



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Botânica

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



CLEBER JULIANO NEVES CHAVES

ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS DA TERMOTOLERÂNCIA DE BROMÉLIAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Área de Concentração Ecofisiologia e Fitoquímica

BELO HORIZONTE – MG

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Botânica

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



CLEBER JULIANO NEVES CHAVES

ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS DA TERMOTOLERÂNCIA DE BROMÉLIAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Área de Concentração Ecofisiologia e Fitoquímica

Orientador: Prof. Dr. José Pires de Lemos Filho
Universidade Federal de Minas Gerais

BELO HORIZONTE – MG

2013

“Conditions change.

Species move.

Every leaf is a work in progress.”

(Rob Dunn)

AGRADECIMENTOS

Todo o trabalho realizado durante esses dois anos são oriundos da ajuda e do convívio com muitas pessoas. Agradeço muito ao prof. José Pires pela orientação, pelas ideias, pelas conversas, pela disponibilidade e, principalmente, pelo compartilhamento de seu imenso conhecimento. Agradeço à profa. Andréa Marques pela orientação anterior ao mestrado e por ter incitado em mim uma verdadeira paixão pelas bromélias, as “meninas”. À Bárbara Leal não tenho palavras que expressem tamanha gratidão a ela ter sido, além de namorada, “coorientadora”, “IC”, “chefe”, “revisora”, “professora de inglês”, colega, amiga, companheira de campo e por ser meu grande amor. Agradeço ao padre Nédio e à irmã Vanda do Santuário Nossa Senhora da Piedade, pela atenção e grande receptividade que muito contribuíram para as minhas estadas na Serra da Piedade. Agradeço, ainda, aos colegas do Laboratório de Fisiologia Vegetal, alunos e professores, em especial àqueles que “com uma ajudinha ali e outra acolá” auxiliaram no meu trabalho: Ana Paula, Érica, Gisele, Janinha, profa. Luzia, prof. Marcel, Silvana, Socorro e Tharso. Agradeço, também, aos colegas do Laboratório de Anatomia Vegetal pelo auxílio e pelas dicas anatômicas: Advânio, Ariane, Bruno, prof. Fernando, Lucimara, Renê (também pelo inglês) e Vinícius. E ainda ao Dé e aos colegas do Laboratório de Fisiologia, prof. Cleber, Deborah, Juliana e Priscila, que muito me ajudaram em um trabalho que, infelizmente, teve que ser abortado.

Agradeço à vida, por ser tão bela e tão complexa. O que possibilita a muitas pessoas, como eu, passarem parte de nossas existências tentando compreendê-la. Mas isso não seria possível sem auxílio financeiro. Agradeço, portanto, às instituições financiadoras, CAPES, Fapemig e CNPq, e, conseqüentemente ao povo brasileiro, que contribuíram para a minha bolsa e para o financiamento das minhas ferramentas de pesquisa, campos e congressos.

Nem só de trabalho se faz uma dissertação. Agradeço imensamente a todas as pessoas que conviveram comigo durante esses dois anos de mestrado (MUITAS!), principalmente à minha família (e meus cachorros!), que teve que aturar tantos momentos de cansaço e estresse. À minha irmã, Bárbara Chaves, em especial, pelo exemplo e por tantas conversas e incentivos. Quanto aos colegas/amigos, como dizer que festas, almoços de marmita ou no bandeirão, cafés da Sistemática e até passeios e bebedeiras pós-congressos não contribuíram para este trabalho? Agradeço aos colegas da biologia e dos Laboratórios de Fisiologia Vegetal, de Biosistemática, de Sistemática

Vegetal, de Anatomia Vegetal, de Ecologia Vegetal, de Ficologia e até de Recuperação de Áreas Degradadas que proporcionaram esses momentos únicos. Sem vocês esse mestrado seria bem mais árduo, muito obrigado por não deixarem que isso acontecesse!

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	1
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO GERAL	5
CAPÍTULO I. Seriam as plantas CAM beneficiadas pelo aquecimento global? Estudo morfofisiológico comparativo, com ênfase na termotolerância de bromélias C ₃ e CAM em um campo rupestre com diferentes níveis de sombreamento	17
CAPÍTULO II. Aspectos da termotolerância de <i>Aechmea blanchetiana</i> (Baker) L.B. Sm., uma bromélia CAM.....	49
CAPÍTULO III. Relações entre acidez titulável e a tolerância do fotossistema II a temperaturas extremas em uma bromélia CAM.....	80
CONSIDERAÇÕES FINAIS	105

RESUMO GERAL

As mudanças climáticas em curso terão impactos irreversíveis ao meio ambiente e podem ter um efeito benéfico na ampliação de habitats e na produtividade de plantas CAM. No entanto, pouco se sabe a respeito da termotolerância de espécies com esse metabolismo. O presente trabalho buscou compreender vários aspectos que influenciam a termotolerância fotossintética de bromélias CAM. No primeiro capítulo, foram comparadas as termotolerâncias de espécies de bromélias CAM e C₃, em ambientes mais ou menos expostos ao sol e em estações distintas. Apesar de a maior termotolerância ter sido registrada em indivíduos de sombra da espécie CAM, *Aechmea nudicaulis*, os seus indivíduos a pleno sol apresentaram uma termotolerância similar à observada nas bromélias C₃, *Vriesea bituminosa* e *V. minarum*. Os resultados sugerem que, no ambiente estudado, bromélias CAM não são mais termotolerantes do que bromélias C₃. Variações sazonais da termotolerância foram observadas somente na espécie C₃ de ambiente sombreado, *Vriesea bituminosa*. Além disso, foram evidenciadas grandes diferenças entre os valores diários da termotolerância dos indivíduos a pleno sol de *A. nudicaulis*, o que parece ser devido às maiores variações diárias da temperatura nesse ambiente. Não foram detectadas, porém, fortes relações entre a termotolerância e outras variáveis fisiológicas. Dessa forma, o metabolismo CAM, por si só, parece não ser responsável pela elevação da termotolerância das plantas que o possuem e diferentes taxas de exposição solar podem, possivelmente, resultar em variações na termotolerância de bromélias.

No segundo capítulo, investigou-se, principalmente, as variações da termotolerância em diferentes regiões e orientações foliares de uma bromélia CAM cultivada, *Aechmea blanchetiana*. Foram detectadas os maiores valores de termotolerância na porção basal das folhas. Esses resultados, juntamente às diferenças observadas em outras variáveis entre as regiões foliares, corroboram com a já proposta existência de partição funcional ao longo das folhas de bromélias com tanque. É sugerida, também, a existência de uma estratégia contra danos provocados por temperaturas extremas ao meristema foliar, que está localizado na base foliar dessas plantas. Uma alta variação diária da termotolerância também foi registrada para *A.*

blanchetiana, com os maiores valores ocorrendo no período da tarde. A partir dos resultados obtidos, foi proposta uma grande influência do acúmulo de ácidos orgânicos na termotolerância de *A. blanchetiana*, onde diversas variáveis que influenciam a acidez titulável podem indiretamente afetar a termotolerância.

O terceiro capítulo teve, por fim, o objetivo de investigar, por meio de experimentos controlados, a aclimação de frações foliares de *A. blanchetiana* mantidas a distintas temperaturas e verificar a sua influência no acúmulo de ácidos orgânicos e na termotolerância a altas e baixas temperaturas. As amostras apresentaram uma rápida resposta aclimatativa da termotolerância e da acidez titulável a alterações de temperatura. Relações significativas entre a acidez titulável e a termotolerância, a altas e baixas temperaturas, bem como entre essas duas variáveis e a temperatura ambiente também foram detectadas. Além disso, foi observada uma maior termotolerância da base foliar a temperaturas extremas e uma maior aclimação do ápice foliar a variações de temperaturas não extremas (10-35°C). Esses resultados demonstram a complexidade da termotolerância de bromélias CAM e abrem novas perspectivas de estudos que esclareçam esse mecanismo.

Palavras-chave: Bromeliaceae, termotolerância fotossintética, metabolismo CAM, mudanças climáticas, metabolismo C3, aquecimento global, bromélias, regiões foliares, *Aechmea nudicaulis*, *Aechmea blanchetiana*, *Vriesea minarum*, *Vriesea bituminosa*, Serra da Piedade

ABSTRACT

Ongoing climate changes will have irreversible impacts on the environment and may have a beneficial effect on the expansion of habitats and productivity of CAM plants. However, little is known about thermotolerance of species with this type of metabolism. This study aimed to understand various aspects that influence the photosynthetic thermotolerance of CAM bromeliads. In the first chapter, we compared the thermotolerance of CAM and C₃ bromeliads at more or less light exposed habitats, during distinct seasons. Despite the fact that the highest thermotolerance has been recorded in shaded individuals of *Aechmea nudicaulis*, a CAM species, the thermotolerance of the exposed ones was similar to the observed at C₃ bromeliads, *Vriesea bituminosa* and *V. minarum*. Our results suggest that, at the studied site, CAM bromeliads are not more thermotolerant than C₃ bromeliads. Seasonal variations of thermotolerance were observed only for the C₃ species that occur exclusively at shaded habitat, *Vriesea bituminosa*. Moreover, great differences were observed in daily thermotolerance values of exposed individuals of *A. nudicaulis*, which seems to be due to variations in temperature during the day. Nevertheless, no strong relationships were found between the thermotolerance and other physiological variables. Therefore, CAM metabolism itself does not seem to be responsible for increasing thermotolerance of the CAM plants, and different rates of sun exposure may possibly result in variations of bromeliads' thermotolerance.

In the second chapter, we also investigated the variations of thermotolerance in different regions and different orientations of the leaves of the cultivated CAM bromeliad, *Aechmea blanchetiana*. The highest rates of thermotolerance were detected in the basal portion of the leaves. These results, along with the differences observed for other variables between leaf regions, corroborate the proposal of a functional partition along the leaves of tank bromeliads. The existence of a strategy against heat damage on the meristem located at the base of the leaves is also hypothesized. A high daily variation of thermotolerance was recorded for *A. blanchetiana*, with the highest values occurring in the afternoon. Based on the results obtained herein, it was proposed that the thermotolerance is influenced by the accumulation of organic acids and, indirectly, by others variables that affect titrable acidity.

The third chapter aimed to investigate, through controlled experiments, the acclimation of leaf fractions of *A. blanchetiana* kept at different temperatures and to

verify its influence on the organic acids accumulation and on the high- and low-temperature thermotolerance. Leaf samples exhibited a rapid acclimation of thermotolerance and titrable acidity in reaction to temperature variation. Significant relationships were detected between acidity and tolerance to heat and cold, as well as between these variables and ambient temperature. Finally, the leaf base was found to be highly thermotolerant to extreme temperatures, while the leaf apex presents a high acclimation to non-extreme temperature variations (10-35°C). These results demonstrate the complexity of thermotolerance in CAM bromeliads and open new perspectives for studies to clarify this mechanism.

Key words: Bromeliaceae, photosynthetic thermotolerance, CAM metabolism, climate change, C3 metabolism, global warming, bromeliads, leaf regions, *Aechmea nudicaulis*, *Aechmea blanchetiana*, *Vriesea minarum*, *Vriesea bituminosa*, Serra da Piedade

INTRODUÇÃO GERAL

O aumento de cerca de 0,75°C na temperatura média global observado no último século (IPCC, 2007) e o progressivo aumento de cerca de 1 a 3°C na temperatura máxima global, apenas na primeira metade do século 21 (IPCC, 2012) terá impactos irreversíveis no meio ambiente. O aumento da frequência de eventos com temperaturas extremamente altas (como dias quentes e ondas de calor) observados nos últimos 50 anos (IPCC, 2007), impactou os ecossistemas (Sage & Kubien, 2003; Song *et al.*, 2010), com alterações nos padrões reprodutivos, migratórios e na distribuição de animais e plantas (Root *et al.*, 2003; Parmesan & Yohe, 2003; Parmesan, 2006; Houghton, 2009; Offord, 2011; Pécrix *et al.*, 2011).

A temperatura é uma das variáveis ambientais com maior destaque para a determinação da distribuição de espécies. Plantas de habitats termicamente contrastantes apresentam diferenças consideráveis na resposta fotossintética (Berry & Bjorkman, 1980; Braun *et al.*, 2002; Knight & Ackerly, 2002). Plantas nativas de locais com grande variação de temperatura tendem a possuir uma maior tolerância potencial (geneticamente determinada) a alterações da temperatura ambiente do que plantas restritas a habitats com temperaturas mais constantes (Berry & Björkman, 1980). A variação climática histórica durante a evolução das plantas terrestres pode ter favorecido espécies com grande capacidade de aclimação plástica (Knight & Ackerly, 2002). Espécies de plantas atuais com história evolutiva recente poderiam não serem capazes de elevar seus limites de temperatura como resposta ao aquecimento global, já que as alguns taxa tropicais experimentaram, durante o pleistoceno, um resfriamento global (Malhi & Phillips, 2004). Entretanto, comunidades de plantas que toleraram as mudanças climáticas do início do Holoceno-médio, quando houve um rápido aumento da temperatura nos trópicos (Zachos *et al.*, 2003) a uma taxa semelhante à projetada para o século XXI, podem, portanto, fornecer pistas sobre sua relativa tolerância ao aquecimento global previsto para este século (Mayle *et al.*, 2004). Utilizando modelos climáticos e de vegetação do passado recente Cowling *et al.* (2004) sugeriram que as florestas tropicais poderiam estar, atualmente, próximas do limite superior de sua faixa de temperatura ótima.

