do 28º dia de seca (Figura 6c). Com o esgotamento da água no solo e o progresso da seca aos 42 dias, é possível notar o enrolamento discreto das bordas foliares em direção a nervura principal, como também uma coloração avermelhada nas folhas, indicando acúmulo de antocianinas (Figura 6 d, e).



Figura 6: Aspecto das plantas de *A. pitcairnioides* onde: (a) controle, com rega em dias alternados. (b) 14 dias de déficit hídrico. (c) 28 dias de déficit hídrico. (d) 42 dias de déficit hídrico. (e) comparação entre plantas controle (C) à esquerda e déficit hídrico (S) à direita (42 dias).

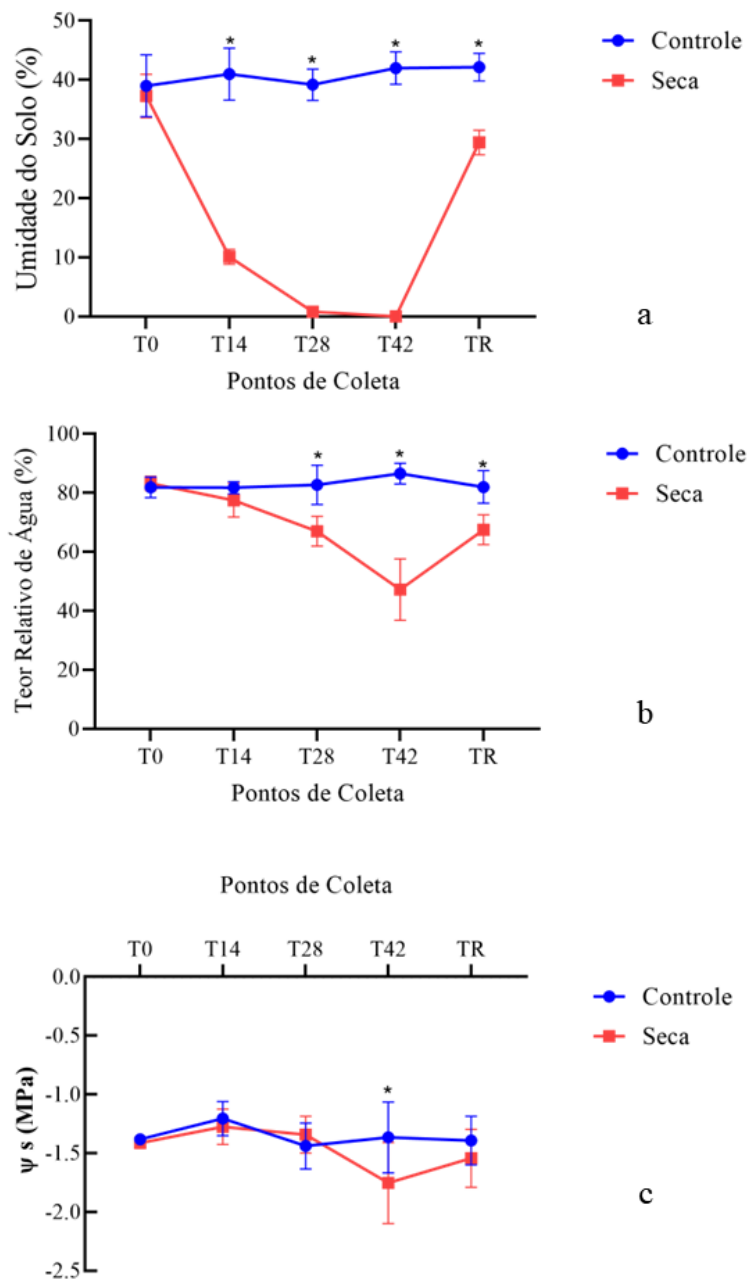


Figura 7: (a) Umidade relativa do solo em vasos de plantas de *A. pitcairnioides* submetidas a seca. (b) Teor relativo de água (TRA) foliar. (c) Potencial osmótico (PO). (●) Controle: regas em dias alternados. (○) Seca: Suspensão de regas por 42 dias. TR indica 96h de reidratação. ANOVA, seguida de teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras indicam o desvio padrão. (*) Indica diferença estatística. $n=5$

A umidade do solo decresceu significativamente após 14 dias de seca (10,1%), chegando a 0,8% após 28 dias e 0% após 42 dias (Figura 7a). Os vasos contendo plantas hidratadas mantiveram os níveis de umidade entre 38,9 e 42,1%, ao longo do experimento. Diferenças estatísticas significativas foram observadas entre os

tratamentos a partir do 14º dia de seca. Com a retomada da rega, a umidade do solo tornou a subir, passando de 0% a 29,4% após 96h.

O teor relativo de água (TRA) das folhas esteve positivamente correlacionado à disponibilidade hídrica do solo (Figura 7b). Do início do experimento até o 14º dia de seca não houve diferença significativa entre os tratamentos, com TRA de 81,7% e 77,4% para C e S, respectivamente. A partir do 28º dia de indução do estresse, os tratamentos apresentaram diferenças significativas, com TRA de 82,7% e 66,9%, para C e S, respectivamente, atingindo 47,1% para S no 42º dia de seca. Após a reidratação, ainda é possível observar diferenças significativas entre os tratamentos, demonstrando que 96 h após o influxo de água não foram suficientes para reidratar completamente as folhas. Entretanto, houve recuperação parcial da turgescência, uma vez que os valores de TRA observados para S atingiram 67,5%, em comparação com 81,9% do C.

O decréscimo do TRA não resultou em mudanças expressivas no potencial osmótico foliar (Ψ_s), onde alteração significativa foi observada apenas aos 42 dias de indução da seca. Após a reidratação, os valores de Ψ_s em plantas hidratadas e sobre efeito da seca se tornaram equivalentes (Figura 7c).

4.2. Fluorescência da clorofila *a*

A diminuição do TRA acarretou efeitos significativos nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* entre 28 e 42 dias de imposição do estresse (Figura 8). Enquanto a atividade fotoquímica do PSII (F_v/F_m) foi alterada apenas aos 42 dias de seca (Figura 8a), a taxa de transporte de elétrons (ETR) foi reduzida a partir dos 28 dias, sugerindo fotoinibição do PSII (Figura 8b). Os valores do quenching fotoquímico (qP) exibiram um declínio com o avanço da seca, o que pode indicar uma diminuição da abertura dos centros de reação do PSII, entretanto sem diferença significativa entre os tratamentos (Figura 8c). Por outro lado, aumentos significativos nos valores de quenching não fotoquímico (NPQ), foram observados entre 28-42 dias de seca, indicando ativação do sistema de dissipação do excesso de energia absorvido pelas plantas sob estresse (Figura 8d).

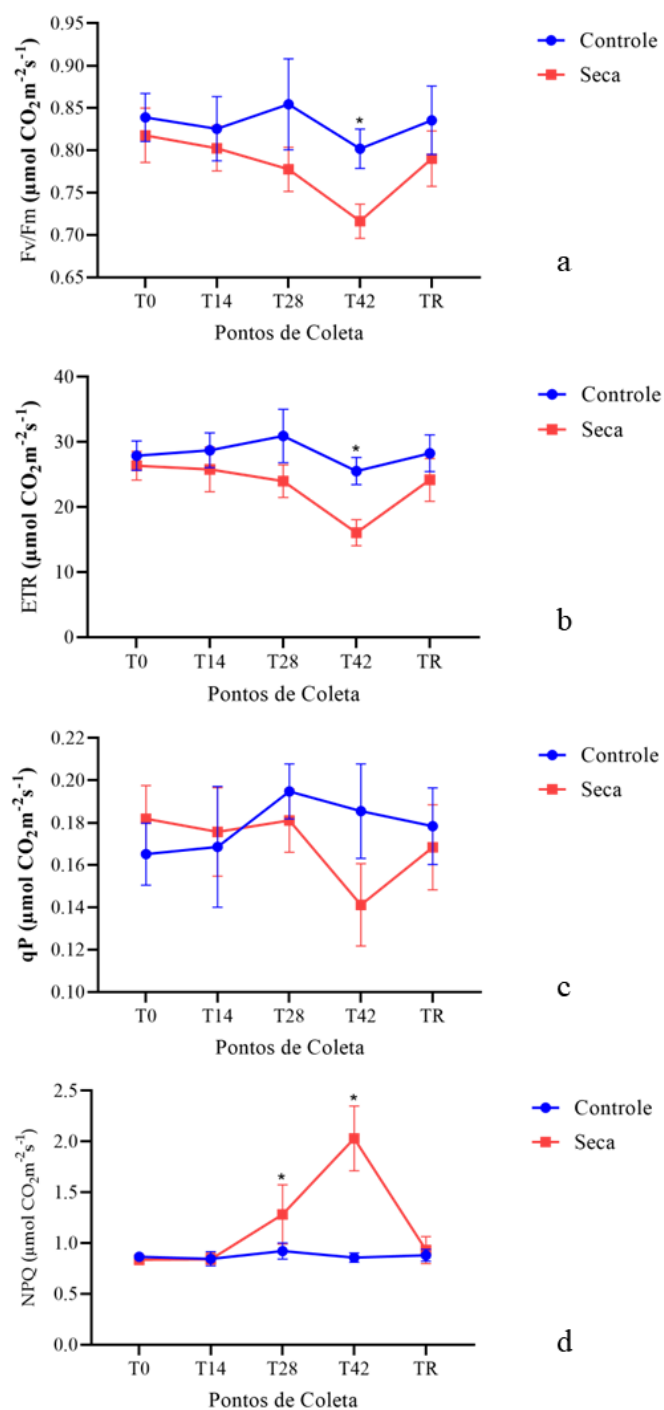


Figura 8: Parâmetros de fluorescência em *A. pitcairnioides* submetidas a seca. (a) Rendimento Quântico Máximo do PSII (Fv/Fm); (b) Taxa Relativa de Transporte de Eletrões (ETR); (c) Quenching fotoquímico (qP). (d) Quenching não-fotoquímico (NPQ). (●) Controle: regas em dias alternados. (○) Seca: Suspensão de regas por 42 dias. TR indica 96h de reidratação. ANOVA, seguida de teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras indicam o desvio padrão. (*) Indica diferença estatística. $n=5$

4.3. Pigmentos fotossintéticos

Os valores de clorofila *a* e *b* mantiveram-se próximos em ambos os tratamentos até o 42º dia de imposição da seca, quando as plantas tratadas (S) apresentaram uma queda significativa em seu conteúdo de clorofila, atingindo 4,87 mg.g⁻¹MS contra 8,69 mg.g⁻¹MS das plantas C para clorofila *a* (Figura 9a), e 1,08 mg.g⁻¹MS para o tratamento S e 3,47 mg.g⁻¹MS nas plantas C para clorofila *b* (Figura 9b). Não foram observadas variações significativas na razão *chl a/chl b*, apesar de tendência de aumento observada aos 42 dias nas plantas S (Figura 9c). Em contrapartida, os teores de carotenoides se mantiveram mais elevados nas plantas S, desde o 14º dia de imposição da seca, com diferença significativa entre os tratamentos no 42º de seca (Figura 9d).