Oscilações de temperatura abaixo de 0°C ou acima de 35°C, limite padrão de normalidade dos processos fisiológicos vegetais, podem causar injúrias à maioria das

plantas atuais (Went, 1953; Berry & Bjorkman, 1980). Injúrias, ligadas a alta temperatura, foram classificadas por Wahid *et al.* (2007) como diretas (e.g. aumento da fluidez das membranas lipídicas e desnaturação e agregação de proteínas) e indiretas (e.g. desativação de enzimas nos cloroplastos e mitocôndrias, perda da integridade da membrana e inibição da síntese e degradação de proteínas). Injúrias provocadas por altas temperaturas ao funcionamento e à integridade do cloroplasto podem ser resultantes de uma queda da semipermeabilidade das membranas o que causa mudanças adversas no cloroplasto, com alterações no pH ou na composição iônica (Berry & Björkman, 1980). O aumento da energia cinética e do movimento de moléculas através das membranas, provocados pela elevação da temperatura, afrouxa as ligações químicas dentro das moléculas das membranas biológicas, tornando bicamada lipídica mais fluida pela desnaturação de proteínas ou pelo aumento de ácidos graxos insaturados (Savchenko *et al.*, 2002). Processos como a síntese de proteínas e ribossomos ocorrem nas membranas do cloroplasto e podem, portanto, ser afetados por alterações estruturais promovidas pelas alterações de temperatura (Millerd *et al.*, 1969).

Dentre os processos fisiológicos vegetais, a fotossíntese é o mais afetado pelo aumento de temperatura e pode ser, até mesmo, totalmente inibida antes mesmo que qualquer outro sintoma de estresse possa ser detectado (Björkman, 1975). Atividades enzimáticas são perdidas e funções das membranas fotossintetizantes são alteradas em temperaturas logo além da faixa ótima de uma planta, injúrias mais severas e o colapso da integridade celular ocorrem em temperaturas muito além desse limite (Berry & Björkman, 1980). Os danos iniciais por altas temperaturas são ocasionados por lesões específicas do aparato fotossintético. O Fotossistema II (PSII) é a estrutura desse aparato com mais sensibilidade ao aquecimento. A inativação do Fotossistema I (PSI) por altas temperaturas só é detectada quando o PSII se encontra completamente inativo (Berry & Björkman, 1980). Outra consequência consiste na dissociação do complexo responsável pela evolução do oxigênio (OEC) resultando em um desbalanço entre o fluxo de elétrons do OEC para a região acceptora do PSII em direção ao centro de reação do PSI (De Ronde *et al.*, 2004). Essa disrupção no transporte de elétrons faz com que uma proporção de elétrons, maior que o normal, decaia e, por consequência, aumente a fluorescência da folha (Bukhov *et al.*, 1990; Schreiber & Armond, 1978; Yamane *et al.*, 2000). Dessa forma, a razão entre a fluorescência variável e a fluorescência máxima

(F_v/F_m) e a fluorescência base (F_0) são parâmetros fisiológicos frequentemente utilizados em estudos de tolerância vegetal (Yamada *et al.*, 1996).

A performance da fotossíntese em altas temperaturas é limitada por diversos fatores ambientais como o status hídrico (Havaux, 1992; Valladares & Pearcy, 1997), a temperatura de crescimento (Downton *et al.*, 1984; Seemann *et al.*, 1986), o nível de precipitação (Knight & Ackerly, 2002; Seemann *et al.*, 1986) e a intensidade de radiação solar (Havaux, 1992; Weis, 1982). Plantas submetidas a estresses ocasionados pela falta ou pelo excesso desses fatores ambientais podem, inclusive, desenvolver maior termotolerância (Helmuth, 1971; Ladjal *et al.*, 2000; Wahid *et al.*, 2007). As respostas das plantas ao stress por altas temperaturas podem ser morfológicas, anatômicas e fisiológicas. O atraso na germinação de sementes ou a perda de seu vigor na emergência e estabelecimento (Wahid *et al.*, 2007) e a redução da massa seca e da taxa de crescimento (Ashraf & Hafeez, 2004; Wahid *et al.*, 2007) são classificadas como respostas morfológicas, enquanto que a redução do tamanho da célula, o fechamento dos estômatos e o aumento na densidade de tricomas e estômatos (Bañon *et al.*, 2004; Natarajan & Kuehny, 2008) podem ser classificadas como respostas anatômicas. As respostas fisiológicas, por sua vez, podem estar associadas com o acúmulo de osmólitos compatíveis, como açúcares, prolina e compostos amoníacos terciários e quaternários, que auxiliam na elevação da termotolerância (Sairam & Tyagi, 2004). Além disso, imediatamente após a exposição de plantas a altas temperaturas, e a percepção de sinais bioquímicos específicos, ocorrem mudanças ao nível molecular que alteram a expressão de genes e o acúmulo de transcritos, conduzindo assim, à síntese de proteínas relacionadas ao estresse (Iba, 2002), as HSPs (*Heat Shock Proteins*). Estas proteínas estão estreitamente ligadas à proteção, não somente de plantas, contra o estresse térmico e na manutenção da homeostase (Marimoto & Tissières, 1994). O efeito protetor das HSPs pode ser atribuído à cadeia da maquinaria de chaperonas, que desempenham vários papéis no dobramento, montagem, localização intracelular, secreção, regulação e degradação de outras proteínas (Gething, 1998).

Plantas manifestam diferentes mecanismos para sobreviver a altas temperaturas, incluindo, a longo prazo, adaptações evolutivas (fenológicas e morfológicas) e, a curto prazo, mecanismos de evitação e aclimação (modificação da orientação de folhas, resfriamento por transpiração e alterações da composição lipídica das membranas) (Wahid *et al.*, 2007). A saturação da membrana lipídica em maior ou menor grau, é

considerada um importante elemento na tolerância a altas temperaturas (Klueva *et al.*, 2001). Quando plantas são expostas a ambientes estressantes, como os com altas temperaturas, as xantofilas (violaxantinas, anteroxantinas e zeaxantinas) se dividem entre os complexos de coleta de luz e a fase lipídica das membranas dos tilacóides, o que resulta num decréscimo da fluidez da membrana e da susceptibilidade à peroxidação dos lipídios sob altas temperaturas (Havaux, 1998).

Estudos realizados no passado sugeriam que o aumento da temperatura causa uma elevação na taxa de proteólise em plantas, que eleva o acúmulo de nitrogênio solúvel nos tecidos, particularmente amônia, que intoxica a planta (Henckel, 1964; Lahiri & Singh, 1969; Prianishnikov, 1945). Segundo Prianishnikov (1945), a existência de um mecanismo eficiente para elevar a formação de amida seria prevista como uma medida para tornar essa amônia (decorrente da degradação de proteínas) inofensiva. O efeito protetor dos ácidos orgânicos, como o ácido cítrico e málico, contra injúrias por altas temperaturas foi levantado por Petinov & Molotkovsky (1957, 1959), em que esses compostos reagiriam com os íons da amônia formada. O produto desse processo seriam sais orgânicos e, posteriormente, amidas. Segundo Petinov & Molotkovsky (1959), os ácidos orgânicos são o substrato para a síntese de amidas, sem a qual nenhuma proteína é sintetizada. A síntese de ácidos orgânicos seria, portanto, a essência da reação de proteção a altas temperaturas das plantas mais resistentes a esse tipo de estresse.

Plantas com metabolismo fotossintético do tipo CAM (Metabolismo Ácidos das Crassuláceas) são conhecidas pela captação, fixação e estoque vacuolar de CO₂ na forma de ácidos orgânicos (principalmente ácido málico), através da abertura noturna do estômato, e pela remobilização desses ácidos do vacúolo para o citosol, para a descarboxilação, refixação e assimilação do CO₂ obtido no ciclo de Calvin, durante o dia, quando os estômatos permanecem fechados (Osmond, 1978). A habilidade do acúmulo de ácido málico no vacúolo depende, dentre outros fatores, da fluidez do tonoplasto (Kluge *et al.*, 1991). O estoque noturno de ácido málico é facilitado pela rigidez relativa dessa membrana nesse período (Kliemchen *et al.*, 1993). Enquanto a importação vacuolar de ácido málico é feita por transporte ativo (Lüttge, 1987), a exportação é passiva, através dos domínios lipídicos do tonoplasto (Lüttge & Smith, 1984). A taxa de efluxo passivo é diretamente proporcional ao gradiente de concentração através do tonoplasto e inversamente proporcional à resistência dessa membrana (Kliemchen *et al.*, 1993). Plantas CAM sujeitas a altas temperaturas

apresentam um aumento da fluidez do tonoplasto e, conseqüentemente, uma elevação de sua permeabilidade, que leva à descompartimentação dos ácidos orgânicos, prejudiciais a diversos mecanismos e estruturas do citosol (Friemert *et al.*, 1988; Kappen & Lösch, 1984). Uma perda completa da compartimentação vacuolar, mais que uma elevação da permeabilidade a prótons, dá origem a um colapso na diferença da concentração de prótons através da membrana do tonoplasto (Behzadipour *et al.*, 1998). Porém, a aclimatação a altas temperaturas, que pode ocorrer após poucas horas de exposição a esse estresse (Behzadipour *et al.*, 1998), reduz a fluidez do tonoplasto e, paralelamente, reduz a mobilização de ácido málico nos vacúolos (Behzadipour *et al.*, 1998; Kliemchen *et al.*, 1993).

O metabolismo do tipo CAM é amplamente difundido entre as plantas. Pelo menos 343 gêneros em 35 famílias, que englobam cerca de 6% das angiospermas apresentam esse metabolismo (Holtum *et al.*, 2007). A maioria dos registros de metabolismo do tipo CAM tem sido feita em membros da família Bromeliaceae, mais do que em qualquer outra família (Martin, 1994). Certamente o metabolismo CAM, juntamente com outras características, como o pequeno corpo vegetativo, hábito rizomatoso, propensão à heterocronia/heterofilia, fitotelma (acúmulo de água em um tanque formado pelo imbricamento das bainhas foliares) e tricomas foliares absortivos, propiciou o grande sucesso das bromélias em habitats diversos e sujeitos a vários tipos de estresse (Benzing, 2000), como o estresse por altas temperaturas, aqui discutido.

A importância das bromélias para os ecossistemas é indiscutível. A presença do fitotelma, em muitas espécies, promove mudanças bióticas no habitat, pela produção de um ambiente com fornecimento de água e outros recursos para outras formas de vida, vegetais, animais e microscópicas (Benzing, 2000; Brighigna *et al.*, 1992; Cotgreave *et al.*, 1993; Domingues *et al.*, 1989; Foissner, 2003; Galindo-Leal *et al.*, 2011; Glio *et al.*, 2010; Goffredi *et al.*, 2010; Greeney, 2001; Kitching, 2000; Leroy, 2009; Lopez *et al.*, 2009). Além disso, muitos estudos indicam a participação de bromélias na sucessão vegetal (Jacobi *et al.*, 2007; Sampaio *et al.*, 2005a; Sampaio *et al.*, 2005b; Scarano *et al.*, 1997), fornecendo recursos e provendo abrigo contra altas temperaturas que podem prejudicar o estabelecimento de plantas menos tolerantes a locais com condições mais severas (Benzing, 2000; Sampaio *et al.*, 2005). Estudar, portanto, os fatores relacionados à termotolerância de bromélias não faz deste trabalho apenas um estudo inédito, envolvendo variáveis morfológicas e fisiológicas, típicas da família, na resposta

a elevações de temperaturas. Este trabalho nos auxilia a compreender os aspectos que possivelmente influenciam as bromélias, e conseqüentemente todas as formas de vida relacionadas a elas, a resistir às mudanças climáticas em curso.

Esta dissertação foi dividida em três capítulos. No primeiro, o objetivo foi comparar a termotolerância de espécies de bromélias com metabolismo C_3 e CAM, em seu habitat natural, ocorrentes em ambientes mais ou menos expostos à radiação solar e em estações com disponibilidade de água distintas. No segundo estudo, o objetivo principal foi investigar variações da termotolerância e de outros aspectos morfofisiológicas ao longo do corpo vegetal de bromélias CAM. O terceiro estudo teve, por fim, o objetivo de verificar, em um ambiente com temperatura e suprimento de água controlados, a influência da aclimação, sob temperaturas distintas, no metabolismo CAM e na termotolerância. Cada capítulo possui, portanto, graus de controle das variáveis externas diferenciados, desde a sua ausência, no primeiro, até o controle do suprimento de água, luz e temperatura, no último.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ashraf, M., & Hafeez, M. 2004. Thermotolerance of Pearl Millet and Maize at Early Growth Stages: Growth and Nutrient Relations. *Biologia Plantarum*, 48(1): 81–86.
- Bañon, S., Fernandez, J. A., Franco, J. A., Torrecillas, A., Alarcón, J. J., & Sánchez-Blanco, M. J. 2004. Effects of water stress and night temperature preconditioning on water relations and morphological and anatomical changes of *Lotus creticus* plants. *Scientia Horticulturae*, 101: 333–342.
- Behzadipour, M., Ratajczak, R., Faist, K., Pawlitschek, P., Trémolières, A., & Kluge, M. 1998. Phenotypic adaptation of tonoplast fluidity to growth temperature in the CAM plant *Kalanchoë daigremontiana* Ham. et Per. is accompanied by changes in the membrane phospholipid and protein composition. *Journal of Membrane Biology*, 166: 61–70.
- Benzing, D. H. 2000. *Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation*: 710. Cambridge: Cambridge University Press.
- Berry, J. A., & Björkman, O. 1980. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 31: 491–543.
- Björkman, O. 1975. Photosynthetic responses of plants from contrasting thermal environments. Thermal stability of the photosynthetic apparatus in intact leaves. *Carnegie Institution of Washington Year Book*, 74: 748–751.
- Braun, V., Buncher, O., & Neuner, G. 2002. Thermotolerance of photosystem 2 of three alpine species under field conditions. *Photosynthetica*, 40(4): 587–549.
- Brighigna, L., Montaini, P., Favilli, F., & Trejo, A. C. 1992. Role of the Nitrogen-Fixing Bacterial Microflora in the Epiphytism of *Tillandsia* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany*, 79(7): 723.
- Bukhov, N. G., Sabat, S. C., & Mohanty, P. 1990. Analysis of chlorophyll a fluorescence changes in weak light in heat treated *Amaranthus* chloroplasts. *Photosynthesis research*, 23: 81–87.
- Cotgreave, P., Hill, M. J., & Middleton, D. A. J. 1993. The relationship between body size and population size in bromeliad tank faunas. *Atlantic*, 367–380.
- Cowling, S. a, Betts, R. a, Cox, P. M., Ettwein, V. J., Jones, C. D., Maslin, M. a, et al. 2004. Contrasting simulated past and future responses of the Amazonian forest to atmospheric change. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 359(1443): 539–47.
- De Ronde, J. A., Cress, W. A., Krüger, G. H. J., Strasser, R. J., & Van Staden, J. 2004. Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an Arabidopsis P5CR gene, during heat and drought stress. *Journal of Plant Physiology*, 161: 1211–1224.