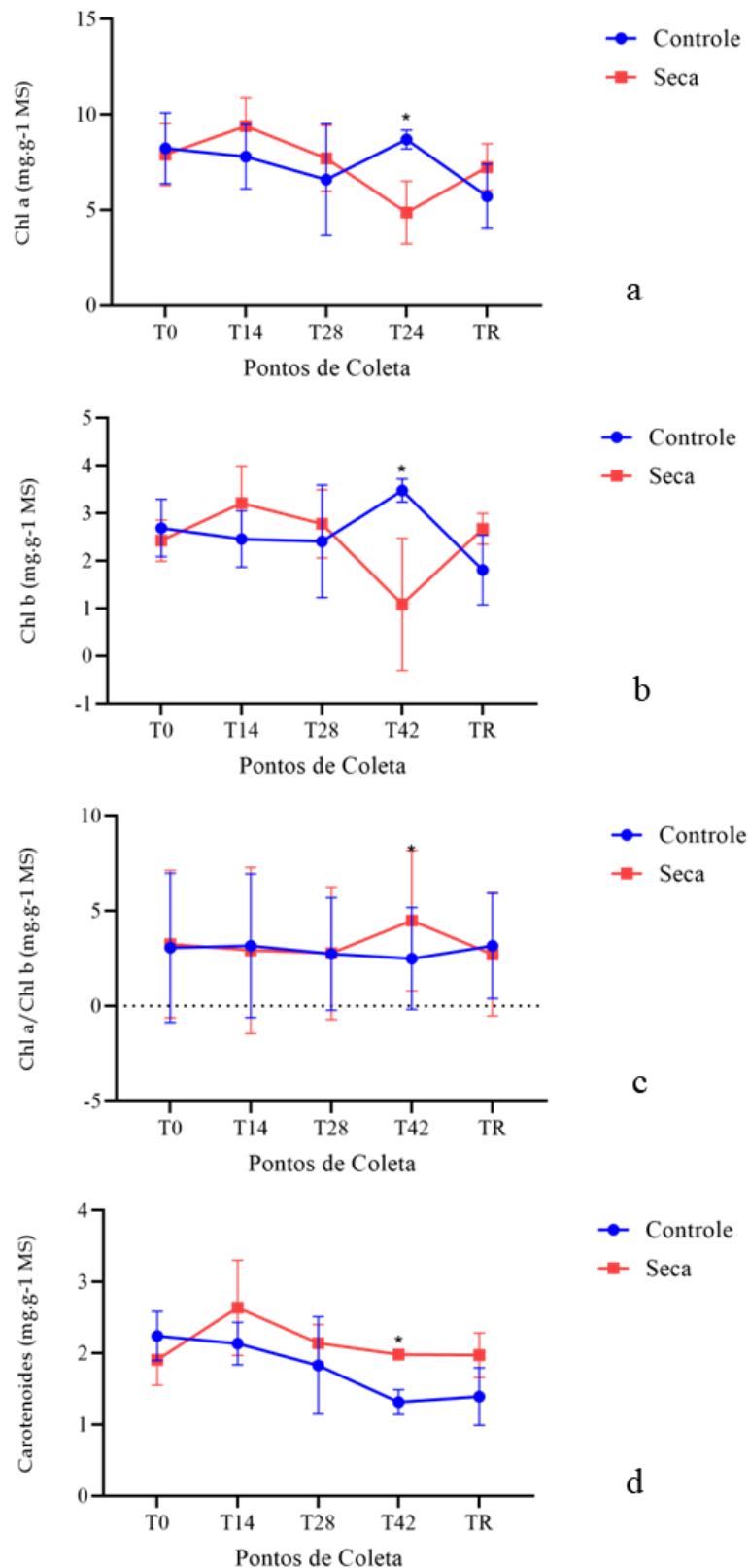


Figura 9: Pigmentos fotossintéticos de *A. pitcairnioides* submetidas a seca. (a) clorofila a (mg.g⁻¹MS); (b) clorofila b (mg.g⁻¹MS); (c) razão clorofila a-clorofila b (mg.g⁻¹MS); (d) carotenoides (mg.g⁻¹MS). (●) Controle: regas em dias alternados. (○) Seca: Suspensão de regas por 42 dias. TR indica 96h de reidratação. ANOVA, seguida de teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras indicam o desvio padrão. (*) Indica diferença estatística. n=5

4.4. Anatomia foliar

A folha de *A. pitcairnioides* é isobilateral (Figuras 10e, 11a-f). A epiderme é uniestratificada e constituída por células com paredes anticlinais e periclinais espessas (Figura 10a, b, d), sendo a parede periclinal externa revestida pela cutícula espessa (Figura 10d). Em vista frontal, as células epidérmicas mostram paredes anticlinais com contorno sinuoso em ambas as superfícies (Figura 10a, b). Estômatos tetracíticos (Figura 10b) com câmaras subestomáticas amplas (Figura 11c, e) e tricomas peltados (escamas) (Figura 10c) são encontrados predominantemente na superfície abaxial, mas eventualmente podem ocorrer na superfície adaxial próximo ao bordo foliar. O mesofilo heterogêneo é constituído pelo parênquima aquífero na face adaxial e pelo parênquima clorofiliano na face abaxial (Figura 11a-f). As células do parênquima aquífero são grandes e de formato arredondado a retangular (Figura 11a, b), enquanto as do parênquima clorofiliano são menores e arredondadas (Figura 11b-f). Idioblastos contendo ráfides com mucilagem ocorrem na área limítrofe entre os parênquimas aquífero e clorofiliano (Figura 11b-d) e, também, dispersos no parênquima clorofiliano. Os feixes vasculares encontram-se imersos no parênquima clorofiliano e são do tipo colateral fechado com calotas de fibras em ambos os polos dos tecidos condutores (Figuras 10e, 11a-f). Estes feixes estão organizados de modo que feixes maiores se intercalam aos feixes menores, sendo que os menores estão ligeiramente deslocados para a superfície abaxial (Figura 11a-f). Lacunas de ar são encontrados intercalados aos feixes vasculares (Figura 11c-f). Grupos de fibras extravasculares (2-3 fileiras) são observados abaixo dos feixes vasculares (Figuras 10e, 11a-f).

As folhas das plantas submetidas aos diferentes tratamentos (controle, seca 14, 28 e 42 dias, e reidratação) não apresentaram alterações na organização estrutural dos tecidos (Figura 11a-f), ocorrendo somente alterações na turgidez das células das plantas submetidas à seca (Figura 11c-f) em relação às folhas das plantas do controle (Figura 11a, b). Nas plantas submetidas à seca por 14, 28 e 42 dias (Figura 11c-e, respectivamente), as paredes das células do parênquima aquífero passaram a apresentar contorno sinuoso, levando ao achatamento das células em diferentes graus devido à perda da turgidez. A plasmólise das células teve início nas camadas mais internas na região central da lâmina foliar e, à medida que o período de seca aumentava, a plasmólise se acentuava nessa região e se estendia em direção aos bordos foliares (Figura 11c-e). Nas plantas reidratadas, as células tornaram-se túrgidas novamente

como às do controle, sendo que o início da hidratação ocorreu dos bordos para a região central da folha (Figura 11f). As células do parênquima clorofiliano das folhas das plantas submetidas à seca (Figura 11c-e) e à reidratação (Figura 11f) se mantiveram túrgidas como às das plantas controle (Figura 11a-b).



Figura 10: Lâmina foliar de *Acanthostachys pitcairnioides* de material dissociado (a, b), impressão de epiderme (c) e seções transversais (d, e). (a) Epiderme da face adaxial. (b) Epiderme da face abaxial, mostrando os estômatos tetracíticos. (c) Tricoma peltado. (d) Cutícula e células epidérmicas evidenciadas pelo Sudan IV e, logo abaixo, parênquima aquífero. (e) Bordo foliar, mostrando os feixes vasculares e os grupos de fibras extravasculares, com a lignina sendo evidenciada pela floroglucina. (Cabeça de seta, feixes de fibras extravasculares; E, epiderme; FV, feixe vascular; PA, parênquima aquífero; PC, parênquima clorofiliano) Barras de escala: a (50 μ m), b, c, d (20 μ m), e (100 μ m)

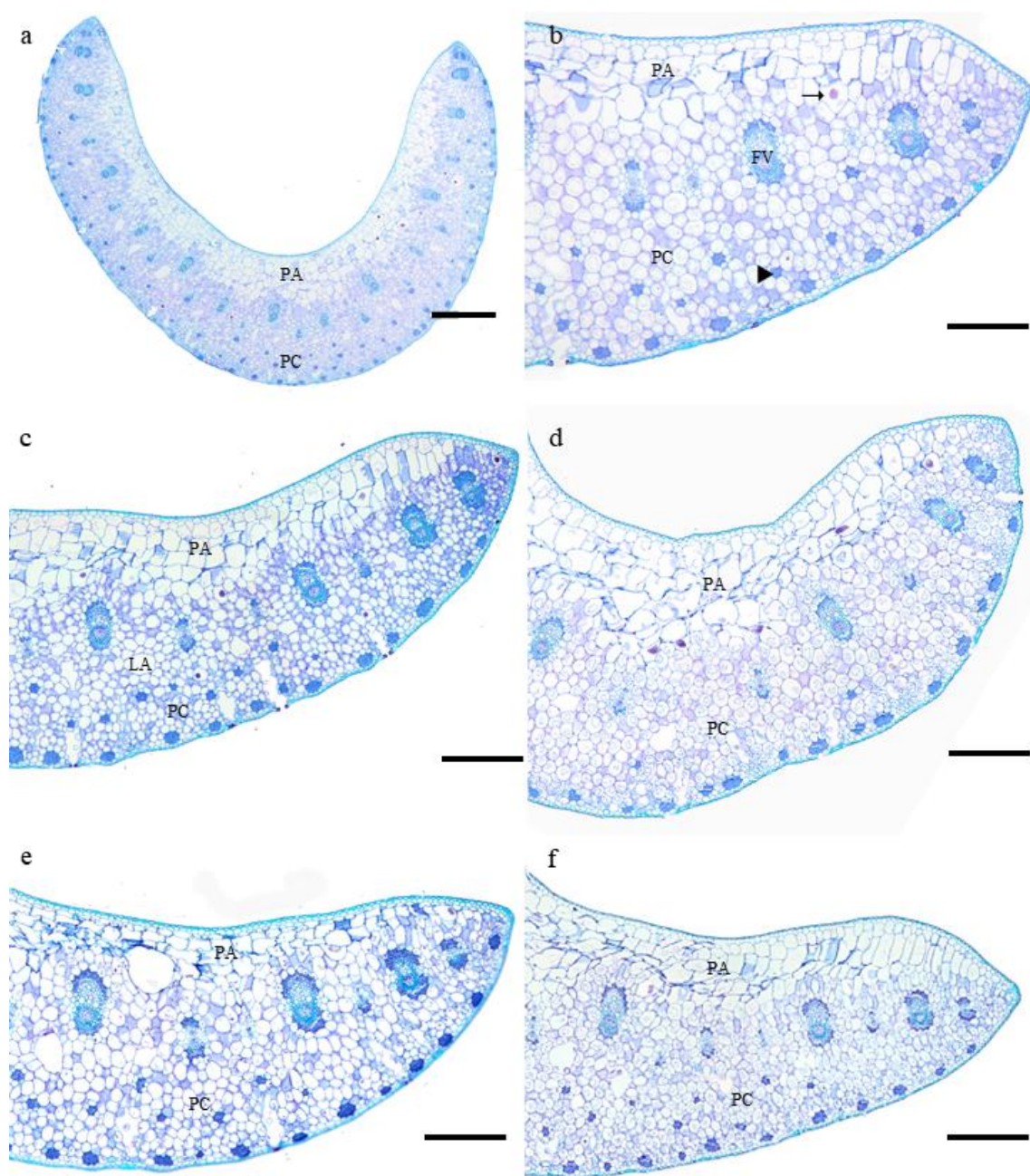


Figura 11: Seções transversais da lâmina foliar de *Acanthostachys pitcairnioides* expostas aos tratamentos controle (a, b), seca (c, d, e) e reidratação (f). (a,b) Vista geral da lâmina foliar e detalhe da região centro-bordo, respectivamente, da planta controle. (c-f) Detalhes da região centro-bordo da lâmina foliar das plantas submetidas à seca por 14 dias (c), 28 dias (d), 42 dias (e) e 96h após a reidratação (f). (Seta, idioblasto de ráfide; Cabeça de seta, feixes de fibras extravasculares; (*) Câmaras subestomáticas; PA, parênquima aquífero; PC, parênquima clorofiliano; FV, feixe vascular; LA, lacuna de ar). Barras de escala: a (200 µm); b-f (100 µm).