- Domingues, R., Pugialli, H., & Dietz, J. 1989. Densidade e diversidade de fauna fitotelmata em bromélias de quatro tipos de florestas degradadas. *Revista Brasileira de Biologia*, 49(1): 125–129.
- Downton, W. J. S., Berry, J. A., & Seemann, J. R. 1984. Tolerance of photosynthesis to high temperature in desert plants. *Plant physiology*, 74(4): 786–90.
- Foissner, W. 2003. Endemic ciliates (Protozoa, Ciliophora) from tank bromeliads (Bromeliaceae): a combined morphological, molecular, and ecological study. *European Journal of Protistology*, 39(4): 365–372.
- Friemert, V., Heininger, D., Kluge, M., & Ziegler, H. 1988. Temperature effects on malic-acids efflux from the vacuoles and on the carboxylation pathways in Crassulacean-acid-metabolism plants. *Planta*, 174(4): 453–461.
- Galindo-leal, C., Cedeño-vázquez, J. R., Calderón, R., & Augustine, J. 2011. Arboreal frogs, tank bromeliads and disturbed seasonal tropical forest. *Contemporary Herpetology*, (1): 1–9.
- Gething, M.-J. (Ed.). 1998. *Guidebook to molecular chaperones and protein-folding catalysts*: 584. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Glio, S. A. R. F., Bar, I. G. N. M., & Montero, G. M. O. 2010. The phytotelmata and foliage macrofauna assemblages of a bromeliad species in different habitats and seasons. *Diversity*, 92–102.
- Goffredi, S. K., Kantor, A. H., & Woodside, W. T. 2010. Aquatic Microbial Habitats Within a Neotropical Rainforest: Bromeliads and pH-Associated Trends in Bacterial Diversity and Composition. *Environmental Microbiology*.
- Greeney, H. F. 2001. The insects of plant-held waters: a review and bibliography. *Journal of Tropical Ecology*, 17(02): 241–260.
- Havaux, M. 1992. Stress tolerance of photosystem II in vivo. Antagonistic Effects of water, heat, and photoinhibition stresses. *Plant Physiology*, 100: 424–432.
- Havaux, M. 1998. Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends in Plant Science*, 3(4): 147–151.
- Helmuth, E. O. 1971. Eco-physiological studies on plants in arid and semi-arid regions in western Australia: V. Heat resistance limits of photosynthetic organs of different seasons, their relation to water deficits and cell sap properties and the regeneration ability. *Journal of Ecology*, 59(2): 365–374.
- Henckel, P. A. 1964. Physiology of plants under drought. *Annual Review of Plant Physiology*, 15: 363–386.
- Holtum, J. A. M., Winter, Kl., Weeks, M. A., & Sexton, T. R. 2007. Crassulacean acid metabolism in the ZZ plant *Zamioculcas zamiifolia* (Araceae). *American Journal of Botany*, 94(10): 1670–1676.

- Houghton, J. 2009. *Global Warming: The Complete Briefing. Bulletin of the American Meteorological Society* (4th ed.): 437. Cambridge: Cambridge University Press.
- Iba, K. 2002. Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 53: 225–245.
- IPCC. 2007. Summary for Policymakers. In M. L. Parry, O. F. Canzianik, J. P. Palutikof, P. J. van der Linden, & C. E. Hanson (Eds.), *Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*: 7–22. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- IPCC. 2012. *Managing the Risks of Extreme Events and Disasters to Advance Climate Change Adaptation. A Special Report of Working Groups I and II of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. (C. B. Field, V. Barros, T. F. Stocker, D. Qin, D. J. Dokken, K. L. Ebi, et al., Eds.): 582. Cambridge, UK and New York, USA: Cambridge University Press.
- Jacobi, C. M., Carmo, F. F., Vincent, R. C., & Stehmann, J. R. 2007. Plant communities on ironstone outcrops: a diverse and endangered Brazilian ecosystem. *Biodiversity and Conservation*, 16(7): 2185–2200.
- Kappen, L., & Lösch, R. 1984. Diurnal patterns of heat tolerance in relation to CAM. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 114(1): 87–96.
- Kitching, R. L. 2000. *Food webs and container habitats: the natural history and ecology of phytotelmata*: 431. Cambridge University Press.
- Kliemchen, A., Schomburg, M., Galla, H. J., Lüttge, U., & Kluge, M. 1993. Phenotypic changes in the fluidity of the tonoplast membrane of crassulacean-acid-metabolism plants in response to temperature and salinity stress. *Planta*, 189(3): 403–409.
- Klueva, N. Y., Maestri, E., Marmioli, N., & Nguyen, H. T. 2001. Mechanisms of thermotolerance in crops. In A. S. Basra (Ed.), *Crop Responses and Adaptations to Temperature Stress*. 177–217. Binghamton, NY: Food Products Press.
- Kluge, M., Kliemchen, A., & Galla, H. J. 1991. Temperature effects on crassulacean acid metabolism: EPR spectroscopic studies on the thermotropic phase behaviour of the tonoplast membranes of *Kalanchoë daigremontiana*. *Botanica acta*, 104(5): 355–360.
- Knight, C. A., & Ackerly, D. D. 2002. An ecological and evolutionary analysis of photosynthetic thermotolerance using the temperature-dependent increase in fluorescence. *Oecologia*, 130(4): 505–514.
- Krause, G. H., & Santarius, K. a. 1975. Relative thermostability of the chloroplast envelope. *Planta*, 127(3): 285–299.

- Ladjal, M., Epron, D., & Ducrey, M. 2000. Effects of drought preconditioning on thermotolerance of photosystem II and susceptibility of photosynthesis to heat stress in cedar seedlings. *Tree physiology*, 20(18): 1235–1241.
- Lahiri, A. N., & Singh, S. 1969. Effect of hyperthermia on the nitrogen metabolism of *Pennisetum typhoides*. *Proceedings of the National Institute of Sciences of India - Part B: Biological Sciences*, 35(2): 131–138.
- Leroy, C. 2009. Ants mediate foliar structure and nitrogen acquisition in a tank-bromeliad. *New Phytologist*, 1124–1133.
- Lopez, L. C. S., Alves, R. R. da N., & Rios, R. I. 2009. Micro-environmental factors and the endemism of bromeliad aquatic fauna. *New Phytologist*, 625: 151–156.
- Lüttge, U. 1987. Carbon dioxide and water demand: Crassulacean Acid Metabolism (CAM), a versatile ecological adaptation exemplifying the need for integration in ecophysiological work. *New Phytologist*, 106: 593–629.
- Lüttge, U., & Smith, J. A. C. 1984. Mechanism of passive malic-acid efflux from vacuoles of the CAM plant *Kalanchoë daigremontiana*. *Journal of Membrane Biology*, 81: 149–158.
- Malhi, Y., & Phillips, O. L. 2004. Tropical forests and global atmospheric change: a synthesis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 359(1443): 549–55.
- Marimoto, R. I., & Tissières, A. 1994. *The Biology of heat shock proteins and molecular chaperones*. (R. I. Morimoto, A. Tissières, & C. Georgopoulos, Eds.): 610. Michigan, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Martin, C. E. 1994. Physiological ecology of the Bromeliaceae. *The Botanical Review*, 60(1): 1–82.
- Mayle, F. E., Beerling, D. J., Gosling, W. D., & Bush, M. B. 2004. Responses of Amazonian ecosystems to climatic and atmospheric carbon dioxide changes since the last glacial maximum. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 359(1443): 499–514.
- Millerd, A., Goodchild, D. J., & Spencer, D. 1969. Studies on a maize mutant sensitive to low temperature II. Chloroplast structure, development, and physiology. *Plant physiology*, 44: 567–583.
- Natarajan, S., & Kuehny, J. S. 2008. Morphological, physiological, and anatomical characteristics associated with heat preconditioning and heat tolerance in *Salvia splendens*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 133(4): 527–534.
- Offord, C. a. 2011. Pushed to the limit: consequences of climate change for the Araucariaceae: a relictual rain forest family. *Annals of botany*.

- Osmond, C. B. 1978. Crassulacean Acid Metabolism: A Curiosity in Context. *Annual Review of Plant Physiology*, 29(1): 379–414.
- Parmesan, C. 2006. Ecological and Evolutionary Responses to Recent Climate Change. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37(2006): 637–669.
- Parmesan, C., & Yohe, G. 2003. A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature*, 421(6918): 37–42.
- Petinov, N. S., & Molotkovsky, Y. G. 1957. Protective reactions in heat-resistant plants induced by high temperatures. *Fiziologiya Rasteny (Plant Physiology)*, 4: 221–225.
- Petinov, N. S., & Molotkovsky, Y. G. 1959. Protective process of heat-resistant plants. *Unesco-Spain Symposium on Plant-Water Relationships in Arid and Semi-Arid Conditions*: 14. Paris, FR.
- Prianishnikov, D. N. 1945. *Nitrogen in the Life of Plants and in the Agriculture of the U.S.S.R.*: 197. The Academy of Science of the U.S.S.R.
- Pécirix, Y., Rallo, G., Folzer, H., Cigna, M., Gudín, S., & Le Bris, M. 2011. Polyploidization mechanisms: temperature environment can induce diploid gamete formation in *Rosa* sp. *Journal of experimental botany*, 62(10): 3587–97.
- Root, T. L., Price, J. T., Hall, K. R., Schneider, S. H., Rosenzweig, C., & Pounds, A. 2003. Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature*, 421(2): 57–60.
- Sage, R. F., & Kubien, D. S. 2003. Quo vadis C4? An ecophysiological perspective on global change and the future of C4 plants. *Photosynthesis research*, 77(2-3): 209–25.
- Sairam, R. K., & Tyagi, A. 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science*, 86(3): 407–421.
- Sampaio, M. C., Araújo, T. F., Scarano, Fabio R., & Stuefer, J. F. 2005. Directional growth of a clonal bromeliad species in response to spatial habitat heterogeneity. *Evolutionary Ecology*, 18(5-6): 429–442.
- Sampaio, M. C., Picó, F. X., & Scarano, Fabio Rubio. 2005. Ramet demography of a nurse bromeliad in Brazilian restingas. *American Journal of Botany*, 92(4): 674–681.
- Savchenko, G. E., Klyuchareva, E. A., Abramchik, L. M., & Serdyuchenko, E. V. 2002. Effect of periodic heat shock on the inner membrane system of etioplasts. *Russian Journal of Plant Physiology*, 49(3): 349–359.
- Scarano, Fabio Rubio, Ribeiro, K. T., De Moraes, L. F. D., & De Lima, H. C. 1997. Plant establishment on flooded and unflooded patches of a freshwater swamp forest in southeastern Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, 13(6): 793–803.

- Schreiber, U., & Armond, P. A. 1978. Heat-induced changes of chlorophyll fluorescence in isolated chloroplasts and related heat-damage at pigment level. *Biochimica et Biophysica Acta*, 502: 138–151.
- Sciences, A. L. 2005. Effect of Canopy Position on Germination and Seedling Survival of Epiphytic Bromeliads in a Mexican Humid Montane Forest. *Annals of Botany*, (1997): 1039–1047.
- Seemann, J. R., Downton, W. J. S., & Berry, J. A. 1986. Temperature and leaf osmotic potential as factors in the acclimation of photosynthesis to high temperature in desert plants. *Plant physiology*, 80(4): 926–30.
- Song, L., Chow, W. S., Sun, L., Li, C., & Peng, C. 2010. Acclimation of photosystem II to high temperature in two *Wedelia* species from different geographical origins: implications for biological invasions upon global warming. *Journal of experimental botany*, 61(14): 4087–96.
- Valladares, F., & Pearcy, R. W. 1997. Interactions between water stress, sun-shade acclimation, heat tolerance and photoinhibition in the sclerophyll *Heteromeles arbutifolia*. *Plant, Cell and Environment*, 20: 25–36.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., & Foolad, M. R. 2007. Heat tolerance in plants : An overview. *Environmental and Experimental Botany*, 61: 199–223.
- Weis, E. 1982. The influence of metal cations and pH on the heat sensitivity of photosynthetic oxygen evolution and chlorophyll fluorescence in spinach chloroplasts. *Planta*, 154: 41–47.
- Went, F. W. 1953. The Effect of Temperature on Plant Growth. *Annual Review of Plant Physiology*, 4: 347–362.
- Yamada, M., Hidaka, T., & Fukamachi, H. 1996. Heat tolerance in leaves of tropical fruit crops as measured by chlorophyll fluorescence. *Scientia Horticulturae*, 67: 39–48.
- Yamane, Y., Shikanai, T., Kashino, Y., Koike, H., & Satoh, K. 2000. Reduction of QA in the dark: Another cause of fluorescence Fo increases by high temperatures in higher plants. *Photosynthesis research*, 63: 23–34.
- Zachos, J. C., Wara, M. W., Bohaty, S., Delaney, M. L., Petrizzo, M. R., Brill, A., et al. 2003. A transient rise in tropical sea surface temperature during the Paleocene-Eocene Thermal Maximum. *Science*, 302: 1551–1554.