4.5. Acidez titulável

No tempo zero (T0), antes da imposição da seca, o delta de acidez titulável obtido pela diferença entre as amostras coletadas no período da manhã e no período noturno foi $0,17 \mu\text{mol H}^+ \cdot \text{g}^{-1} \text{MS}$. Após 14 dias de seca, os valores foram $0,13 \mu\text{mol}$

$\text{H}^+.\text{g}^{-1}\text{MS}$ e $0,25 \mu\text{mol H}^+.\text{g}^{-1}\text{MS}$ para os tratamentos C e S, respectivamente. No 28º dia de seca, os valores obtidos foram de $0,11 \mu\text{mol H}^+.\text{g}^{-1}\text{MS}$ para as plantas C contra $0,27 \mu\text{mol H}^+.\text{g}^{-1}\text{MS}$ para as plantas S, mostrando acúmulo significativo de ácidos induzido pelo estresse nos dois pontos de coleta.

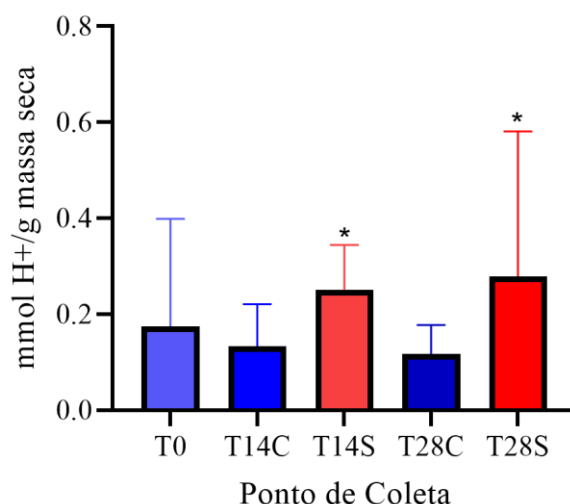


Figura 12: Delta de acidez titulável de plantas de *A. pitcairnioides* submetidas a seca. C – controle, S – seca. Cada barra representa a diferença entre os valores obtidos pela manhã e durante a noite. ANOVA, seguida de teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Barras indicam desvio padrão. (*) indica diferença estatística. $n=5$

4.6. Perfil metabólico

A análise do perfil metabólico detectou 40 compostos foliares ao longo de 42 dias de exposição de *A. pitcairnioides* ao déficit hídrico. Dentre os metabólitos identificados destacam-se 9 aminoácidos, 9 carboidratos (estruturais e não estruturais), 4 açúcares álcoois (polióis), 16 ácidos orgânicos, incluindo ácidos carboxílicos que participam do ciclo do ácido cítrico (TCA), ácidos graxos (palmítico, oleico, etc), ácidos que atuam no metabolismo antioxidante, um carotenóide (luteína) e um terpeno (3-isopentenil). Compostos relacionados ao metabolismo do carbono aumentaram gradativamente durante a desidratação (Figura 13). Enquanto os carboidratos D-treose, maltose, manose, arabinose e D-manitol aumentaram no período inicial do estresse (14-28 dias), outros como sacarose, mio-inositol, galactinol e xilitol exibiram valores aumentados com o avanço da seca (28-42 dias). Por outro lado, glicose, frutose e L-ramnose estiveram mais presentes em plantas hidratadas (Figura 13a). O perfil de aminoácidos mostrou aumento de L-serina aos 42 dias, precedido pelo incremento nos valores de glicerato; L-asparagina entre 28-42 dias, possivelmente sintetizada a partir

dos aumentos de oxoalacetato via aspartato; triptofano aos 28 dias e fenilalanina aos 42 dias via aumento simultâneo de chiquimato; e incremento de glutamato e prolina a partir dos 28 dias de indução da seca, valores que se mantiveram altos mesmo após a reidratação (Figuras 13b, c, d). Maior concentração de glicina e alanina também foi detectada em plantas desidratadas (14 e 28 dias, respectivamente), como também após a reidratação (Figura 13b).

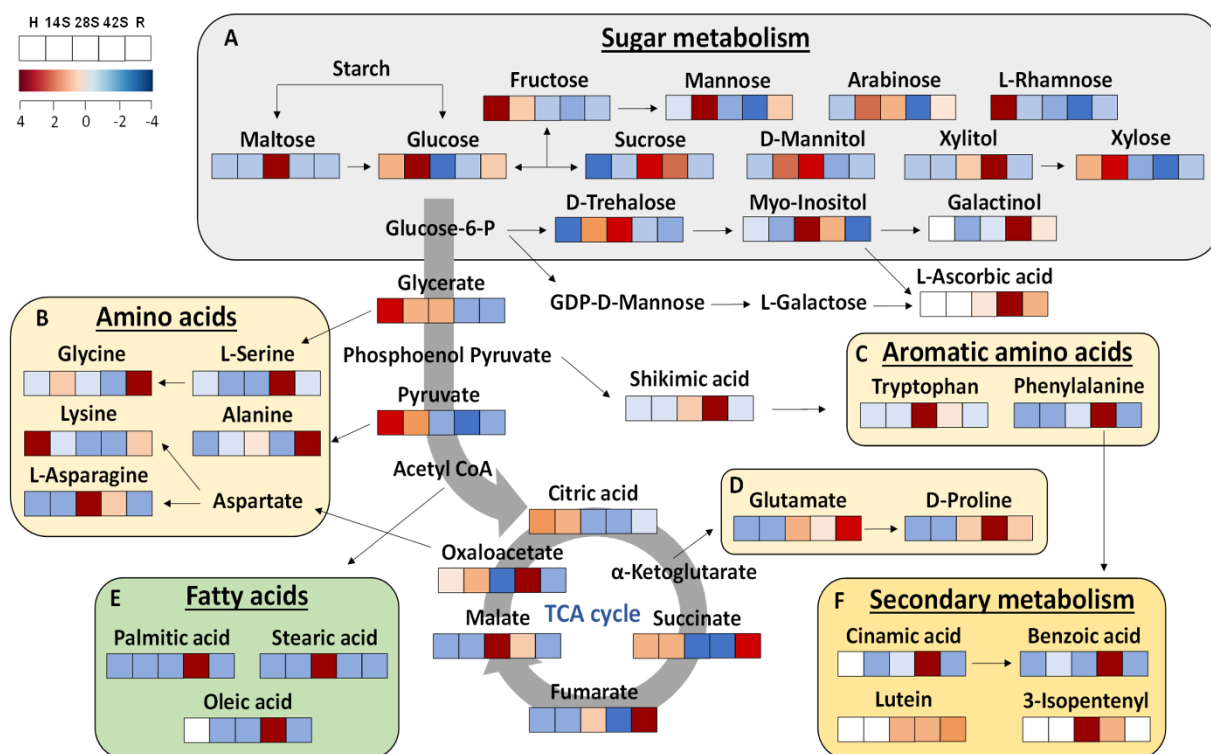


Figura 13: Mudanças gerais no perfil metabólico de folhas de *A. pitcairnioides* submetidas à seca por período de 42 dias e 96 h após a reidratação. A figura descreve as vias metabólicas com seus compostos intermediários e produtos finais. A via central (com seta) representa o ciclo do ácido tricarboxílico: (A) açúcares, (B,C,D) aminoácidos e aminoácidos aromáticos, (E) ácidos graxos e (F) compostos do metabolismo secundário. A intensidade de cada pico de metabólito para todas as amostras representa a média de cada tratamento. As cores representam abundância (vermelho, significativamente maior que o controle; azul, significativamente menor que o controle; mais claro, sem alterações significativas) pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Metabólitos não detectados estão indicados em branco. Mais informações nas figuras 15 e 16 dos Anexos. H= hidratado, S= seca e R= reidratado.

Os compostos ligados à via glicolítica como glicerato e piruvato, bem como grande parte dos ácidos que compõe o ciclo do TCA (ácido cítrico, succinato e fumarato) exibiram concentrações baixas durante a desidratação foliar. No entanto, o malato aumentou entre 28-42 dias de seca, precedido pelo aumento de oxalacetato aos 14 e 42 dias, indicando que a espécie acumula ácidos orgânicos comuns do

metabolismo CAM (Figura 13). Mudanças significativas também foram observadas para os ácidos graxos, com aumentos de ácido esteárico aos 28 dias e dos ácidos palmítico e oleico aos 42 dias de indução do estresse (Figura 13e). O aumento na concentração de compostos do metabolismo secundário foi antecedido pelo aumento de fenilalanina. Ácidos cinâmico e benzóico exibiram concentrações altas aos 42 dias, enquanto o ácido L-ascórbico, o carotenóide luteína e o terpeno 3-isopentenil foram compostos sintetizados exclusivamente na seca (figura 13f).

A análise de componentes principais (PCA) da matriz metabólica revelou que o primeiro componente (PC1) explica 27,9% da variância dos dados, enquanto o segundo componente (PC2) contribui com 14,9% (Figura 14). A separação dos tratamentos fica evidente nos agrupamentos distintos, onde plantas completamente hidratadas se agrupam próximas às plantas do início do estresse (14 dias), plantas sob desidratação mais intensa (28-42 dias) exibem agrupamento ao longo do PC1 e plantas reidratadas se agrupam na linha intermediária entre os dois pontos citados (Figura 14a). Os compostos que mais contribuíram para o agrupamento das plantas sob desidratação intensa foram os açúcares sacarose, D-treose, galactinol e xilitol; os aminoácidos asparagina, fenilalanina, D-prolina e triptofano; os ácidos málico, cinâmico, chiquímico, benzóico, palmítico, oleico e L-ascórbico; e o carotenóide luteína. Contudo, os metabólitos glucose, frutose, ramnose, lisina, glicina, os ácidos orgânicos: glicérico, cítrico e pirúvico foram mais representativos para o agrupamento de plantas hidratadas e do início da seca (Figura 13b). Confirmando essa premissa, a análise de enriquecimento de metabólitos (Figura 16, anexo) mostrou que os metabólitos mais representativos durante a desidratação foram aminoácidos e carboidratos (monossacarídeos e dissacarídeos), ácidos graxos saturados e ácidos cinâmicos. Em contraste, alguns aminoácidos e uma parte dos ácidos do ciclo TCA foram mais representativos em plantas hidratadas e reidratadas.

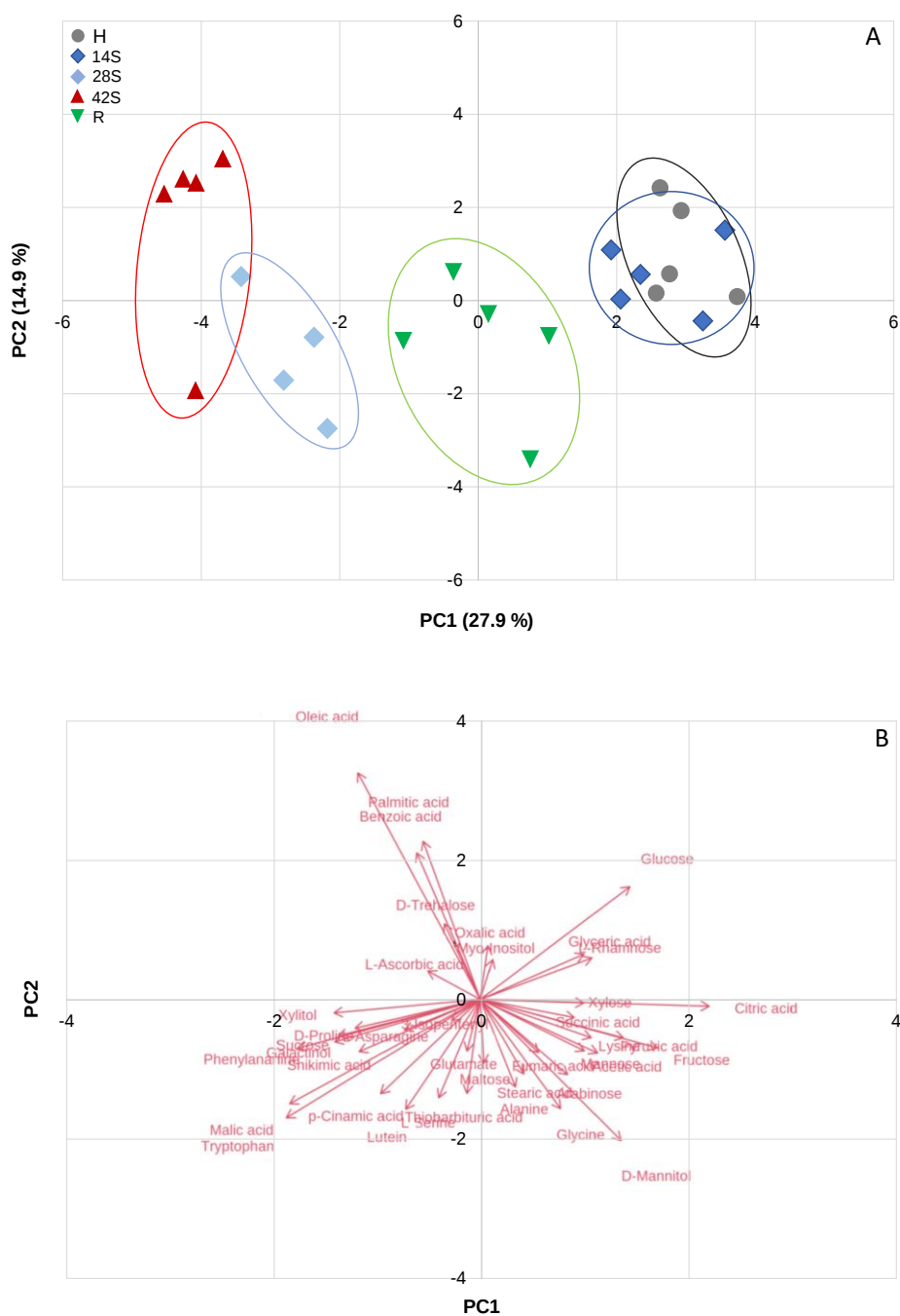


Figura 14: Análise de componentes principais (PCA) da matrix de dados metabólicos de folhas de *A. pitcairnioides* submetidas à seca por período de 42 dias e 96 h após a reidratação. (A) Agrupamento dos pontos de plantas hidratadas, desidratadas ao longo do tempo e reidratadas. (B) Distribuição vetorial dos compostos e sua contribuição para o agrupamento. H= hidratado, S= seca e R= reidratado.

5. Discussão

Alguns dos mecanismos por trás da tolerância à seca de *Acanthostachys pitcairnioides*, uma bromélia epífita endêmica da Mata Atlântica dos estados da Bahia e Espírito Santo, sujeita à pluviosidade sazonal, foram examinados. As plantas de *A. pitcairnioides* exibiram um atraso no processo de desidratação foliar quando comparado à água disponível no solo. Mesmo com a diminuição da umidade do solo e o resultante decréscimo no TRA foliar, a espécie foi capaz de tolerar o estresse hídrico imposto, com poucas alterações morfológicas visíveis, como a murcha da lâmina foliar e o enrolamento do bordo a partir do 28º dia de suspensão de rega. Também foi observado o avermelhamento da folha, que sugere indução da síntese de antocianinas.

De fato, a queda do TRA aos 28 dias de indução da seca não foi acompanhada de queda no Ψ_s , indicando que a espécie tem alta capacidade de osmorregulação. Somente aos 42 dias de indução do estresse foi observado decréscimo significativo no Ψ_s , o que coincide com as concentrações aumentadas de sacarose, mio-inositol, galactinol, xilitol e D-prolina, que são importantes osmorreguladores cuja síntese é bem descrita nas fases finais do déficit hídrico. Plantas jovens de outra espécie do gênero, *A. strobilacea*, quando submetidas a déficit hídrico progressivo por suspensão de rega durante oito dias, apresentaram redução do TRA apenas no oitavo dia, sendo que o Ψ_s se manteve similar ao das plantas controle, com valores próximos à -0,8 MPa (Menezes *et al.* 2020). No entanto, quando plantas de *A. strobilacea* tiveram suas respostas de curto prazo avaliadas, após imposição de estresse de início abrupto, por transferência para substrato previamente seco em estufa, a queda significativa de TRA já pôde ser observada após 2 horas, seguida de diminuição do potencial osmótico a partir de 24 horas, diferença que se manteve até o final do experimento, em 72 horas (Carvalho *et al.* 2021a). Assim como observado para plantas jovens de *A. strobilacea*, o ajuste osmótico se deu em plantas adultas de *A. pitcairnioides* em situação em que a umidade do solo atingiu valores próximos de zero, enquanto o Ψ_s se manteve inalterado em solos com maior umidade para ambas as espécies.

Em revisão de parâmetros hídricos e fotossintéticos de uma extensa gama de espécies de bromélias, de diferentes tipos de estruturas e metabolismos (C_3 ou CAM), os potenciais osmóticos raramente foram mais negativos do que -1,0 MPa (Martin, 1994). Os altos potenciais osmóticos teciduais característicos das epífitas são

comumente encontrados em plantas hidrofíticas, não xerófitas (Larcher, 2003; Lambers *et al.* 2008).

Uma possível explicação para a manutenção de altos potenciais osmóticos foliares e turgor celular com a evolução da seca envolve a anatomia foliar especializada de *A. pitcairnioides*.

As células epidérmicas da folha de *A. pitcairnioides*, mostram paredes anticlinais sinuosas em ambas as superfícies, assim como observado em três espécies de *Tillandsia* (Scatena & Segecin, 2005) e em *Dyckia tuberosa* (Vell.) Beer e em outras sete espécies de Tillandsioideae estudadas por Proença e Sajo (2007). De acordo com Scatena & Segecin (2005), a sinuosidade das paredes epidérmicas poderia auxiliar no suporte mecânico da folha evitando o murchamento.

A folha de *A. pitcairnioides* apresenta mesofilo heterogêneo, com parênquima aquífero na face adaxial e clorofiliano na face abaxial, assim como observado em *A. strobilacea* (Proença & Sajo, 2007; Carvalho, 2022). A presença de parênquima aquífero é relatada para diversas espécies de Bromeliaceae, podendo ocorrer somente na face adaxial ou em ambas as faces da folha (Aoyama & Sajo, 2003; Gomes-da-Silva, 2012; Krahel *et al.* 2013; Santos-Silva *et al.* 2013; Hermes *et al.* 2018). Esse tecido é constituído por células aclorofiladas de paredes delgadas e, de acordo com a espécie, varia em número de camadas, forma e tamanho celular (Aoyama & Sajo, 2003), sendo especializado na reserva de água em plantas suculentas, permitindo que o parênquima clorofiliano permaneça fotossinteticamente ativo mesmo com a perda de água pela transpiração da folha (Lambers *et al.* 2008).

Nas plantas de *A. pitcairnioides* do controle, o parênquima aquífero manteve-se túrgido, enquanto nas plantas submetidas à seca (14, 28 e 42 dias) houve a plasmólise parcial das células desse tecido, que se iniciou na região central da lâmina foliar e progrediu em direção aos bordos foliares à medida que o período de seca aumentava. Com a reidratação das plantas, o armazenamento da água ocorreu no sentido inverso, ou seja, dos bordos para o centro da lâmina foliar. Em plantas juvenis de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, cultivadas *in vitro* e submetidas ao tratamento com PEG 6000 para simular o déficit hídrico, a perda de turgor das células do parênquima aquífero também teve início na região central da lâmina foliar (Mollo *et al.*, 2019) como observado em *A. pitcairnioides*.

Durante a imposição da seca, o parênquima clorofiliano se manteve hidratado à custa do parênquima aquífero, como pôde ser observado pela plasmólise deste último,

sobretudo no 42º dia de suspensão de rega. Essa diminuição do parênquima aquífero para manutenção do parênquima clorofiliano (região metabolicamente ativa da folha) preservando o turgor e atividade fisiológica celular, também foi observada na bromélia CAM epífita *Tillandsia ionantha* submetida a 60 dias de seca (Novak & Martin, 1997). Freschi et al. (2010) mostraram que, em plantas hidratadas da bromélia epífita *Guzmania monostachia*, a razão parênquima clorofiliano/ aquífero varia nas diferentes porções foliares, sendo que a menor proporção de parênquima clorofiliano é observada na região mediana da lâmina foliar, região essa que apresentou o menor TRA após 7 dias de seca, em relação ao ápice e base, nos quais a espessura do parênquima aquífero é maior.

A translocação de água entre os tecidos de *A. pitcairnioides* também pode estar relacionada à preservação do aparato fotossintético até o 28º dia de seca. Mudanças no teor de clorofila fazem parte do rol de adaptações à seca. A queda dos teores de clorofila observada em folhas de *A. pitcairnioides* aos 42 dias de déficit hídrico se reflete na diminuição do Fv/Fm, que sugere início de fotoinibição, justamente no ponto de coleta no qual foi observada a maior diminuição na espessura do parênquima aquífero. Após quatro dias de reidratação, houve recuperação do teor de clorofilas, com consequente recuperação dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*. A perda de clorofila é um componente ao mesmo tempo negativo e adaptativo do estresse, uma vez que reduz a absorção de luz e, portanto, o risco de danos adicionais ao mecanismo fotossintético (Munné-Bosch & Alegre, 2000). Já o aumento de clorofilas pode maximizar a reciclagem de recursos de carbono quando a fotossíntese foliar é limitada pelo fechamento dos estômatos (Rustioni & Bianchi, 2021). Assim, nós hipotetizamos que a manutenção de clorofilas em *A. pitcairnioides* até os 28 dias de seca consistiu em mecanismo importante para lidar com o excesso de luz e minimizar os danos foto-oxidativos durante a desidratação. Aos 42 dias de seca, com o início do processo de fotoinibição, a queda do teor de clorofilas *a* e *b*, juntamente com o aumento do teor de carotenoides, atuou como estratégia para lidar com o estresse oxidativo. Os carotenoides são conhecidos por sua atividade antioxidante dentro dos cloroplastos, eliminando espécies reativas de oxigênio e prevenindo a peroxidação lipídica. De fato, o aumento da concentração de carotenoides totais, especialmente a luteína, detectado entre 28-42 dias de seca, evidencia a ativação do sistema antioxidante para lidar com tal condição. Sob radiação solar excessiva, a luteína pode exercer uma função antioxidante

e promover fluorescência dependente de ΔpH quenching (qE), atuando também como um supressor de Chl *a* excitada em estado singlete ($^1Chl\ a^*$) (Krause & Winter, 2020).