CAPÍTULO I

SERIAM AS PLANTAS CAM BENEFICIADAS PELO
AQUECIMENTO GLOBAL? ESTUDO MORFOFISIOLÓGICO
COMPARATIVO, COM ÊNFASE NA TERMOTOLERÂNCIA DE
BROMÉLIAS C3 E CAM EM UM CAMPO RUPESTRE COM
DIFERENTES NÍVEIS DE SOMBREAMENTO

RESUMO

Espécies de Bromeliaceae, uma das famílias com maior quantidade de espécies CAM, ocorrem em ambientes com intensidade de luz distintas. No entanto, é comum a presença de espécies de bromélias C₃ e CAM compartilhando os mesmos habitats e sujeitos aos mesmos estresses como o térmico e o luminoso. Diferentes níveis de exposição à radiação solar podem afetar desde a morfologia foliar, até a estrutura de vários componentes do processo fotossintético de plantas. O presente trabalho teve o objetivo de testar a hipótese de que bromélias CAM e C₃ crescendo no mesmo ambiente, com alta ou baixa intensidade luminosa, apresentam diferenças em sua morfofisiologia, especialmente em relação à sua termotolerância. Três espécies de bromélias foram selecionadas no local do estudo, duas com metabolismo C₃: uma de ambiente sombreado, *Vriesea bituminosa*, e outra a pleno sol, *Vriesea minarum*; e outra com metabolismo CAM que ocorre nos dois tipos de ambientes, *Aechmea nudicaulis*. Foram levantadas a tolerância fotossintética, a resistência do PSII sob temperatura estressante, a acidez titulável, o índice de suculência, o conteúdo hídrico relativo e a densidade de estômatos e escamas dessas espécies. Foi observada uma maior termotolerância, assim como uma maior resistência do PSII nos indivíduos de *A. nudicaulis* crescendo em ambiente sombreado. Os indivíduos dessa mesma espécie crescendo a pleno sol, porém, apresentaram valores desses parâmetros similares aos observados nas espécies C₃. Foi observada uma variação sazonal significativa da termotolerância apenas em *V. bituminosa*. Nessa espécie e nos indivíduos a pleno sol de *A. nudicaulis* foi observada uma variação diária da termotolerância na estação chuvosa. Os indivíduos a pleno sol de *A. nudicaulis* apresentaram maior acúmulo de ácidos orgânicos do que os indivíduos de sombra dessa mesma espécie. Não foram encontradas fortes relações entre a termotolerância e as variáveis morfofisiológicas testadas nas três espécies estudadas. Os resultados apresentados neste trabalho apontam que o metabolismo CAM, por si só, não é determinante na aquisição de termotolerância em bromélias e que as bromélias que o possuem, podem apresentar termotolerâncias diferenciadas de acordo com o seu nível de sombreamento.

Palavras-chave: Bromeliaceae, termotolerância fotossintética, metabolismo CAM, campo rupestre, nível de sombreamento

INTRODUÇÃO

Sabe-se que diferentes níveis de exposição à radiação solar podem afetar a morfologia foliar, a estrutura dos cloroplastos e vários outros componentes do processo fotossintético de plantas. Plantas expostas a baixa intensidade de radiação podem produzir folhas mais finas, cloroplastos maiores e mais ricos em clorofila, menor capacidade de transporte de elétrons e menor densidade de estômatos (Boardman *et al.*, 1975; Crookston *et al.*, 1975; Holmgren, 1968; Hosoki & Asahira, 1980; Kirk & Tilney-Bassett, 1967). Foi proposto por Valladares & Pearcy (1997) que baixas radiações luminosas podem proteger a atividade fotoquímica contra a inativação provocada por altas temperaturas. Altas radiações, por outro lado, elevam ainda mais os danos provocados por altas temperaturas no aparato fotossintético (Valladares & Pearcy, 1997). Conforme Ludlow (1987), altas radiações luminosas e altas temperaturas afetam mais a fotossíntese em conjunto do que separadamente.

A família Bromeliaceae é uma das maiores famílias com distribuição neotropical (Smith, 1934) e ocorre, inclusive, em locais com intensidade distintas de luz. Uma das características que propiciou esse grande sucesso adaptativo é o metabolismo CAM (*Crassulacean Acid Metabolism*) (Benzing, 2000). Cerca de 70% de todas as bromélias atuais possuem esse tipo de metabolismo, sendo que praticamente todas as chamadas atmosféricas o possuem (Martin, 1994). Bromélias com tanque, por outro lado, podem exibir tanto o metabolismo CAM, quanto o C3 (Martin, 1994). Enquanto bromélias C3 tendem a ocupar habitats sombreados e sujeitos a menos estresses, como o sob-bosque de florestas, bromélias CAM tendem a ocupar habitats áridos, com alta incidência de radiação e altas temperaturas (Smith *et al.*, 1989). É comum, no entanto, a presença de espécies de bromélias com os dois tipos de metabolismo compartilhando os mesmos habitats e sujeitos aos mesmos estresses ambientais.

Alguns autores sugerem que a progressiva elevação da temperatura global, observada no último século, e esperada para o século atual, juntamente com a elevação da concentração de CO₂ atmosférica e o aumento previsto das áreas áridas e semi-áridas (Bazzaz, 1990; Cox *et al.*, 2000; IPCC, 2007, 2012), terão um efeito benéfico na ampliação de habitats, na produtividade e na captação líquida de CO₂ de plantas CAM (Cushman & Borland, 2002; Mercier & Freschi, 2008; Osmond *et al.*, 2008). No

entanto, foi observado por Wang *et al.* (2008) que plantas CAM submetidas a altas concentrações de CO₂ reduziram, ainda mais, sua fotossíntese líquida com o aumento da temperatura. No mesmo estudo, foi observada uma elevação da tolerância a altas temperaturas em plantas C3 submetidas a altas concentrações de CO₂.

Outra característica que propiciou o sucesso adaptativo de bromélias é a presença de tanque (Benzing, 2000), que é formado pela sobreposição das bainhas foliares e que é capaz de acumular água (Schmidt & Zotz, 2001). Essa conformação gera gradientes ao longo das folhas: com a porção apical recebendo maior incidência luminosa e a basal com maior acesso à água acumulada no tanque (Popp *et al.*, 2003). Além disso, a base foliar pode ter uma predominância de tecidos estocadores de água que funcionam como reservatórios de água para manter o status hídrico adequado aos tecidos fotossintetizantes do ápice quando as condições ambientais são desfavoráveis (Freschi *et al.*, 2010). Espera-se, dessa forma, que as respostas fisiológicas de distintas regiões foliares de uma bromélia com tanque sejam diferentes às mesmas condições ambientais (Freschi *et al.*, 2010; Popp *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2007).

Diante da reduzida quantidade de estudos com a termotolerância fotossintética de plantas CAM, o presente trabalho teve o objetivo de testar a hipótese de que bromélias CAM e C3 crescendo no mesmo ambiente, com alta ou baixa intensidade luminosa, apresentam diferenças na termotolerância. Além disso, as seguintes questões foram levantadas: (1) A termotolerância de bromélias CAM e C3 varia ao longo das estações do ano? (2) O acúmulo diário de ácidos orgânicos, típico de plantas CAM, interfere na termotolerância dessas bromélias? (3) Há variação diária na termotolerância de bromélias CAM e C3? (4) Há diferença na termotolerância de distintas porções e orientações das folhas dessas bromélias? (5) Há variações morfofisiológicas em distintas porções foliares de bromélias CAM e C3? (6) Essas variações se alteram ao longo do dia e do ano? (7) Essas variações interagem entre si e com a termotolerância?

MATERIAL E MÉTODOS

Local de estudo, espécies estudadas e delineamento amostral

O presente estudo foi realizado na Serra da Piedade, que está localizada na divisa entre os municípios de Sabará e Caeté (19° 40'S e 43° 40'W), em Minas Gerais,

Brasil, e forma a extremidade oriental da Serra do Curral, na borda norte do Quadrilátero Ferrífero. A Serra da Piedade possui uma altitude máxima de 1746 metros, apresenta um clima subtropical de altitude, com estação seca definida, entre abril e setembro, e a presença frequente de nevoeiros (Brandão & Gavilanes, 1990; Marques & Lemos-Filho, 2008). Podem ser observadas geadas e temperaturas próximas a 0°C nas regiões de maior altitude (Brandão & Gavilanes, 1990). O local do presente estudo encontra-se acima de 1400 metros e possui dois tipos de ambientes: Um com grande quantidade de afloramentos rochosos, aspecto xérico-pedregoso, vegetação herbáceo-arbustiva e grande exposição a radiação solar e ao vento. O outro possui o aspecto méxico-altitudinal, vegetação arbustivo-arbórea, maior umidade e sombreamento (Marques, 2002). Ambos os locais estão frequentemente sujeitos a neblinas pela manhã e ao final da tarde.

Três espécies de bromélias foram selecionadas no local do estudo, duas com metabolismo fotossintético do tipo C₃, *Vriesea minarum* L.B. Sm. e *V. bituminosa* Wawra, pertencentes à subfamília Tillandsioideae, e uma com metabolismo do tipo CAM, *Aechmea nudicaulis* (L.) Griseb., da subfamília Bromelioideae (figura 1). A primeira é rupícola, endêmica dos campos rupestres do estado de Minas Gerais (Forzza *et al.*, 2012) e ocorre na Serra da Piedade em ambientes xérico-pedregosos a pleno sol, onde foram amostrados cinco indivíduos em cada estação do ano de coleta. *V. bituminosa*, por sua vez, pode ser encontrada, como rupícola ou epífita, na Venezuela e no Brasil, nos estados da Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo (Forzza *et al.*, 2012). Na área de estudo podem ser encontrados indivíduos dessa espécie tanto em ambientes méxico-altitudinais, onde foram amostrados cinco indivíduos em cada estação do ano de coleta, quanto em ambientes xérico-pedregosos, nesse último, porém, a quantidade de indivíduos encontrada é mais reduzida e, portanto, não foi utilizada no estudo. *A. nudicaulis* é majoritariamente epífita, mas também pode ocorrer de forma rupícola ou terrestre, possui uma ampla faixa de ocorrência no neotrópico, desde o México e a região das Índias Ocidentais até o Peru, Brasil e Guiana (Smith & Downs, 1979). No Brasil, os registros para espécie ocorrem em Minas Gerais e nos estados litorâneos, desde a Paraíba até o Rio Grande do Sul (Forzza *et al.*, 2012). Na área de estudo, *A. nudicaulis*, possui uma ampla ocorrência, tanto em ambientes xérico-pedregosos, quanto em méxico-altitudinais. Dessa forma, a cada estação anual amostrada foram coletados cinco indivíduos de *A. nudicaulis* de cada ambiente,



Figura 1: Espécies amostradas no presente estudo: *Vriesea minarum* (A), *Vriesea bituminosa* (B) e *Aechmea nudicaulis* em ambiente xérico-pedregoso (C) e méxico-altitudinal (D).

sendo classificados como “indivíduos de sol” e “indivíduos de sombra”, respectivamente.

Durante uma estação seca e uma chuvosa foram coletadas amostras de cerca de 1,5 cm² de folhas completamente expandidas e sem sinais de predação por insetos ou microrganismos de cinco indivíduos, de cada grupo amostral (*V. minarum*, *V. bituminosa*, *A. nudicaulis* de sol e *A. nudicaulis* de sombra), para a determinação da termotolerância, da acidez titulável, do índice de succulência (IS) e do conteúdo hídrico relativo (CHR). Para cada finalidade foram retiradas, no ápice (terço superior) e na base (terço inferior) de cada folha, uma amostra pela manhã (8h) e outra à tarde (15h) – períodos com maior e menor acúmulo de ácidos orgânicos em plantas CAM. Além disso, para observar possíveis influências provenientes de diferentes orientações foliares no mesmo indivíduo, durante a estação seca, esse mesmo padrão de amostragem foi realizado em duas folhas de cada indivíduo, uma com orientação sul-norte (S-N, ápice direcionado para o norte geográfico) e outra com orientação norte-sul (N-S, ápice direcionado para o sul geográfico). Durante a estação chuvosa esse padrão de amostragem foi realizado somente nas folhas com orientação sul-norte de cada indivíduo. Portanto, para a comparação dos valores obtidos entre as estações, foram utilizados apenas os resultados obtidos das folhas com orientação S-N, de ambas as estações.

Informações microclimáticas

A umidade relativa do ar (UR), a densidade do fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (PPFD, *Photosynthetic Photon Flux Density*) e a temperatura do ar nos dias de coleta, nos dois ambientes (à exceção da UR, medida apenas no ambiente sombreado), durante a estação seca e a chuvosa foram obtidos com um *data logger* LiCor modelo LI-1400 (Lincoln, EUA) e um termômetro digital modelo TD-880 (Icel Manaus), também com função *data logger*, acoplado a um termopar do tipo K. Durante a estação seca, período com maior variação diária da temperatura, foi medida, também, a temperatura de um afloramento rochoso no ambiente xérico-pedregoso, através de outro termopar do tipo K, ligado ao termômetro digital.