É possível que a eficiência operacional do PSII até o 28º dia de seca tenha sido mantida também pelo acúmulo de ácidos orgânicos relacionados ao metabolismo CAM. De acordo com Pikart et al. (2018), o acúmulo de ácido provavelmente fornece algum grau de fotoproteção pelo consumo de NADPH, favorecendo o transporte contínuo de elétrons, reduzindo a formação de espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, protegendo o aparato fotossintético. O maior delta de acidez titulável e o acúmulo de malato com 28 dias de seca são indícios do metabolismo CAM para *A. pitcairnioides*, que contrariam a classificação da espécie como C3 pelos dados de isotopia (Crayn et al, 2015). A análise do genoma da espécie, em andamento (Santos & Gaspar, dados não publicados) mostra a duplicação de genes do ciclo circadiano e a presença de diversos genes putativos envolvidos na fixação de carbono de CAM, incluindo a anidrase carbônica (CA), fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC), enzimas málicas ligadas a NAD e NADP (ME), malato desidrogenase (MDH), fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK), entre outros, reforçando o metabolismo CAM para a espécie. No entanto, pelos dados obtidos até o momento, não é possível determinar se a espécie é CAM constitutiva ou facultativa e qual o tipo de metabolismo CAM.

A limitação fotoquímica aqui observada indicou claramente um processo temporário de foto-oxidação à medida que a desidratação se tornou mais intensa. Com o avanço da seca, tanto F_v/F_m quanto a ETR diminuíram expressivamente aos 42 dias, sugerindo uma baixa eficiência dos fotossistemas da espécie estudada no aproveitamento da luz. Uma diminuição nos valores de F_v/F_m é indicativa de dano induzido pela luz ao PSII, podendo gerar algum grau de fotoinibição. Simultaneamente às mudanças observadas nos parâmetros fotoquímicos, ocorreu aumento de NPQ e ativação de mecanismos de dissipação de calor entre 28-42 dias. O aumento de NPQ pode ser causado pelo aumento da desativação de moléculas de clorofila excitadas, aumento do ΔpH transmembrana sob diminuição do consumo de ATP, e ao processo de transição de estados de migração da energia de excitação dos PSII para os PSI (Lawlor & Cornic, 2002). Um com plantas adultas de *A. imperialis* e *Aechmea fasciata* submetidas a 60 dias de déficit hídrico com reidratação posterior durante mais 30 dias, demonstrou que ambas as espécies não apresentaram variações significativas de F_v/F_m (Gomes et al. 2019).

Os desajustes fotoquímicos resultantes da desidratação foliar de *A. pitcairnioides* aos 42 dias contribuíram fortemente para mudanças no metabolismo de carboidratos. O aumento de sacarose e de açúcares álcoois neste período pode estar ligado não só ao atraso na desidratação, como também à manutenção do metabolismo assimilatório. De acordo com Gonçalves *et al.* (2020), a partição de carboidratos em plantas CAM é relevante para manter a geração de substrato PEP, uma vez que quantidades substanciais de carboidratos são necessárias como fontes potenciais de PEP e como aceptadores de bicarbonato para síntese de ácido málico durante a noite. Assim, uma maior produção de açúcares solúveis pode ser necessária para manter o pool de fosfoenolpiruvato e, conseqüentemente, a atividade CAM (Pikart *et al.* 2018). Efetivamente, como o metabolismo CAM é importante para a redução da perda de carbono e aumento da eficiência do uso da água sob condição de estresse, os aumentos de malato e oxalacetato observados em nosso estudo indicam que a captação e fixação de CO₂ noturna esteve ativa. Segundo Lim *et al.* (2019), a descarboxilação ocorre por duas vias, dependendo da espécie CAM. Na primeira via, a liberação de CO₂ ocorre por NAD(P)-ME que converte ácido málico em piruvato, que é então regenerado em PEP. Na segunda via, o ácido málico é convertido em oxaloacetato por NAD(P)-MDH seguido por PEPCK para liberar CO₂ e regenerar PEP. É possível que a segunda via de descarboxilação tenha estado mais ativa em plantas de *A. pitcairnioides* sob efeito da seca, constatação corroborada pelos dados metabólicos.

O aumento concomitante de prolina, triptofano, L-asparagina, glutamato e L-serina contribuiu não somente para retardar a desidratação pelo ajuste osmótico, mas também como fonte de compostos nitrogenados para o equilíbrio do metabolismo C:N. Enquanto a prolina é sintetizada nos cloroplastos a partir do glutamato e protege as membranas e proteínas em condições de estresse, a conversão de oxaloacetato para aspartato resulta em aumento no conteúdo de asparagina. Para Yadav *et al.* (2019), aminoácidos derivados do aspartato podem contribuir para a homeostase energética, protegendo contra a redução excessiva do PSII e seus conseqüentes danos por estresse oxidativo. Além disso, a síntese de aminoácidos da família do aspartato poderia funcionar como um dissipador de energia benéfico para mitigar possíveis desequilíbrios no cloroplasto durante a desidratação (Vieira *et al.* 2021). A asparagina também está envolvida no transporte de longa distância de N e pode ser utilizada pelas plantas como reservas de N e C durante o estresse e/ou no processo de recuperação (Casartelli *et al.* 2018; Vieira *et al.* 2021). Curiosamente, o aumento na concentração de alanina e glicina

entre 14 e 28 dias de seca pode estar relacionado à produção de malato. A glicina pode ser transaminada por alanina-glioxilato aminotransferase ou glutamato-glioxilato aminotransferase, e o glioxilato resultante pode ser acetilado nos peroxissomos para produzir malato (Hildebrandt *et al.* 2015). Desse modo, é possível que plantas de *A. pitcairnioides* sob efeito da seca utilizem eficientemente compostos do metabolismo C:N para a produção e acúmulo de ácidos orgânicos, como mecanismo para tolerar a seca.

A tolerância de *A. pitcairnioides* à seca também se deve à síntese de compostos do metabolismo secundário. O aumento na concentração de fenilalanina foi sucedido por incrementos de ácido cinâmico e benzóico, que por sua vez atuam como precursores de muitos compostos antioxidantes. Segundo Wang *et al.* (2019), os ácidos fenólicos cinâmico e benzóico e seus subprodutos podem proteger as plantas do estresse hídrico e térmico de longo prazo. Da mesma forma, o ácido L-ascórbico tem alto poder antioxidante, neutralizando as espécies reativas de oxigênio (EROs) que danificam as membranas celulares, especialmente os tilacoides dos cloroplastos (El-Khamissi *et al.*, 2018). Em plantas de *A. strobilacea* submetidas à seca curta, o conteúdo de ácido ascórbico não variou durante o experimento, já que este foi mantido em um estado altamente reduzido ao longo do estresse (Carvalho *et al.* 2021b). No nosso estudo, o efeito danoso das EROs nas membranas celulares pode ter sido minimizado ainda, pelo aumento na síntese dos ácidos graxos palmítico, esteárico e oleico aos 42 dias de indução da seca. O acúmulo de ácidos graxos de cadeias longas pode promover a curvatura das bicamadas lipídicas, preservando assim a estrutura das membranas (Tshabuse *et al.* 2018).

6. Conclusão e Perspectivas

A dinâmica de conservação da água nos tecidos de *A. pitcairnioides* parece estar relacionada a uma eficiente regulação osmótica, com acúmulo de solutos compatíveis para evitar a rápida desidratação; à manutenção da atividade fotoquímica até os 28 dias de indução da seca, que pode estar acoplada a um metabolismo de assimilação de carbono do tipo CAM, evitando assim a perda de água por transpiração durante o dia; como também, à atributos estruturais, que propiciam o redirecionamento da água disponível no parênquima aquífero para manter a turgescência e atender tecidos prioritários para a sobrevivência, como o parênquima clorofiliano.

O acúmulo de acidez titulável e malato em situação de seca, somados ao $\delta^{13}\text{C}$ - 26‰ e à presença de genes-chave do metabolismo CAM (genes relógio, PEPC, MDH, PEPCCK, entre outros) no genoma da espécie, sugerem *A. pitcairnioides* como uma provável CAM facultativa. Todavia, análises adicionais, como a dosagem da atividade da enzima PEPC e quantificação de malato e citrato, devem ser realizadas a fim determinar o tipo de metabolismo CAM da espécie. Análises do transcrito de folhas de *A. pitcairnioides*, oriundas do mesmo experimento realizado nesta dissertação, estão em andamento e permitirão se aprofundar nas alterações de transcritos associados ao CAM, assim como na modulação da expressão de vários genes de interesse envolvidos na tolerância à seca.

Este trabalho identificou algumas respostas interessantes da espécie, que não puderam ser aprofundadas, como o avermelhamento das folhas. O aumento de fenilalanina e ácido cinâmico, precursores da antocianina, nos estágios finais da seca, sugere que a via de síntese de antocianinas tenha sido induzida. Da mesma forma, o contorno sinuoso das células do parênquima aquífero, observado nas plantas do tratamento de seca, com consequente recuperação da turgescência após reidratação, sem que tenham sido observados rompimento de paredes e membranas celulares, sugere a ocorrência de alterações de parede celular. Análises futuras de composição da parede celular da espécie, associadas a análises de microscopia eletrônica de transmissão, podem indicar estratégias adicionais de tolerância da espécie.

Este é a primeira caracterização morfofisiológica e bioquímica realizada com a bromélia epífita *A. pitcairnioides*, assim como a primeira caracterização anatômica da folha desta espécie. Estes resultados vêm se somar aos já obtidos pelo grupo para plantas jovens de outra espécie do gênero, *A. strobilacea*, sendo o gênero

Acanthostachys ainda pouco estudado, com a terceira espécie, *A. calcicola*, tendo sido identificada somente em 2020. Embora os dados tenham sido obtidos de experimentos em vaso conduzidos em casa de vegetação em condições parcialmente controladas, os mesmos indicam alta tolerância da espécie à seca e permitem sugerir que, caso os episódios de seca intermitente ao qual as espécies estão sujeitas em seu ambiente natural se intensifiquem, conforme previsto pelo IPCC, a mesma será capaz de se adaptar e sobreviver às condições ambientais desfavoráveis. No entanto, tendo em vista que populações naturais da espécie não têm sido encontradas nos últimos anos, estudos ecológicos e populacionais devem ser empreendidos, visando compreender as razões que levaram à uma escassez de indivíduos na natureza.

No mais, embora não tenham sido objeto deste estudo, a facilidade de obtenção de plantas da espécie por meio de cultivo *in vitro* e o genoma já sequenciado, são ferramentas que permitirão, futuramente, aprofundar estudos de tolerância à seca da espécie e, até mesmo, identificar genes de interesse que possam ser usados para transformar plantas cultivadas de interesse econômico/alimentar, visando aumentar a tolerância das mesmas.