Tolerância do Fotossistema II a temperaturas crescentes

Para a determinação da termotolerância as amostras foram acondicionadas em água deionizada durante 24 horas em sacos *zip-lock* e mantidas na presença de luz, até o teste da termotolerância, em laboratório. Esse procedimento foi previamente testado, em laboratório, e mostrou não afetar o rendimento quântico potencial (F_v/F_m) das amostras. Após serem retiradas dos sacos *zip-lock*, as amostras foram mantidas no escuro a 25°C, por 15 minutos, para a determinação do F_v/F_m inicial, através de um medidor de fluorescência modulada (MINI-PAM, Walz). As amostras foram então colocadas entre duas placas metálicas forradas com papel filtro umedecido com água destilada, onde foi inserido o eletrodo de um termopar, do tipo K, ligado a um termômetro digital, modelo TD-880 (Icel Manaus). A placa com o papel filtro, o eletrodo e as amostras foram colocadas em outro saco de polietileno *zip-lock*, que foi submerso em banho-maria ultratermostático com circulador (modelo Quimis® 214D2), conforme Neuner & Pramsöhler (2006). As amostras foram submetidas a variações crescentes de temperatura a partir de 35°C – temperatura considerada o limite superior da faixa de temperatura ótima da maioria das plantas (Berry & Björkman, 1980; Went, 1953) – até 65°C, com o incremento de 1°C a cada 3 minutos. Medidas de F_v/F_m foram realizadas com um medidor de fluorescência modulada (MINI-PAM, Waltz) a cada 2°C de acréscimo na temperatura do termômetro digital. Foram calculadas as temperaturas de decaimento de 15% (T15) e 50% (T50) do F_v/F_m inicial, a partir do ajuste de equação sigmoideal, conforme metodologia empregada por Gimeno *et al.* (2009) e Godoy *et al.* (2011), utilizando o pacote estatístico R 2.15.2 (R Core Team, 2012).

Resistência do PSII sob alta temperatura

Para verificar se os valores obtidos para a termotolerância entre as espécies corresponde ao tempo de resistência do PSII sob alta temperatura, foram coletadas novas amostras, de cerca de 1,5cm², do ápice e da base da folha com orientação S-N de cinco indivíduos das três espécies estudadas (cinco de sol e cinco de sombra, para *A. nudicaulis*), às 15 horas, na estação chuvosa, quando diferenças fisiológicas entre folhas com orientações distintas foram menores. Foi determinada uma temperatura constante, com base na média de todos os valores de T15 obtidos no experimento anterior (43°C). O procedimento foi realizado de forma similar ao da obtenção da termotolerância a temperaturas crescentes. Porém, foi medido o F_v/F_m das amostras antes da imersão no banho-maria e após 5, 10, 20, 40, 60 e 80 minutos. Equações lineares foram

posteriormente feitas para a determinação do tempo de exposição correspondente ao decréscimo de 50% no valor inicial de F_v/F_m (H50).

Acidez titulável, Índice de Suculência (IS) e Conteúdo Hídrico Relativo (CHR)

A determinação da acidez titulável de cada amostra foi realizada conforme Hartsock & Nobel (1976). Foi calculada, também, a variação diária da acidez titulável (ΔH^+) como a diferença da acidez obtida pela manhã pela obtida à tarde. O índice de suculência, ou o teor de água saturada, referente à capacidade de armazenamento de água nos tecidos foi determinado conforme Ogburn & Edwards (2010, 2012) como:

$$IS = \frac{MT - MS}{MS}$$

onde MT é a massa túrgida, determinada após a imersão das amostras em água deionizada por 24 horas, e MS é a massa seca das amostras, determinada após a secagem em estufa por 60°C até a estabilização do peso foliar. O conteúdo hídrico relativo (CHR) se refere ao teor de água presente no tecido no momento da coleta. Foi calculado como:

$$CHR = \left(\frac{MF - MS}{MT - MS} \right) \times 100$$

onde MF é a massa fresca das amostras.

Densidade de estômatos e de escamas

Juntamente com as amostras coletadas durante a estação seca, foram coletados fragmentos para a determinação da densidade de estômatos, na face abaxial (bromélias são hipoestomáticas), e a densidade de tricomas peltados (escamas), em ambas as faces da folha. Para isso, as amostras foram colocadas em FAA (formaldeído a 37%, ácido acético glacial e etanol a 50%, na proporção de 1:1:18), durante uma semana e estocadas em álcool 70% até o procedimento de diafanização das epidermes. Os fragmentos foram imersos em solução de hipoclorito de sódio comercial e água destilada (na proporção 2:1, respectivamente) durante três dias, para a diafanização das epidermes, que foram, então, coradas com uma solução de safranina (safranina a 0,25%

em etanol a 12,5%) e azul de astra (azul de astra a 0,5% em água destilada), na proporção de 9:1. As epidermes diafanizadas e coradas foram montadas em lâmina com gelatina glicerizada de Kaiser. A contagem de estômatos e escamas foi feita em seis campos de 0,063mm², nas duas epidermes de cada amostra, com um aumento de 40X, em microscópio com auxílio de câmera clara (Olympus).

Análises Estatísticas

Para avaliar o efeito das variáveis analisadas na termotolerância das três espécies estudadas foram feitos modelos lineares de efeito misto (MLE), ajustados para dados longitudinais (medidas repetidas) com efeito espacial aninhado à região foliar, utilizando o pacote estatístico R 2.15.2 (R Core Team, 2012). Efeitos mistos possibilitam modelar possíveis correlações existentes entre dados agrupados (Buckley *et al.*, 2003), como no caso do presente estudo (amostras de regiões e direções foliares distintas são correlacionadas por serem do mesmo indivíduo). Análises com medidas repetidas e estruturas de dados agrupados auxiliam a evitar a pseudoreplicação dos valores obtidos e elevam o poder estatístico da análise (Crawley, 2002).

Região foliar (ápice e base), ambiente (para *A. nudicaulis*, sol e sombra), horário da coleta (8h e 15h), estação (seca e chuvosa), IS, acidez titulável, e as interações entre essas variáveis, foram utilizadas como variáveis explicativas de T15 e T50. MLEs também foram gerados apenas com os dados obtidos durante a estação seca, para a inclusão da orientação foliar (S-N e N-S) e das densidades de estômatos e de escamas como variáveis explicativas. Foi construído, também, MLEs com H50, como variável resposta, e a região foliar e o ambiente (para *A. nudicaulis*, sol e sombra), como variáveis explicativas. Outros MLEs foram construídos para IS, CHR e acidez titulável, no qual o ambiente (para *A. nudicaulis*, sol e sombra), a região foliar, a hora da coleta e a estação do ano foram utilizados como variáveis explicativas. Da mesma forma feita para T15 e T50, também foram construídos MLEs somente com os dados da estação seca para a inclusão da orientação foliar e densidades de estômatos e escamas como variáveis preditoras de IS, CHR e acidez titulável. MLEs também foram feitos para as variações da densidade de estômatos e escamas, onde o ambiente, a região foliar, a orientação foliar e a epiderme (adaxial e abaxial) foram utilizados como preditores.

Em todos os MLEs gerados as variáveis preditoras mencionadas foram

atribuídas como efeito fixo e a designação de cada indivíduo analisado foi utilizada como efeito randômico. Todos os MLEs foram sujeitos a análises de variância (ANOVA), onde foram simplificados progressivamente com a retirada das variáveis preditoras com maior valor p não significativo ($>0,05$), como o procedimento adotado por Buckley *et al.* (2003).

Variáveis contínuas com relações significativas nos MLEs foram incluídas em modelos lineares simples (ML), para traçar regressões e obter os valores de significância (p) e de ajuste (r^2). As relações entre variáveis com valores de p significativos ($p < 0,05$) para os MLEs, mas não significativos para os ML não foram consideradas. Relações significativas nos MLEs com variáveis discretas com mais de dois tratamentos foram sujeitas ao teste de Tukey. Da mesma forma, diferenças entre as médias de tratamentos com valores p significativos ($p < 0,05$) para os MLEs, mas não significativas no teste de Tukey também não foram consideradas.

RESULTADOS

Informações microclimáticas

Durante a estação seca, a PPF_D máxima encontrada foi de 1444 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-2}$, no sol, e 720,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-2}$, na sombra, enquanto que na estação chuvosa foi de 364 e 112,7 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-2}$ nos respectivos ambientes. As temperaturas registradas na estação seca (máximas de 21,9 e 21,3°C e mínimas de 9,9 e 9,1°C, no sol e na sombra, respectivamente) foram maiores do que as registradas na estação chuvosa (máximas de 13,7 e 12,6°C e mínimas de 11,2 e 10,9°C, no sol e na sombra, respectivamente). A temperatura registrada no afloramento, durante a seca, por sua vez, variou de 12,3 a 32,2°C (figura 2). A UR registrada na estação seca variou de 31,4 a 73,6% e na estação chuvosa de 92,4 a 92,9%.

Tolerância do Fotossistema II a temperaturas crescentes

Os indivíduos de sombra de *A. nudicaulis* apresentaram os maiores valores de T15 e T50 (46,9 e 49,4°C, respectivamente). Os indivíduos de sol dessa espécie, no entanto, apresentaram valores de T50 similares aos das espécies C₃ estudadas

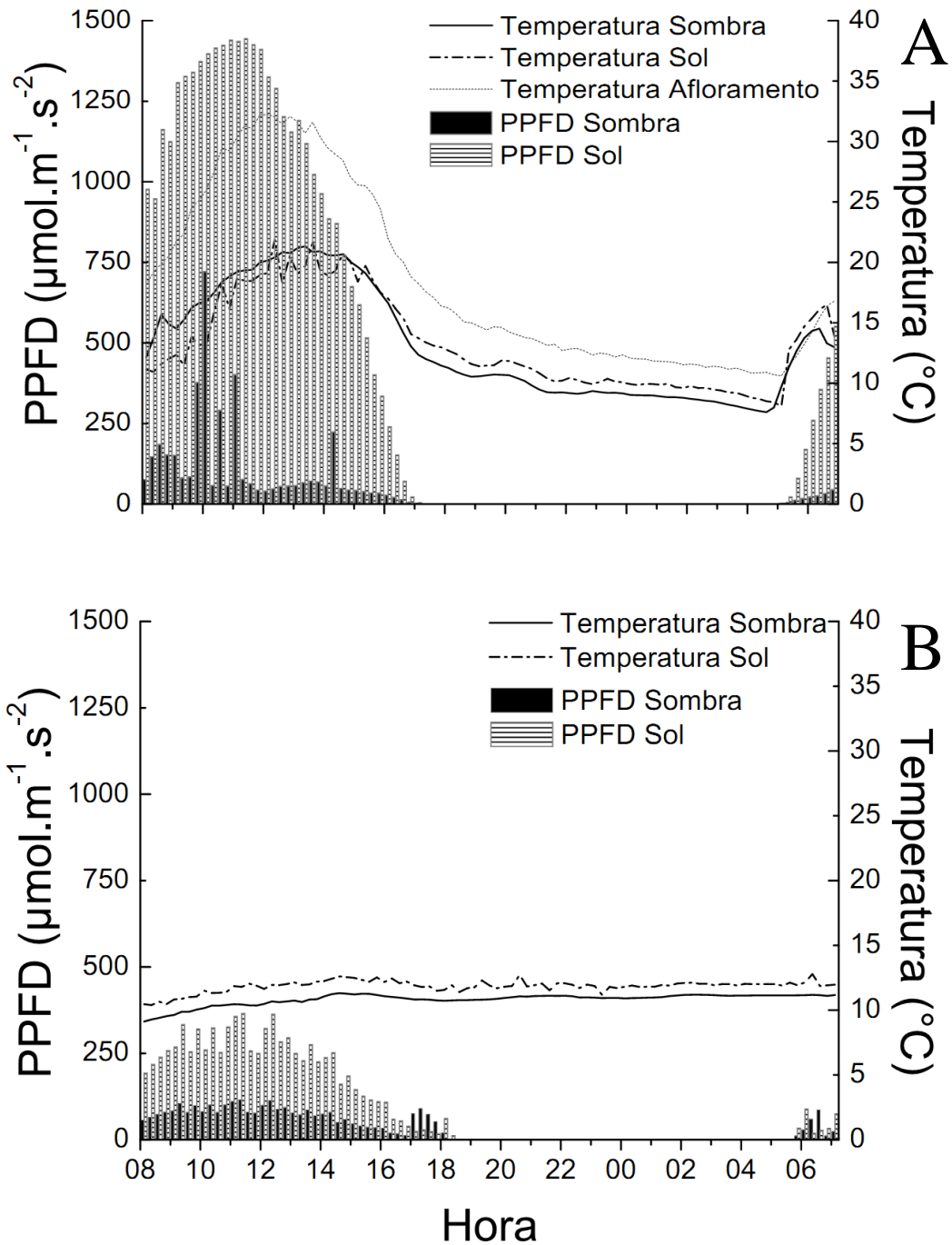


Figura 2: Fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (PPFD) e temperatura do ar registradas a pleno sol e na sombra durante a estação seca (A) e a estação chuvosa (B).

(~46,2°C). Os indivíduos de *V. bituminosa* apresentaram os menores valores de T15 (43,2°C). Nos indivíduos de *V. bituminosa* e de *A. nudicaulis*, a pleno sol, foram observados uma elevação significativa da termotolerância (T15 e T50) às 15 horas na estação chuvosa (tabela 1). Na estação seca, porém, isso não foi observado em *A. nudicaulis* e *V. minarum*. Diferenças da termotolerância entre as estações foram observadas apenas em *V. bituminosa*, com os maiores valores na estação chuvosa (tabela 2). Plantas de sombra de *A. nudicaulis* apresentaram valores de termotolerância (T15 e T50) significativamente maiores do que plantas de sol (~2,5°C de diferença) (tabela 3). Apenas *A. nudicaulis* apresentou relação entre a termotolerância e a direção foliar (tabelas 3, 4 e 5), aproximadamente 1°C a mais nas folhas com orientação S-N. Foi encontrada uma relação positiva entre a densidade estomática e a termotolerância (T50) somente na base das folhas de *V. bituminosa* ($r^2 = 0,61$ e $p = 0,0001$). Observou-se, também, uma fraca relação negativa entre a termotolerância (T15) de *A. nudicaulis* e sua acidez titulável ($r^2 = 0,1$ e $p = 0,003$) (figura 3). Diferenças na termotolerância entre regiões foliares foram observadas somente em *V. minarum* e apenas às 15 horas (~1,5°C a mais na base).