7. Referências

- Anderson, J. T., Wadgyamar, S. M.** 2020. Climate change disrupts local adaptation and favours upslope migration. *Ecology Letters*. v. 23. pp.181–192.
- Anderson, J.T., Song, B.** 2020. Plant adaptation to climate change—Where are we? *Journal of Systematics and Evolution*. v.58. pp. 533–545.
- Aoyama, E.M., Sajo, M.G.** 2003. Estrutura foliar de *Aechmea* Ruiz & Pav. subgênero *Lamprococcus* (Beer) Baker e espécies relacionadas (Bromeliaceae). *Revista Brasileira de Botânica*. v. 26. Pp. 461-473
- Arias, P.A., N. Bellouin, E. Coppola, R.G. Jones, G. Krinner, J. Marotzke, V. Naik, M.D. Palmer et al.** 2021: Technical Summary. In *Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Masson-Delmotte, V., P. Zhai, A. Pirani, . Connors, C. Péan, S. Berger, N. Caud, Y. Chen, L. Goldfarb, M.I. Gomis, M. Huang, K. Leitzell, E. Lonnoy, J.B.R. Matthews, T.K. Maycock, T. Waterfield, O. Yelekçi, R. Yu, and B. Zhou (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, pp.33–144
- Arruda, R.C.O., Costa, A.F.** 2003. Foliar anatomy of five *Vriesea* sect. *Xyphion* (Bromeliaceae) species. *Selbyana*. pp.180–189
- Bacelar, E. L. V. A., Moutinho-Pereira, J. M., Gonçalves, B. M. C., Brito, C. V. Q., Gomes-Laranjo, J., Ferreira, H. M. F., Correia, C. M.** 2012. Water Use Strategies of Plants Under Drought Conditions. In: R. Aroca (ed.), *Plant Responses to Drought Stress*. pp.145-170
- Bartels, S. F., & Chen, H. Y. H.** 2012. Mechanisms Regulating Epiphytic Plant Diversity, *Critical Reviews in Plant Sciences*. v. 31. pp. 391-400
- Benzing DH, Bennett B, Brown G, et al.** 2000. *Bromeliaceae: Profile of an Adaptive Radiation*. Cambridge University Press. 675 p

- Benzing, D. H.** 2012. Air plants: epiphytes and aerial gardens. Cornell University Press. 710 p.
- Bräutigam, A., Schlüter, U. Eisenhut, M., Gowik, U.** 2017. On the Evolutionary Origin of CAM Photosynthesis. *Plant Physiology*. v. 174. pp.473–477
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J. and Weretilnyk, E.** 2000 Responses to abiotic stress. Biochemistry & molecular biology of plants. In: Gruissem, W. and Jones, R., Eds., American Society of Plant Physiologists, Rockville. pp.1158-1203.
- Brighigna, L., Fiordi, A. C. and Palandri, M. R.** 1984. Structural characteristics of mesophyll in some Tillandsia species: Phytomorphology, pp. 191-200.
- Burrows, M. T., Schoeman, D.S., Richardson, A.J., Molinos, J.G., Hoffmann, A, Buckley, L.B., Moore, P.J., Brown, C.J., Bruno. J.F., Duarte, C.M., Halpern, B.S., Hoegh-Guldberg, O., Kappel, C.V., Kiessling, W., O'Connor, M.I., Pandolfi, J.M., Parmesan, C., Sydeman, W.J., Ferrier, S., Williams, K.J., Poloczanska, E.S.** 2014. Geographical limits to species-range shifts are suggested by climate velocity. *Nature*. V. 507. pp.492–495.
- Carlquist, S.** 1975. Ecological strategies of xylem evolution. Oakland: University of California Press. 245 p.
- Carvalho, V.** 2022. Tolerância e memória à seca na bromélia epífita *Acanthostachys strobilacea* (Schult. & Schult.f.) Klotzsch. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Ambientais, São Paulo. 74 p.
- Carvalho, V., Carvalho, C.P., dos Santos, D.S., Nievola, C.C.** 2021a. Initial in vitro plant establishment of seeds and nodal segments from bromeliad *Acanthostachys strobilacea* (Schult. & Schult.f.) Klotzsch differs in respiratory rates and shoot formation. v. 48. pp. e972020
- Carvalho, V., Gaspar, M. and Nievola, C. C.** 2021b. Short-term drought triggers defence mechanisms faster than ABA accumulation in the epiphytic bromeliad *Acanthostachys strobilacea*. *Plant Physiology and Biochemistry*. v.160. pp. 62–72.

- Casartelli, A., Riewe, D., Hubberten, H. M., Altmann, T., Hoefgen, R., & Heuer, S.** 2018. Exploring traditional aus-type rice for metabolites conferring drought tolerance. *Rice*. v.11. pp.1-16.
- Castillo, R. J., Cervera, C. & Navarro-Alberto, J.** 2016. Drought and extreme temperature tolerance for *Tillandsia dasyliriifolia*, an epiphytic bromeliad from the northern coastal dune scrubland in Yucatan, Mexico. *Botanical Sciences*. v.94. pp.121-126.
- Cavender-Bares, J., Bazzaz, F. A.** 2004. From Leaves to Ecosystems: Using Chlorophyll Fluorescence to Assess Photosynthesis and Plant function in Ecological Studies. In: Papageorgiou, G.C., Govindjee (eds) *Chlorophyll a Fluorescence. Advances in Photosynthesis and Respiration*. Springer, Dordrecht. pp.737-755.
- Ceusters, N., Valcke, R., Frans, M., Claes, J. E., Ende, W. V. D., Ceusters, J.** 2019. "Performance index and PSII connectivity under drought and contrasting light regimes in the CAM orchid *Phalaenopsis*." *Frontiers in Plant Science*. v.10. pp. 1012-1012
- CNCFlora.** *Acanthostachys pitcairnioides* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Acanthostachys pitcairnioides](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Acanthostachys_pitcairnioides)>. Acesso em 20 novembro 2022.
- Costello, M. J., Vale, M. M., Kiessling, W., Maharaj, S., Price, J., Talukdar, G.H.** 2022: Cross-Chapter Paper 1: Biodiversity Hotspots. In: *Climate Change., 2022: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [H.-O. Pörtner, D.C. Roberts, M. Tignor, E.S. Poloczanska, K. Mintenbeck, A. Alegría, M. Craig, S. Langsdorf, S. Löschke, V. Möller, A. Okem, B. Rama (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA, pp. 2123–2161.
- Craig, E. M., Lin, T.-C., Lin, K.-C., Hsu, C.-C., Chiou, W.-L.** 2004. Causes and consequences of high osmotic potentials in epiphytic higher plants, *Journal of Plant Physiology*. v. 161. pp.1119-1124.

- Cramer, G. R.** 2010. Abiotic stress and plant responses from the whole vine to the genes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. v.16. pp. 86-93.
- Crayn, D.M., Winter, K. and Smith, J. A. C.** 2004. Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the neotropical family Bromeliaceae: *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v. 101. pp. 3703-3708.
- Crayn, D. M., Winter, K., Schulte, K., Smith, J. A. C.** 2015. Photosynthetic pathways in Bromeliaceae: phylogenetic and ecological significance of CAM and C3 based on carbon isotope ratios for 1893 species. *Botanical Journal of the Linnean Society*. v.178. pp. 169-221.
- 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. *Botanical Journal of the Linnean Society*. v. 178. pp. 169–221.
- Cushman, J.C., Borland, A. M.** 2002. Induction of Crassulacean acid metabolism by water limitation. *Plant, Cell and Environment*. v. 25. pp.295–310
- Derwidueé, F. S. and Gonzalez, A. M.** 2010. Anatomía foliar en Bromeliaceae del Nordeste argentino y Paraguay. *Bonplandia*. pp. 153-173.
- Eggli, U.** 2020. *Acanthostachys* Bromeliaceae. *Monocotyledons*. pp.849-850.
- El-Khamissi, H. A. Z., El-Hamansy, S. M. A., Behairy, R. T.** 2018. Mitigation of drought stress on fenugreek seedlings by application of ascorbic acid. *Journal of Biological Chemistry and Environmental Sciences*. v. 13. pp. 343–358.
- Evans, T. M. [et al. 2015], Jabaily, R. S., Faria, A. P. G. de, Oliveira F. de Sousa, L. de, Wendt, T. & Brown, G. K.** 2015. Phylogenetic relationships in Bromeliaceae subfamily Bromelioideae based on chloroplast DNA sequence data. *Systematic Botany*. v.40. pp. 116–128.
- Fadrique, B., Báez, S., Duque, Á., Malizia, A., Blundo, C., Carilla, J., Osinaga-Acosta, O., Malizia, L., Silman, M., Farfán-Ríos, W., Malhi, Y., Young, K.R., Cuesta, C.F., Homeier, J., Peralvo, M., Pinto, E., Jadan, O., Aguirre, N.,**

- Aguirre, Z., Feeley, K.J.**, 2018. Widespread but heterogeneous responses of Andean forests to climate change. *Nature*. v.564. pp. 207–212.
- Follador, M., Viezzer, J., Egler, M., Becher, M., Hach, L., Pereira, V., Rocha, A., Vaz, C., Vieira, T., Amon, M., Hartzell, S.** 2018. Modelling Potential Biophysical Impacts of Climate Change in the Atlantic Forest: Closing the Gap to Identify Vulnerabilities in Brazil. In: Leal Filho, W., Esteves de Freitas, L. (eds) *Climate Change Adaptation in Latin America*. Climate Change Management. Springer, Cham. pp.476
- Forzza, R. C., Costa, A., Siqueira Filho, J. A., Martinelli, G., Monteiro, R.F., Santos-Silva, F., Saraiva, D. P., Paixão-Souza, B., Louzada, R.B., Versieux, L.** 2015. Bromeliaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <<http://floradobrasil2015.jbrj.gov.br/FB5751>> acesso em: 20/11/2022
- Franklin, G. L.** 1945. Preparation of thin sections of synthetic resin and wood-resin composites, and a new macerating method for wood. *Nature*. v.155. pp. 51-51.
- Freschi, L., Takahashi, C. A., Cambui, C. A., Semprebom, T. R., Cruz, A. B., Mioto, P. T., Calvente, A., Latansio-Aidar, S. R., Aidar, M. P. M., Mercier, H.** 2010. Specific leaf areas of the tank bromeliad *Guzmania monostachia* perform distinct functions in response to water shortage. *Journal of Plant Physiology*. v.167. pp. 526-533.
- Givnish, T. J., Barfuss, M. H., Van Ee, B., Riina, R., Schulte, K., Horres, R., ... & Sytsma, K. J.** 2011. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *American journal of botany*. v.98. pp. 872-895.
- Givnish, T. J. et al.** 2014. Adaptive radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae: Molecular Phylogenetics and Evolution. v.71. pp. 55-78.
- Gonçalves, A. Z., Latansio, S., Detmann, K. C., Marabesi, M. A., Neto, A. A. C., Aidar, M. P. M., Da Matta, F. M., Mercier, H.** 2020. What does the RuBisCO

activity tell us about a C3-CAM plant?. *Plant Physiology and Biochemistry*. v. 147. pp. 172-180.

Gomes-da-Silva, J., Vargens, F. A. C., Arruda, R. C. O., Costa, A. F. 2012. A morphological cladistic analysis of the *Vriesea corcovadensis* group (Bromeliaceae: Tillandsiadeae), with anatomical descriptions: new evidence of the non-monophyly of the genus. *Systematic Botany*. v. 37. pp. 641-654.