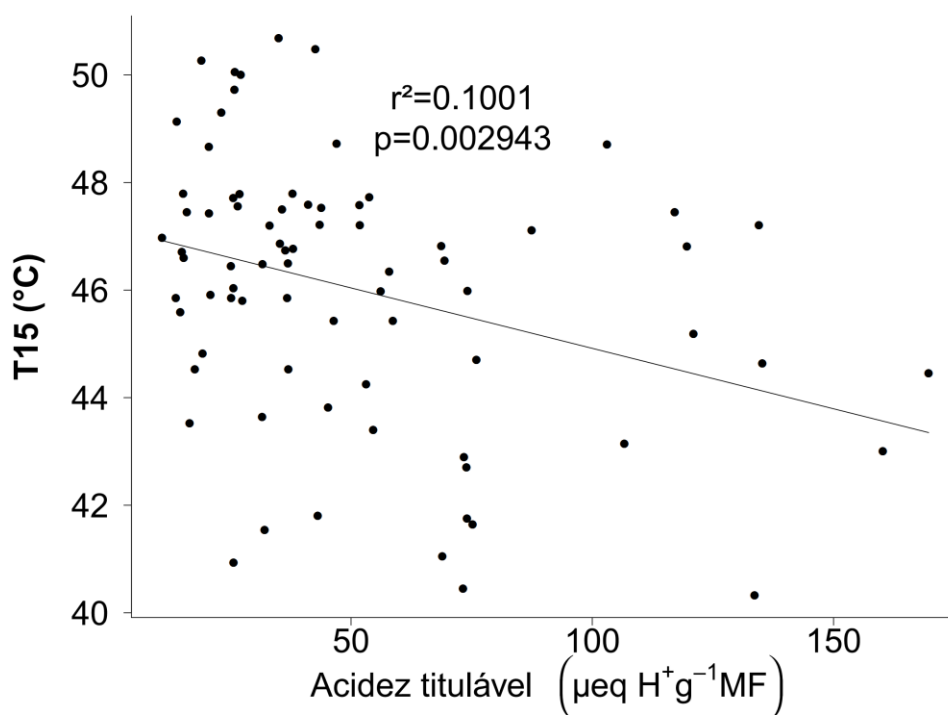


Figura 3: Relação entre a acidez titulável a termotolerância (T15) em *A. nudicaulis*.

Resistência do PSII sob alta temperatura

Os maiores valores de H50 foram encontrados nos indivíduos de sombra de *A. nudicaulis* (tabela 6). Entre os indivíduos de sol dessa espécie e os das espécies *C₃* estudadas não foram observadas diferenças significativas de H50 (tabela 6). Os valores de H50 não diferiram entre as regiões foliares em nenhuma das espécies estudadas (tabela 6).

Acidez titulável, Índice de Suculência (IS) e Conteúdo Hídrico Relativo (CHR)

Foram observadas diferenças significativas da acidez titulável entre os horários apenas nos indivíduos de *A. nudicaulis* a pleno sol (~90 $\mu\text{eq H}^+\text{g}^{-1}\text{MF}$ de diferença) e de *V. minarum* na estação chuvosa (~30 $\mu\text{eq H}^+\text{g}^{-1}\text{MF}$ de diferença). Foi observado, também, um maior acúmulo de ácidos orgânicos nos indivíduos a pleno sol de *A. nudicaulis* do que nos indivíduos de sombra dessa mesma espécie (~33 $\mu\text{eq H}^+\text{g}^{-1}\text{MF}$ de diferença). Em *V. bituminosa*, foi observado um maior acúmulo de ácidos orgânicos no ápice foliar, em relação à base (~10 $\mu\text{eq H}^+\text{g}^{-1}\text{MF}$ de diferença). Em *V. minarum* também foram encontradas diferenças da acidez titulável entre as regiões foliares, com um maior acúmulo no ápice apenas da folha norte e na estação seca, quando comparado ao observado na base dessa mesma folha e nessa mesma estação (~15 $\mu\text{eq H}^+\text{g}^{-1}\text{MF}$ de diferença). Não foram observadas diferenças significativas de ΔH^+ para nenhuma das variáveis de *A. nudicaulis* e de *V. bituminosa*. Em *V. minarum*, no entanto, os maiores valores foram observados na estação chuvosa, quando foi registrado um acúmulo de ácidos maior, cerca de 30 $\mu\text{eq H}^+\text{g}^{-1}\text{MF}$ a mais que na estação seca. Foi observada uma baixa relação positiva entre a acidez titulável e a interação entre a densidade de estômatos e de escamas de *A. nudicaulis* ($r^2 = 0,07$ e $p = 0,04$) (tabelas 7, 8 e 9). A relação observada entre a acidez titulável, a densidade de escamas e o ambiente dos indivíduos de *A. nudicaulis* apesar de significativa no MLE não foi observada no ML.

Indivíduos de *A. nudicaulis*, de sombra, e de *V. bituminosa* possuem a base foliar significativamente mais suculenta que o ápice (tabelas 7 e 8). O IS foi inversamente proporcional à densidade estomática de *A. nudicaulis* ($r^2 = 0,06$ e $p = 0,01$), e diretamente proporcional à densidade de escamas de *V. bituminosa* ($r^2 = 0,19$ e $p = 0,003$). Foram observados, em *A. nudicaulis*, maiores valores do IS no período da manhã, na estação seca (~2 de diferença). Em *V. bituminosa*, por sua vez, apesar de ter

Tabela 1: Média \pm erro padrão dos valores de T50 obtidos às 8 e 15 horas, durante a estação chuvosa nas três espécies estudadas. Letras iguais representam médias estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

Espécie	Metabolismo	Ambiente	Hora	Média T50 \pm erro padrão ($^{\circ}$ C)
<i>A. nudicaulis</i>	CAM	sol	8h	45.54 \pm 0.9 ^{DE}
			15h	49.64 \pm 0.6 ^{AB}
		sombra	8h	48.52 \pm 0.5 ^{ABC}
			15h	50.85 \pm 0.4 ^A
<i>V. minarum</i>	C3	sol	8h	45.33 \pm 0.4 ^{DE}
			15h	46.93 \pm 0.5 ^{CDE}
<i>V. bituminosa</i>	C3	sombra	8h	45.29 \pm 0.5 ^E
			15h	47.7 \pm 0.4 ^{BCD}

Tabela 2: Média \pm erro padrão dos valores de T50 obtidos na estação seca e na chuvosa, nas três espécies estudadas. Letras iguais representam médias estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

Espécie	Metabolismo	Ambiente	Estação	Média T50 \pm erro padrão ($^{\circ}$ C)
<i>A. nudicaulis</i>	CAM	sol	seca	45.95 \pm 0.4 ^C
			chuva	47.59 \pm 0.7 ^{BC}
		sombra	seca	49.11 \pm 0.4 ^{AB}
			chuva	49.69 \pm 0.4 ^A
<i>V. minarum</i>	C3	sol	seca	46.22 \pm 0.41 ^C
			chuva	46.13 \pm 0.3 ^C
<i>V. bituminosa</i>	C3	sombra	seca	44.93 \pm 0.4 ^D
			chuva	46.49 \pm 0.4 ^C

Tabela 3: Resultado dos MLEs para T15 e T50 em *A. nudicaulis*. A terceira e quarta colunas representam, cada uma, os resultados do MLE no qual a variável resposta está representada no cabeçalho. No cabeçalho das linhas estão representadas as variáveis utilizadas como preditoras e as suas interações que foram significativas para ao menos um dos MLEs representados. Os valores nas células representam a média \pm erro padrão de cada um dos tratamentos. P: valor de significância (p) encontrado para cada variável preditora utilizada.

		T15	T50
Hora	8h	45.4168 \pm 0.4	47.5312 \pm 0.44
	15h	46.468 \pm 0.37	48.76 \pm 0.39
	P	0.0072	0.0028
Região	Ápice	45.7847 \pm 0.39	47.9365 \pm 0.42
	Base	46.1001 \pm 0.4	48.3546 \pm 0.44
	P	NS	NS
Estação	Seca	45.6192 \pm 0.38	47.6535 \pm 0.4
	Chuvosa	46.2656 \pm 0.4	48.6377 \pm 0.44
	P	0.2651	0.0849
Ambiente	Sol	44.7768 \pm 0.4	46.8579 \pm 0.45
	Sombra	47.108 \pm 0.28	49.4333 \pm 0.28
	P	0.0007	0.0002
Direção **	Norte	46.0729 \pm 0.37	48.1374 \pm 0.41
	Sul	45.2293 \pm 0.34	47.5297 \pm 0.38
	P	0.0349 **	NS
Acidez	P	0.0031	NS
Hora X Estação	P	0.0001	<.0001

NS: valor $p > 0,05$, variável preditora não utilizada no MLE final

** Variável utilizada em um MLE separado, somente com os dados obtidos na estação

Tabela 4: Resultado dos MLEs para T15 e T50 em *V. minarum*. A terceira e quarta colunas representam, cada uma, os resultados do MLE no qual a variável resposta está representada no cabeçalho. No cabeçalho das linhas estão representadas as variáveis utilizadas como preditoras e as suas interações que foram significativas para ao menos um dos MLEs representados. Os valores nas células representam a média \pm erro padrão de cada um dos tratamentos. P: valor de significância (p) encontrado para cada variável preditora utilizada.

		T15	T50
Hora	8h	43.642 \pm 0.6	46.12 \pm 0.37
	15h	44.0633 \pm 0.38	46.231 \pm 0.39
	P	0.4073	0.7148
Região	Ápice	43.4823 \pm 0.48	45.8955 \pm 0.38
	Base	44.223 \pm 0.51	46.4555 \pm 0.37
	P	NS	0.2297
Estação	Seca	44.6153 \pm 0.52	46.221 \pm 0.41
	Chuvosa	43.09 \pm 0.42	46.13 \pm 0.34
	P	0.0963	0.9065
Direção **	Norte	43.6328 \pm 0.42	45.7715 \pm 0.29
	Sul	44.6151 \pm 0.52	46.221 \pm 0.41
	P	NS	NS
Hora X Região	P	NS	0.012
Hora X Estação	P	0.0005	0.0001

NS: valor $p > 0,05$, variável preditora não utilizada no MLE final

** Variável utilizada em um MLE separado, somente com os dados obtidos na estação

Tabela 5: Resultado dos MLEs para T15 e T50 em *V. bituminosa*. A terceira e quarta colunas representam, cada uma, os resultados do MLE no qual a variável resposta está representada no cabeçalho. No cabeçalho das linhas estão representadas as variáveis utilizadas como preditoras e as suas interações que foram significativas para ao menos um dos MLEs representados. Os valores nas células representam a média \pm erro padrão de cada um dos tratamentos. P: valor de significância (p) encontrado para cada variável preditora utilizada.

		T15	T50
Hora	8h	42.8085 \pm 0.46	43.8393 \pm 0.5
	15h	45.2775 \pm 0.41	46.0775 \pm 0.49
	P	<.0001	<.0001
Região	Ápice	44.021 \pm 0.55	44.5650 \pm 0.53
	Base	44.065 \pm 0.48	45.3518 \pm 0.57
	P	NS	NS
Estação	Seca	44.8115 \pm 0.41	43.4233 \pm 0.43
	Chuvosa	43.2745 \pm 0.55	46.4935 \pm 0.44
	P	NS	0.0012
Direção **	Norte	45.2605 \pm 0.47	42.8275 \pm 0.37
	Sul	44.8115 \pm 0.41	43.4233 \pm 0.43
	P	NS	NS
Estômatos **	P	NS	0.1769 **
Região X Estômatos **	P	NS	0.0393 **

NS: valor $p > 0,05$, variável preditora não utilizada no MLE final

** Variável utilizada em um MLE separado, somente com os dados obtidos na estação

sido observada, pelo MLE, uma interação entre IS, a região foliar e o horário de coleta, no teste de Tukey, não foram observadas diferenças significativas entre os valores obtidos.

Os resultados mostrados nas tabelas 7, 8 e 9 mostram que *A. nudicaulis*, ao contrário das outras espécies, apresentou CHR significativamente maior no ápice foliar, em comparação à base (~8% de diferença). Nas espécies *C₃*, no entanto, a base foliar apresentou um aumento de CHR, em relação ao ápice, de cerca de 6 e 16% em *V. minarum* e *V. bituminosa*, respectivamente. Todas as espécies apresentaram um maior CHR na estação chuvosa (~15% de diferença). Foi observado um aumento do CHR, em *V. minarum*, à tarde, na estação seca (~7% de diferença). CHR variou de forma negativa com a densidade de estômatos das folhas sul de *V. minarum* ($r^2 = 0,4$ e $p = 0,002$). A relação entre CHR e a densidade de escamas de *V. minarum*, observada no MLE, não foi significativa no ML.

Tabela 6: Média \pm erro padrão dos valores de H50 obtidos entre as regiões foliares de cada espécie estudada. Letras iguais representam médias estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

Espécie	Metabolismo	Ambiente	Região foliar	Média H50 \pm erro padrão (min.)
<i>A. nudicaulis</i>	CAM	sol	ápice	80.86 \pm 11.8 ^B
			base	103.17 \pm 5.3 ^B
		sombra	ápice	157.87 \pm 17.4 ^A
			base	163.66 \pm 28.1 ^A
<i>V. minarum</i>	C3	sol	ápice	73.19 \pm 4.8 ^B
			base	81.56 \pm 2.3 ^B
<i>V. bituminosa</i>	C3	sombra	ápice	70.59 \pm 1.8 ^B
			base	73.02 \pm 0.9 ^B

Densidade de estômatos e de escamas

Em todas as espécies analisadas foram encontradas maiores densidades de estômatos no ápice foliar (tabela 10, 11, 12). Houve diferenças na densidade de escamas observada entre as regiões foliares somente em *A. nudicaulis* e *V. minarum*, com maiores valores no ápice foliar. Plantas de sol de *A. nudicaulis* exibiram, ainda, maior densidade de escamas do que plantas de sombra (~8 escamas/mm² a mais). Além disso, foi observada, em *A. nudicaulis*, uma maior densidade de escamas na face abaxial das folhas N-S, quando comparada à densidade da mesma face na folha S-N (~4 escamas/mm² de diferença). Em *V. minarum*, por sua vez, foi observado um pequeno

Tabela 7: Resultado dos MLEs para CHR, IS, acidez titulável e ΔH^+ em *A. nudicaulis*. A partir da terceira coluna são representados, em cada coluna, os resultados do MLE no qual a variável resposta está representada no cabeçalho. No cabeçalho das linhas estão representadas as variáveis utilizadas como preditoras e as suas interações que foram significativas para ao menos um dos MLEs representados. Os valores nas células representam a média \pm erro padrão de cada um dos tratamentos. P: valor de significância (*p*) encontrado para cada variável preditora utilizada.

		CHR (%)	IS	Acidez titulável ($\mu\text{eq H}^+\text{g}^{-1}$ MF)	ΔH^+ ($\mu\text{eq H}^+\text{g}^{-1}$ MF)
Hora	8h	85.6 \pm 2.7	8.25 \pm 0.3	91.26 \pm 14.9	
	15h	89.57 \pm 2.5	7.51 \pm 0.3	34.3 \pm 3.2	NA
	P	NS	0.0026	0.0001	
Região	Ápice	91.83 \pm 2.5	7.26 \pm 0.2	71.32 \pm 13.2	65.96 \pm 23.3
	Base	83.33 \pm 2.5	8.51 \pm 0.3	54.23 \pm 9.8	47.98 \pm 15.1
	P	0.0134	0.0010	NS	NS
Estação	Seca	80.38 \pm 2.8	8.07 \pm 0.3	71.25 \pm 15.5	74.55 \pm 26.8
	Chuvosa	94.78 \pm 1.6	7.69 \pm 0.3	54.30 \pm 5.5	39.38 \pm 5.4
	P	0.0002	0.3448	NS	NS
Ambiente	Sol	87.09 \pm 3.2	7.49 \pm 0.2	79.39 \pm 15.2	83.98 \pm 25.7
	Sombra	88.07 \pm 1.7	8.27 \pm 0.3	46.17 \pm 5.3	29.95 \pm 6.3
	P	NS	0.0606	0.0036	NS
Direção **	Norte	80.38 \pm 2.8	8.07 \pm 0.3	71.25 \pm 15.5	74.55 \pm 26.8
	Sul	77.47 \pm 2	8.97 \pm 0.4	68.77 \pm 11.6	53.81 \pm 16.5
	P	NS	0.0213 **	NS	NS
Escamas **	P	NS	NS	0.2077 **	NS
Estômatos **	P	NS	0.0220 **	0.2308 **	NS
Hora X Estação	P	NS	<0.0001	NS	NS
Região X Ambiente	P	NS	0.0241	NS	NS
Ambiente X Escamas **	P	NS	NS	0.0175 **	NS
Escamas X Estômatos **	P	NS	NS	0.0139 **	NS

NS: valor *p* > 0,05, variável preditora não utilizada no MLE final

** Variável utilizada em um MLE separado, somente com os dados obtidos na estação

Tabela 8: Resultado dos MLEs para CHR, IS, acidez titulável e ΔH^+ em *V. minarum*. A partir da terceira coluna são representados, em cada coluna, os resultados do MLE no qual a variável resposta está representada no cabeçalho. No cabeçalho das linhas estão representadas as variáveis utilizadas como preditoras e as suas interações que foram significativas para ao menos um dos MLEs representados. Os valores nas células representam a média \pm erro padrão de cada um dos tratamentos. P: valor de significância (*p*) encontrado para cada variável preditora utilizada.

		CHR (%)	IS	Acidez titulável ($\mu\text{eq H}^+\text{g}^{-1}$ MF)	ΔH^+ ($\mu\text{eq H}+\text{g}^{-1}$ MF)
Hora	8h	73.4 \pm 3.4	7.61 \pm 1	38.0 \pm 3.8	
	15h	76.38 \pm 2.5	8.07 \pm 1.1	23.52 \pm 1.8	NA
	P	0.0828	NS	0.0001	
Região	Ápice	71.59 \pm 2.6	6.74 \pm 0.6	33.61 \pm 3.3	23.31 \pm 10.3
	Base	78.19 \pm 3.2	8.94 \pm 1.4	27.92 \pm 3.4	14.26 \pm 5.3
	P	0.0301	NS	0.0005 **	NS
Estação	Seca	66.3 \pm 2.9	9.39 \pm 1.4	23.99 \pm 1.9	3.85 \pm 2.1
	Chuvosa	83.47 \pm 1.4	6.29 \pm 0.2	37.54 \pm 3.9	33.72 \pm 9.2
	P	0.0101	NS	0.0044	0.0132
Direção **	Norte	66.3 \pm 2.9	6.49 \pm 0.3	26.86 \pm 3.0	1.44 \pm 4.9
	Sul	70.55 \pm 3.2	9.39 \pm 1.4	23.99 \pm 1.9	3.85 \pm 2.1
	P	NS	NS	0.2791	NS
Escamas **	P	0.0448 **	NS	NS	NS
Estômatos **	P	0.0325 **	NS	NS	NS
Hora X Estação	P	0.0057	NS	0.0024	NS
Região X Direção **	P	NS	NS	0.0326 **	NS
Direção X Estômatos **	P	0.0025 **	NS	NS	NS

NS: valor $p > 0,05$, variável preditora não utilizada no MLE final

** Variável utilizada em um MLE separado, somente com os dados obtidos na estação

Tabela 9: Resultado dos MLEs para CHR, IS, acidez titulável e ΔH^+ em *V. bituminosa*. A partir da terceira coluna são representados, em cada coluna, os resultados do MLE no qual a variável resposta está representada no cabeçalho. No cabeçalho das linhas estão representadas as variáveis utilizadas como preditoras e as suas interações que foram significativas para ao menos um dos MLEs representados. Os valores nas células representam a média \pm erro padrão de cada um dos tratamentos. P: valor de significância (*p*) encontrado para cada variável preditora utilizada.

		CHR (%)	IS	Acidez titulável ($\mu\text{eq H}^+\text{g}^{-1}$ MF)	ΔH^+ ($\mu\text{eq H}^+\text{g}^{-1}$ MF)
Hora	8h	73.42 \pm 5	4.51 \pm 0.2	20.60 \pm 1.8	
	15h	70.87 \pm 2.7	4.72 \pm 0.2	22.03 \pm 2.4	NA
	P	NS	0.3696	NS	
Região	Ápice	64.22 \pm 3.3	4.29 \pm 0.2	25.80 \pm 2.3	-1.6 \pm 5.8
	Base	80.07 \pm 3.9	4.94 \pm 0.2	16.83 \pm 1.3	-1.27 \pm 2.6
	P	0.0103	0.0227	0.0020	NS
Estação	Seca	66.71 \pm 2.8	4.55 \pm 0.2	18.87 \pm 1.5	-6 \pm 5.8
	Chuvosa	77.58 \pm 4.7	4.68 \pm 0.2	23.76 \pm 2.5	3.13 \pm 1.7
	P	NS	0.7565	NS	NS
Direção **	Norte	61.66 \pm 2.1	4.58 \pm 0.2	20.42 \pm 2.3	8.44 \pm 2.8
	Sul	66.71 \pm 2.8	4.55 \pm 0.2	18.87 \pm 1.5	3.13 \pm 1.7
	P	NS	NS	NS	NS
Escamas **	P	NS	0.0068 **	NS	NS
Hora X Região	P	NS	0.0190	NS	NS
Região X Estação	P	NS	0.0322	NS	NS

NS: valor $p > 0,05$, variável preditora não utilizada no MLE final

** Variável utilizada em um MLE separado, somente com os dados obtidos na estação

acrécimo na densidade de escamas das duas faces das folhas N-S de *V. minarum*, quando comparada às folhas S-N da mesma espécie (~1,5 escamas/mm² de diferença). Em *A. nudicaulis* houve uma relação positiva entre as densidades de estômatos e de escamas nos indivíduos de sol e de sombra ($r^2 = 0,22$ e $p = 0,001$, e $r^2 = 0,37$ e $p < 0,0001$, respectivamente). Apesar de ter sido observada uma relação entre a densidade de estômatos, as orientações foliares e o ambiente, no MLE de *A. nudicaulis*, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

DISCUSSÃO

Dentre os poucos estudos de termotolerância fotossintética com espécie CAM, Weng & Lai (2005) constataram que *Ananas comosus*, uma bromélia CAM, foi a que apresentou maior termotolerância entre 18 espécies tropicais e subtropicais. Outro estudo realizado com a mesma espécie, e outras frutíferas, por Yamada *et al.* (1996), *A. comosus* apresentou a maior relação registrada entre o F_v/F_m de folhas expostas a 45°C pelo F_v/F_m a 25°C. No presente estudo, por sua vez, indivíduos da espécie com metabolismo CAM, *A. nudicaulis*, crescendo na sombra, apresentaram uma termotolerância fotossintética maior que as duas espécies C3 estudadas. No entanto, os indivíduos crescendo a pleno sol dessa mesma espécie apresentaram uma termotolerância similar à registrada para *V. minarum* e *V. bituminosa*, que possuem metabolismo C3. Quando os valores de termotolerância obtidos para *A. nudicaulis*, no presente estudo, e *A. comosus* (Braun *et al.*, 2002) são comparados aos registrados em plantas C3 nativas de desertos e restingas, com grande temperatura ambiental, eles se mostram bastante inferiores (e.g. *Larrea tridentata*: T50 = 62,2°C; Knight & Ackerly, 2002). Além disso, segundo Didden-Zopf & Nobel, (1982), a temperatura de decaimento de 50% das atividades dependentes da integridade de membranas de *Opuntia bigevolii*, um cactus CAM de um deserto californiano, foi de cerca de 60°C. Portanto, a termotolerância fotossintética de plantas CAM provavelmente não é determinado pelo tipo de metabolismo fotossintético, mas possivelmente por variações climáticas históricas do ambiente ao qual a espécie está adaptada.

O estresse hídrico, comum em muitos ambientes, pode ser tão importante quanto o estresse térmico para interpretar a termotolerância fotossintética. Segundo Havaux (1992), esse estresse pode elevar a termotolerância do PSII, em até 5°C,

Tabela 10: Resultado dos MLEs para as densidades foliares de escamas e estômatos de *A. nudicaulis* durante a estação seca. Nas terceira e quarta colunas são representados, em cada coluna, os resultados do MLE no qual a variável resposta está representada no cabeçalho. No cabeçalho das linhas estão representadas as variáveis utilizadas como preditoras e as suas interações que foram significativas para ao menos um dos MLEs representados. Os valores nas células representam a média \pm erro padrão de cada um dos tratamentos. P: valor de significância (p) encontrado para cada variável preditora utilizada.

		Escamas	Estômatos
Face	AB	27.9249 \pm 0.96	
	AD	25.4034 \pm 1.27	NA
	P	0.0169	
Região	Ápice	28.114 \pm 1.2	24.5209 \pm 4.24
	Base	25.2143 \pm 1.03	12.5441 \pm 2.38
	P	0.0055	<.0001
Ambiente	Sol	30.5093 \pm 1.02	19.6672 \pm 3.64
	Sombra	22.819 \pm 0.9	17.3979 \pm 3.49
	P	0.01	0.4271
Direção	Norte	26.0338 \pm 1.08	16.8306 \pm 3.28
	Sul	27.2945 \pm 1.18	20.2345 \pm 3.81
	P	0.2246	0.0151
Escamas	P	NA	0.0093
Estômatos	P	0.0014	NA
Face X Ambiente	P	0.0022	NA
Face X Direção	P	0.0229	NA
Ambiente X Direção	P	NS	0.0252
Ambiente X Estômatos	P	0.0005	NA

NS: valor $p > 0,05$, variável preditora não utilizada no MLE final

Tabela 11: Resultado dos MLEs para as densidades foliares de escamas e estômatos de *V. minarum* durante a estação seca. Nas terceira e quarta colunas são representados, em cada coluna, os resultados do MLE no qual a variável resposta está representada no cabeçalho. No cabeçalho das linhas estão representadas as variáveis utilizadas como preditoras e as suas interações que foram significativas para ao menos um dos MLEs representados. Os valores nas células representam a média \pm erro padrão de cada um dos tratamentos. P: valor de significância (p) encontrado para cada variável preditora utilizada.

		Escamas	Estômatos
Face	AB	12.5126 \pm 0.61	
	AD	12.9223 \pm 0.91	NA
	P	0.5465	
Região	Ápice	14.8765 \pm 0.9	36.5608 \pm 2.1
	Base	10.5585 \pm 0.6	24.584 \pm 2.09
	P	<.0001	0,0001
Direção	Norte	11.9453 \pm 0.69	29.879 \pm 2.75
	Sul	13.4897 \pm 0.82	31.2658 \pm 3.01
	P	0.0285	NS
Face X Região	P	0.023	NA

NS: valor $p > 0,05$, variável preditora não utilizada no MLE final

Tabela 12: Resultado dos MLEs para as densidades foliares de escamas e estômatos de *V. bituminosa* durante a estação seca. Nas terceira e quarta colunas são representados, em cada coluna, os resultados do MLE no qual a variável resposta está representada no cabeçalho. No cabeçalho das linhas estão representadas as variáveis utilizadas como preditoras e as suas interações que foram significativas para ao menos um dos MLEs representados. Os valores nas células representam a média \pm erro padrão de cada um dos tratamentos. P: valor de significância (*p*) encontrado para cada variável preditora utilizada.