Gouda, E.J., Butcher, D., Gouda, C.S. 2023. *Encyclopaedia of Bromeliads*, Version 5. Utrecht: University Botanic Gardens. <http://bromeliad.nl/encyclopedia/> (continuously updated; accessed 20 June 2023).

Hermes, M.B, Moreira, A. S. F. P., Castro, N. M., Oliveira, D. C. 2018. Structural variation among leaves in *Aechmea distichantha* Lem. (Bromeliaceae) rosettes, considering apical and basal differences. *Lora*. v.248. pp. 76-86.

Herrera, A., Fernández, M. D., Taisma, M. A. 2000. Effects of drought on CAM and water relations in plants of *Peperomia carnevalii*. *Annals of Botany*. v. 86. pp.511-517.

Hietz, P., Wagner, K., Ramos, F., Sarmento, C.J et al. 2022. Putting vascular epiphytes on the traits map. *Journal of Ecology*. v.110. pp.340-358.

Hildebrandt, T.M., Nesi, A.N., Araújo, W.L., Braun, H-P. 2015 Amino Acid Catabolism in Plants. *Molecular Plant*. v. 8. pp.1563–1579.

Hodgins, R. R. and Van Huystee, R. B. 1986. Rapid Simultaneous Estimation of Protoporphyrin and Mg-Porphyrins in Higher Plants.: *Journal of Plant Physiology*. v. 125. pp. 311-323.

Jacques-Félix, H. 2000. The Discovery of a Bromeliad in Africa: *Pitcairnia Felicianae*.: *Selbyana*. v. 21. pp. 118–124

Johansen, D. A. 1940. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill. 523 p.

Kaiser, E. 1880. Verfahren zur herstellung einer tadellosen glycerin-gelatine. *Botanisch Zentralb.* v. 180, pp. 25-26.

- Krahl, A. H., Holanda, A. S. S., Krahl, D. R. P., Corrêa, M. M., Oliveira, R. L. C., Vlasko, J.J.,** 2013. Anatomia foliar de *Ananas lucidus* Mill. (Bromeliaceae). *Natureza on line*. v.11. pp. 161-165.
- Kramp, R. E., Liancourt, P., Herberich, M. M., Saul, L., Weides, S., Tielbörger, K., Májeková, M.,** 2022. Functional Traits and Their Plasticity Shift from Tolerant to Avoidant under Extreme Drought. *Ecology*. e.3826.
- Larcher, W.** 2003. *Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups*. Springer Science & Business Media. 500 p.
- Lambers, H.; Chapin III, F. S., Pons, T. L.** 2008. *Plant physiological ecology*. 2nd ed. New York, Springer. pp.445-477
- Lawlor, D.W., Cornic, G.** 2002. Photosynthetic Carbon Assimilation and Associated Metabolism in Relation to Water Deficits in Higher Plants. *Plant, Cell and Environment*. v. 25. pp. 275-294.
- Levitt, J.** 1972. *Responses of plants to environmental stresses*. Academic Press, San Diego. 497 p.
- Lim S. D., Lee, S., Choi, W-G, Yim, W.C., Cushman, J.C.** 2019. Laying the Foundation for Crassulacean Acid Metabolism (CAM) Biodesign: Expression of the C4 Metabolism Cycle Genes of CAM in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*. v. 10. pp.101-101
- Lima, R. A. F. de, Oliveira, A. A., Pitta, G. R., Gasper, A. L., Vibrans, A.C., Chave, J., Steege,H., Prado. P. I.** 2020. The erosion of biodiversity and biomass in the Atlantic Forest biodiversity hotspot. *Nature Communications*. v.11. pp.1-16
- Lima, D. F., Mello, J. H. F., Lopes, I. T., Forzza, R. C., Goldenberg, R., et al.** 2021. Phenological responses to climate change based on a hundred years of herbarium collections of tropical Melastomataceae. *Plos One*. v. 16. e0251360.
- Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., Fernie, A. R.** 2006. Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants.: *Nature Protocols*. v. 1. pp. 387-396

- Ludlow, M.M.** 1989. Strategies of Response to Water Stress. In: Kreeeb, K.H., Richter, H. and Hinckley, T.M., Eds., Structural and Functional Responses to Environmental Stresses, SPB Academic Publishing, The Hague. pp.269-281.
- Lüttge,U.** 2003. Photosynthesis And Partitioning CAM Plants, Editor(s): Brian Thomas, Encyclopedia of Applied Plant Sciences, Elsevier, pp. 688-705
- MacIlvain, T. C.** 1921 A Buffer Solution for Colorimetric Comparison. Journal of Biological Chemistry. v.49. pp.183-186.
- Males, J., Griffiths, H.** 2017^a. Stomatal Biology of CAM Plants. v. 174. pp. 550–560.
- Males, J., Griffiths, H.** 2017^b. Functional types in the Bromeliaceae: relationships with drought-resistance traits and bioclimatic distributions.: Functional Ecology. v. 31. pp. 1868-1880.
- Marcusso, G. M., Monro, A. K., Melo, P. H. A., Lombardi. J. A.** 2020. *Acanthostachys calcicola* (Bromeliaceae, Bromelioideae), a new species from a limestone outcrop in Tocantins State, Brazil.: Phytotaxa. v. 472. pp. 201-206.
- Martin, C. E., Lin, T.-C., Lin, K.-C., Hsu, C.-C., Chiou, W.-L.** 2004. Causes and consequences of high osmotic potentials in epiphytic higher plant: Journal of Plant Physiology. v. 161. pp. 1119– 1124.
- Martin, C. E.** 1994. Physiological ecology of the Bromeliaceae. The Botanical Review. v.60. pp.1–82.
- Matiz, A., Miotto, P. T., Mayorga, A. Y., Freschi, L., Mercier, H.** 2013. CAM photosynthesis in bromeliads and agaves: what can we learn from these plants. photosynthesis, v.1. pp. 91-134.
- Menezes, F. O., Carvalho, V., Moreira, V. A., Rigui, A. P., Gaspar, M. e. Nievola, C. C.** 2020. Juvenile plants of an epiphytic bromeliad exhibit rapid changes in carbohydrate content and antioxidant capacity to cope with water withholding.: Theoretical and Experimental Plant Physiology. v. 32. pp. 89-98

- Miller, L.** 1968. Microtecnica e fotomicrografia. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (Apostila de Curso)
- Ming, R., VanBuren, R., Wai, C. et al.** 2015. The pineapple genome and the evolution of CAM photosynthesis. *Nature Genetics*. v.47. pp.1435–1442.
- Mioto, P.T., Rodrigues, M.A., Matiz, A., Mercier, H.** 2015. CAM-Like Traits in C3 Plants: Biochemistry and Stomatal Behavior. In: Lüttge, U., Beyschlag, W. (eds) *Progress in Botany*. Progress in Botany. Springer, Cham. v. 76. pp.195-209
- Mollo, L., Hayashi, A.H., Pereira, P.N., Jorge, A.V., Nievola, C.C.** 2019. Drought survival strategies of juvenile bromeliads of *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. v. 139. pp. 295–304.
- Monteiro, R.F., Forzza, R.C., Mantovani, A.** 2011. Leaf structure of *Bromelia* and its significance for the Evolution of Bromelioideae (Bromeliaceae). *Plant Systematics and Evolution*. v. 293. pp. 53–64.
- Müller, L-L.B., Zotz, G., Albach, D. C.** 2019. Bromeliaceae subfamilies show divergent trends of genome size Evolution. *Scientific Reports*. v. 9. pp. 1-12
- Munné-Bosch, S., Alegre, L.** 2000. Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta*. v. 210. pp. 925–931.
- Nimmo, H. G.** 2000. The regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in CAM plants. *Trends in Plant Science*. v.5. pp.75–80
- Nowak, E. J., Martin, C. E.** 1997. Physiological and anatomical responses to water deficits in the CAM epiphyte *Tillandsia ionantha* (Bromeliaceae). *International Journal of Plant Sciences*. v.158. pp.818–826.
- Ohrui, T., Nobira, H., Sakata, Y., Taji, T., Yamamoto, C., Nishida, K., Yamakawa, T., Sasuga, Y., Yaguchi, Y., Takenaga, H., Tanaka, S.** 2007. Foliar trichome and aquaporin-aided water uptake in a drought resistant epiphyte *Tillandsia ionantha* Planchon. *Planta*. v. 227. p. 47-56.

- Proença, S. L.; Sajo, M. G.** 2007. Anatomia foliar de bromélias ocorrentes em áreas de cerrado do Estado de São Paulo, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*. v. 21. pp. 657–673.
- Pikart, F.C., Matiz A., Alves, F.R.R., Mercier, H.** 2020. Diurnal modulation of PEPCCK decarboxylation activity impacts photosystem II light-energy use in a drought-induced CAM species. *Environmental and Experimental Botany*. v. 173. e104003.
- Rauh & Barthlott.** 1983. In: *Trop. Subtrop. Pflanzenwelt* 42: 34
- Rustioni, L., Bianchi, D.** 2021. Drought increases chlorophyll content in stems of *Vitis* interspecific hybrids. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*. v.33. pp. 69–78.
- Sakai, W. S.** 1973. Simple Method for Differential Staining of Paraffin Embedded Plant Material Using Toluidine Blue O, *Stain Technology*. v. 48. pp. 247-249
- Sanders, G.J., Arndt, K. S.,** 2012. Osmotic Adjustment Under Drought Conditions. In: R. Aroca (ed.), *Plant Responses to Drought Stress*. pp. 199-229.
- Santos-Silva, F., Saraiva, D.P., Monteiro, R.F., Pita, P., Mantovani, A., Forzza, R.C.** 2013. Invasion of the South American dry diagonal: What can the leaf anatomy of Pitcairnioideae (Bromeliaceae) tell us about it?. *Flora*. v. 208. pp. 508– 521.
- Scatena, V.L.; Segecin, S.** 2005. Anatomia foliar de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*. v.28. pp.635-649.
- Scheiber, U, Bilger, W and Neubauer, C.** 1994. Chlorophyll Fluorescence as a Nonintrusive Indicator for Rapid Assessment of In Vivo Photosynthesis. [book auth.] ED., Caldwell, M.M. Schulze. *Ecophysiology of Photosynthesis*. Berlin: Springer-Verlag. v. 100. pp. 49-70.
- Schulte, K., Barfuss, M. H. J. and Zizka, G.** 2009. Phylogeny of Bromelioideae (Bromeliaceae) inferred from nuclear and plastid DNA loci reveals the evolution of the tank habit within the subfamily. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. v. 51. pp. 327-339.

- Segatto, F. B., Bisognin, D. A., Benedetti, M., da Costa, L. C., Rampelotto, M. V., Nicoloso, F. T.** 2004. Técnica para o estudo da anatomia da epiderme foliar de batata. *Ciência Rural*. v. 34. pp. 1597-1601.
- Silva, M. M. P., Vasquez, H. M., Bressan-Smith, R., Silva, J. F. C., Erbesdobler, E. A., Junior. P. S. C. A.** 2006. Eficiência fotoquímica de gramíneas forrageiras tropicais submetidas à deficiência hídrica. *Revista Brasileira de Zootecnia* [online]. v. 35. pp. 67-74.
- Simonelli, M., Fraga, C. N.** 2007. Espécies da flora ameaçadas de extinção no estado do Espírito Santo. Ipema. 146 p.
- Smith, J. A. C, Lüttge, U.** 1985. Day–night changes in leaf water relations associated with the rhythm of Crassulacean acid metabolism in *Kalanchoe daigremontiana*. *Planta*; v. 163. pp. 272–282.
- Smith, J.A.C., Griffiths, H., Lüttge, U., Crook, C.E., Griffiths, N.M., Stimmel, K-H.** 1986 Comparative ecophysiology of CAM and C3 bromeliads. IV. Plant water relations. *Plant Cell Environ.* v. 9. Pp. 395–410.
- Smith, L. B. and Downs, R. J.** 1979. *Flora Neotropica*, Monograph No. 14, Part 3, Bromelioideae(Bromeliaceae). New York: The New York Botanical Garden.
- Tay, I. Y., Odang, K. B., Cheung, C. M.** 2021. Metabolic Modeling of the C3-CAM Continuum Revealed the Establishment of a Starch/Sugar-Malate Cycle in CAM Evolution. *Frontiers in plant Science*. v. 11. pp. 573197.
- Tomlinson, P. B.** 1969. Anatomy of the monocotyledons. III. Commelinales-Zingiberales. [ed.] C. R. Metcalfe. Oxford: Clarendon Press. 466 p.
- Tshabuse, F., Farrant, J.M., Humbert, L., Moura, D., Rainteau, D., Espinasse, C. et al.** 2018. Glycerolipid analysis during desiccation and recovery of the resurrection plant *Xerophyta humilis* (Bak) Dur and Schinz. *Plant, Cell and Environment*. v. 41.pp. 533–547.
- Turner, N. C.** 1986. Crop Water Deficits: A Decade of Progress. *Advances in Agronomy*. v. 39. pp.1-51

- Versieux, L. M., Palma-Silva, C., Wendt, T., Mercier, H.** 2020. Report from the 2nd World Congress of Bromeliaceae Evolution – BromEvo II (Natal, Brazil, 2018).: Botanical Journal of the Linnean Society, 2020. v. 192. pp. 587-588.
- Vieira, E. A., Silva, M. G., Gomes, A. S., Urakawa, A. H., Barros, A. L.** 2021 Carbon-nitrogen metabolism and oxidative stress in young plants of *Dipteryx alata* Vog. subjected to seasonal water regimes in the Cerrado. Environmental and Experimental Botany. v. 183. pp. 104361.
- Wadgyamar, S.M., Ogilvie, J.E., Inouye, D.W., Weis, A.E., Anderson, J.T.** 2018. Phenological responses to multiple environmental drivers under climate change: Insights from a long-term observational study and a manipulative field experiment. New Phytologist. v. 218. pp.517–529.
- Wagner, K., Zotz, G.** 2018. Epiphytic bromeliads in a changing world: The effect of elevated CO₂ and varying water supply on growth and nutrient relations.: Plant Biology. v.20. pp. 636-640.
- Weatherley, P.E.** 1950. Studies in the Water Relations of the Cotton Plant I. The Field Measurements of Water Deficit in Leaves. v.49. pp. 81-97.
- Wellburn, A.R., Lichtenthaler, H.** 1983. Formulae and Program to Determine Total Carotenoids and Chlorophylls A and B of Leaf Extracts in Different Solvents. [ed.] C Sybesma. Advances in Photosynthesis Research. Advances in Agricultural Biotechnology. Dordrecht: Springer. v.2. pp. 9-12.
- Winter, K., Holtum, J. A.** 2002. How closely do the $\delta^{13}\text{C}$ values of crassulacean acid metabolism plants reflect the proportion of CO₂ fixed during day and night?. Plant Physiology. v. 129. pp.1843-1851.
- Yadav, A.K., Carroll, A.J., Estavillo, G.M., Rebetzke, G.J., Pogson, B.J.,** 2019. Wheat drought tolerance in the field is predicted by amino acid responses to glasshouse imposed drought. Environmental and Experimental Botany. v. 70. Pp. 4931–4947.

Zandalinas, S.I., Fritschi, F. B., Mittler, R., 2021. Global Warming, Climate Change, and Environmental Pollution: Recipe for a Multifactorial Stress Combination Disaster, Trends in Plant Science, v. 26, pp. 588-599.

Zotz, G., 2013. The systematic distribution of vascular epiphytes – a critical update, Botanical Journal of the Linnean Society. v. 171. pp. 453–481.

Zotz, G. 2016. Plants on plants-the biology of vascular epiphytes. 1th edn. Cham: Springer International Publishing. v.15. 282 p

8. Anexos

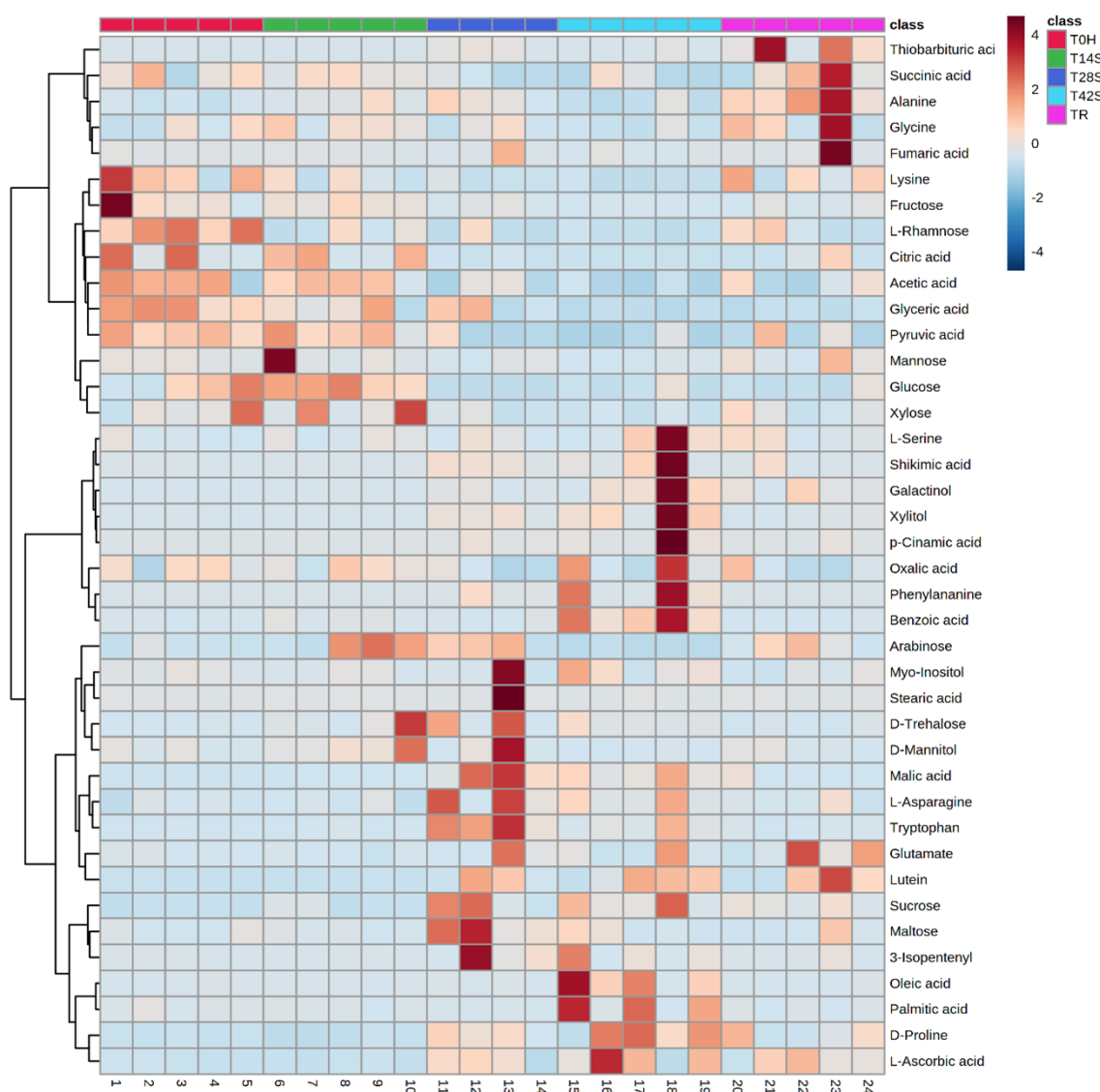


Figura 15: Heatmap e clustering tree das mudanças no perfil metabólico em folhas de *A. pitcairnioides* submetidas à seca por período de 42 dias e 96 h após a reidratação. As cores representam a abundância (vermelho, mais alto; azul, mais baixo; branco, sem alteração). As linhas no mapa de calor foram reordenadas de acordo com o agrupamento hierárquico de compostos como representado no dendrograma.

Metabolite Sets Enrichment Overview

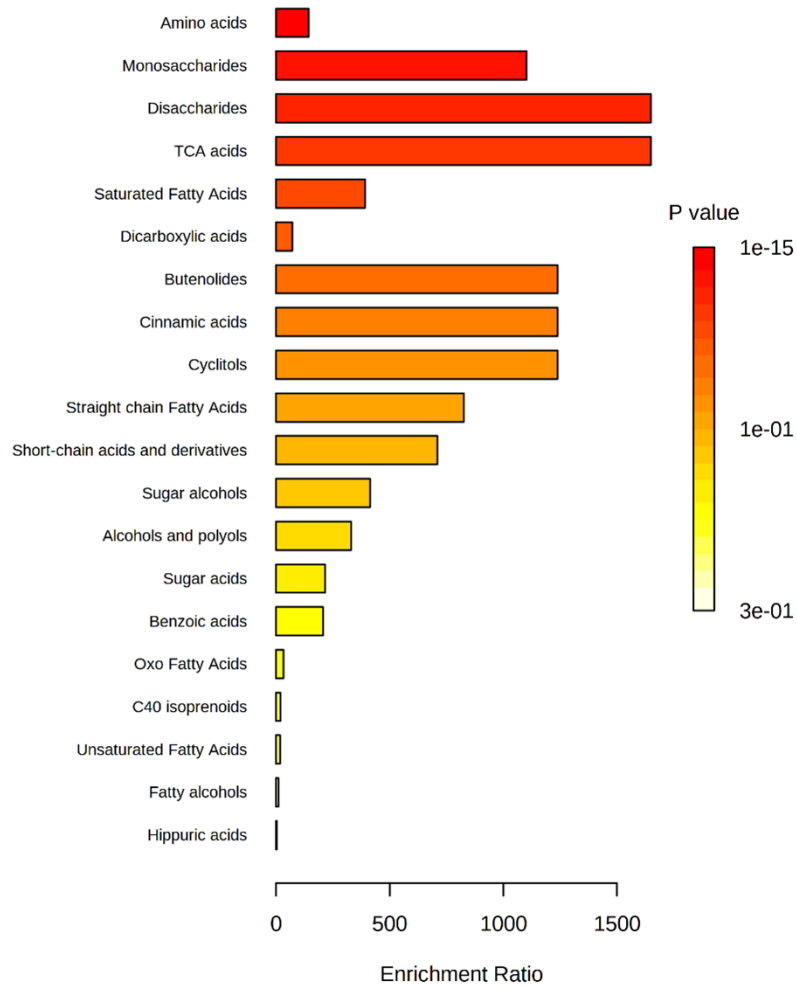


Figura 16: Análise de enriquecimento de metabólitos em folhas de *A. pitcairnioides* submetidas à seca por período de 42 dias e 96 h após a reidratação.