		Escamas	Estômatos
Face	AB	19.0368 \pm 1.09	
	AD	13.994 \pm 0.9	NA
	P	<.0001	
Região	Ápice	16.0111 \pm 0.96	55.7237 \pm 3.45
	Base	17.0197 \pm 1.32	21.9365 \pm 3.38
	P	0.3176	<.0001
Direção	Norte	16.3893 \pm 1.12	40.5951 \pm 7.22
	Sul	16.6415 \pm 1.19	37.0651 \pm 5.82
	P	NS	NS

NS: valor $p > 0,05$, variável preditora não utilizada no MLE final

possivelmente devido a mudanças na composição lipídica das membranas dos tilacóides (Martins-Júnior *et al.*, 2008; Prabha *et al.*, 1985). Em um estudo realizado por Froux *et al.* (2004) foi observada uma variação sazonal da termotolerância, com maiores valores no verão, em resposta ao aumento da temperatura ambiente. Variações sazonais da termotolerância também foram observadas em espécies da savana chinesa, por Zhang *et al.* (2012), quando foram constatadas maior termotolerância fotossintética dessas espécies durante a estação seca. Por outro lado, um estudo conduzido por Krause *et al.* (2010) com árvores tropicais no Panamá não constatou nenhuma variação sazonal na termotolerância. Da mesma forma, não foram observadas variações sazonais da termotolerância nas bromélias estudadas, à exceção de *V. bituminosa*, que apresentou uma maior termotolerância durante a estação chuvosa. Esse resultado mostra que diferentes espécies de bromélias podem apresentar respostas sazonais distintas da termotolerância fotossintética. Além disso, *V. bituminosa*, por ser nativa de um habitat sombreado, possivelmente possui uma maior sensibilidade à elevação da radiação solar observada durante a estação seca nesse ambiente (cerca de 610 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ a mais que a PPFD registrada na estação chuvosa), o que pode ter contribuído para a redução de sua termotolerância nesse período.

A luz interage fortemente com as altas temperaturas, podendo, quando em baixa intensidade, reduzir o grau do dano ao aparato fotossintética induzido pelo calor (Havaux *et al.*, 1991; Valladares & Pearcy, 1997). Por outro lado, já foi reportado por alguns autores que altas intensidades de radiação solar podem acentuar os danos por altas temperaturas ao aparato fotossintético e, com isso reduzir sua termotolerância (Campos, 2011; Valladares & Pearcy, 1997). Portanto, a menor radiação solar registrada no ambiente sombreado, em relação ao exposto a pleno sol, principalmente na estação seca ($\sim 720,5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de diferença), é uma causa provável para a menor tolerância fotossintética observada nas plantas de *A. nudicaulis* crescendo a pleno sol, quando comparada à registrada nos indivíduos de sombra dessa mesma espécie.

Em um estudo com árvores alpinas, Braun *et al.* (2002) observaram uma variação diária na termotolerância de mais de $4,8^{\circ}\text{C}$, o que foi relacionado ao aumento da temperatura foliar ao longo do dia. Em outro estudo, feito por Campos (2011), com espécies arbóreas de uma área florestal semidecídua de Belo Horizonte, Minas Gerais, foram encontradas variações diárias de até $5,5^{\circ}\text{C}$, principalmente no período de transição entre a estação seca e a chuvosa. No presente estudo, por sua vez, foram observadas variações diárias da termotolerância nas três espécies estudadas, com o maior incremento de aproximadamente $4,1^{\circ}\text{C}$ em *A. nudicaulis*, apenas na estação chuvosa, quando ocorreu a menor variação diária da temperatura e de PPFD. A intensidade de PPFD durante o dia é determinante para o acúmulo de ácidos orgânicos em plantas com metabolismo CAM, onde indivíduos de locais mais expostos apresentam maiores taxas de acúmulo de ácidos orgânicos (Barrow & Cockburn, 1982; Lüttge, 2004), como foi observado em *A. nudicaulis*, no presente estudo. Durante a manhã, essa espécie apresentou, como o esperado, os maiores acúmulos de ácidos orgânicos, exatamente quando foram registradas as menores termotolerâncias fotossintéticas. Resultados similares a esse já foram relatados em trabalhos com plantas CAM, utilizando o grau de injúria visual como medida de termotolerância (Kappen & Lösch, 1984; Lösch & Kappen, 1983). Segundo esses autores, uma relação da termotolerância com a acidez titulável pode estar relacionada a danos provocados pelas altas temperaturas ao tonoplasto, que provoca um aumento do efluxo do malato do vacúolo para o citosol, o que pode danificar diversas estruturas celulares.

Escamas foliares possuem diversas funções em bromélias, como a proteção contra radiações solares potencialmente prejudiciais, proteção contra a transpiração excessiva e até a absorção de água e nutrientes acumulados no tanque (Benzing, 2000). Uma relação negativa entre a densidade de estômatos e escamas tem sido descrita para algumas espécies de bromélias, com maior densidade estomática e menor densidade de escamas no ápice foliar, sugerindo a função absorptiva desses tricomas (Freschi *et al.*, 2010; Popp *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2007). Entretanto, no presente estudo, foram observadas, em *A. nudicaulis* e *V. minarum*, uma maior densidade de escamas no ápice foliar, em relação à base. Além disso, em *A. nudicaulis*, foi detectada uma maior densidade desse tricoma nos indivíduos de sol, em relação aos de sombra, além de uma relação positiva entre a densidade de escamas e de estômatos nessa mesma espécie. Esses resultados sugerem uma possível função de proteção contra altas radiações e altas taxas de transpiração das escamas de *A. nudicaulis* e *V. minarum*. Em *V. bituminosa*, por outro lado, apesar da inexistência de diferenças significativas na distribuição de escamas entre suas regiões foliares, a relação positiva entre IS e a densidade de escamas sugere uma provável função absorptiva das escamas dessa espécie.

A existência do tanque, em bromélias é responsável por diversos gradientes ao longo de suas folhas, como o de incidência de radiação solar e de suprimento de água, que é armazenada no tanque e nos tecidos da base das folhas (Freschi *et al.*, 2010; Popp *et al.*, 2003). Um gradiente de CHR e IS também foi observado no presente estudo, onde os maiores valores foram obtidos nas bases foliares das espécies C3. *A. nudicaulis*, por outro lado, apresentou maiores valores de CHR no ápice foliar, semelhante ao encontrado por Freschi *et al.* (2010). Esse resultado provavelmente se deve ao transporte de água entre os tecidos de uma mesma folha, onde a água armazenada nos tecidos da base (maior IS e menor CHR) é transportada para os tecidos não-armazenadores do ápice (menor IS e maior CHR) (Schulte & Nobel, 1989). Além disso, os maiores valores de acidez titulável, observados no ápice das folhas de *A. nudicaulis*, também podem estar relacionados com o papel do malato como soluto nos vacúolos do clorênquima, reduzindo o potencial osmótico dessa região e produzindo um transporte de água dos tecidos armazenadores da base foliar para os tecidos concentradores de malato, no ápice (Smith & Lüttge, 1985).

Os resultados apresentados neste trabalho dão suporte a diversos estudos futuros e mostram que, ainda que alguns autores apontem espécies CAM como mais termotolerantes às mudanças climáticas, esse metabolismo provavelmente não está diretamente ligado a essa resistência, e sim a uma variação história das condições ambientais a que espécies com esse metabolismo estão adaptadas. As baixas relações da termotolerância com as variáveis morfofisiológicas podem dar suporte a essa suposição. Por outro lado, a provável existência de diversas variáveis não mensuradas que interagem com mecanismos fisiológicos das bromélias estudadas, por estarem em condições naturais, pode ter prejudicado a detecção de relações entre as variáveis testadas. Dessa forma, são necessários outros estudos com bromélias CAM, em condições controladas, para que resultados mais refinados e suposições mais criteriosas sejam feitas acerca das diferenças entre os mecanismos da termotolerância de bromélias CAM e C3 e de suas relações com outras variáveis morfofisiológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barrow, S. R., & Cockburn, W. 1982. Effects of light quantity and quality on the decarboxylation of malic Acid in crassulacean Acid metabolism photosynthesis. *Plant physiology*, 69(3): 568–71.
- Bazzaz, F. A. 1990. The response of natural ecosystems to the rising global CO₂ levels. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 21: 167–196.
- Benzing, D. H. 2000. *Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation*: 710. Cambridge: Cambridge University Press.
- Berry, J. A., & Björkman, O. 1980. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 31: 491–543.
- Boardman, N. K., Björkman, O., Anderson, J. M., Goodchild, D. J., & Thorne, S. W. 1975. Photosynthetic adaptation of higher plants to light intensity: Relationship between chloroplast structure, composition of the photosystems and photosynthetic rates. In M. Avron (Ed.), *Photosynthesis*: 1809–1827. Amsterdam: Elsevier.
- Brandão, M., & Gavilanes, M. L. 1990. Mais uma contribuição para o conhecimento da Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais (Serra da Piedade) - II. *Daphne*, 1(1): 26–43.
- Braun, V., Buncher, O., & Neuner, G. 2002. Thermotolerance of photosystem 2 of three alpine species under field conditions. *Photosynthetica*, 40(4): 587–549.
- Buckley, Y. M., Briese, D. T., & Rees, M. 2003. Demography and management of the invasive plant species *Hypericum perforatum*. I . Using multi-level mixed-effects models for characterizing growth , survival and fecundity in a long-term data set. *Journal of Applied Ecology*, 40: 481–493.
- Campos, P. T. 2011. *Fenologia e variações sazonais no status hídrico e na termotolerância em espécies lenhosas em um fragmento de mata semidecídua em Belo Horizonte, MG*. Universidade Federal de Minas Gerais.
- Cox, P. M., Betts, R. A., Jones, C. D., Spall, S. A., & Totterdell, I. J. 2000. Acceleration of global warming due to carbon-cycle feedbacks in a coupled climate model. *Nature*, 408: 184–187.
- Crawley, M. J. 2002. *Statistical Computing: An Introduction to Data Analysis using S-Plus*: 772. Wiley.
- Crookston, R. K., Treharne, K. J., Ludford, P., & Ozbund, J. 1975. Response of beans to shading. *Crop Science*, 15: 412–416.
- Cushman, J. C., & Borland, A. M. 2002. Induction of Crassulacean acid metabolism by water limitation. *Plant, Cell and Environment*, 25: 295–310.

- Didden-Zopfy, B., & Nobel, P. S. 1982. High temperature tolerance and heat acclimation of *Opuntia bigelovii*. *Oecologia*, 52: 176–180.
- Forzza, R. C., Costa, A., Siqueira-Filho, J. A., Martinelli, G., Monteiro, R. F., Santos-Silva, F., et al. 2012. Bromeliaceae. *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB006431>, Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Freschi, L., Takahashi, C. A., Cambui, C. A., Semprebom, T. R., Cruz, A. B., Mioto, P. T., et al. 2010. Specific leaf areas of the tank bromeliad *Guzmania monostachia* perform distinct functions in response to water shortage. *Journal of Plant Physiology*, 167(7): 526–33.
- Froux, F., Ducrey, M., Epron, D., & Dreyer, E. 2004. Seasonal variations and acclimation of the thermostability of photochemistry in four mediterranean conifers. *Annals of Forest Science*, 61: 235–241.
- Gimeno, T. E., Pías, B., Lemos-Filho, J. P. de, & Valladares, F. 2009. Plasticity and stress tolerance override local adaptation in the responses of Mediterranean holm oak seedlings to drought and cold. *Tree physiology*, 29(1): 87–98.
- Godoy, O., De Lemos-Filho, J. P., & Valladares, F. 2011. Invasive species can handle higher leaf temperature under water stress than mediterranean natives. *Environmental and Experimental Botany*, 71(2): 207–214.
- Hartsock, T. L., & Nobel, P. S. 1976. Watering converts a CAM plant to daytime CO₂ uptake. *Nature*, 262: 574–576.
- Havaux, M. 1992. Stress tolerance of photosystem II in vivo. Antagonistic Effects of water, heat, and photoinhibition stresses. *Plant Physiology*, 100: 424–432.
- Havaux, M., Greppin, H., & Strasser, R. J. 1991. Functions of photosystems I and II in pea leaves exposed to heat in the presence or absence of light. *Planta*, 186: 88–98.
- Holmgren, P. 1968. Leaf factors affect ing light-saturated photosynthesis in ecotypes of *Solidago virgaurea* from ex posed and shaded habitats. *Physiologia Plantarum*, 21: 676–698.
- Hosoki, T., & Asahira, T. 1980. In vitro propagation of bromeliads in liquid culture. *HortScience*, 15(5): 603–604.
- IPCC. 2007. Summary for Policymakers. In M. L. Parry, O. F. Canzianik, J. P. Palutikof, P. J. van der Linden, & C. E. Hanson (Eds.), *Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*: 7–22. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- IPCC. 2012. *Managing the Risks of Extreme Events and Disasters to Advance Climate Change Adaptation. A Special Report of Working Groups I and II of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. (C. B. Field, V. Barros, T. F.

- Stocker, D. Qin, D. J. Dokken, K. L. Ebi, et al., Eds.): 582. Cambridge, UK and New York, USA: Cambridge University Press.
- Kappen, L., & Lössch, R. 1984. Diurnal patterns of heat tolerance in relation to CAM. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 114(1): 87–96.
- Kirk, J. T. O., & Tilney-Bassett, R. A. E. 1967. *The Plastids*: 608. London, San Francisco: Freeman.
- Knight, C. A., & Ackerly, D. D. 2002. An ecological and evolutionary analysis of photosynthetic thermotolerance using the temperature-dependent increase in fluorescence. *Oecologia*, 130(4): 505–514.
- Krause, G. H., Winter, K., Krause, B., Jahns, P., García, M., Aranda, J., et al. 2010. High-temperature tolerance of a tropical tree, *Ficus insipida*: methodological reassessment and climate change considerations. *Functional Plant Biology*, 37: 890–900.
- Ludlow, M. M. 1987. Light stress at high temperature. In D. J. Kyle, C. B. Osmond, & C. J. Arntzen (Eds.), *Photoinhibition*: 89–109. Amsterdam: Elsevier.
- Lössch, R., & Kappen, L. 1983. Die temperaturresistenz makaronesischer Sempervivoidae. *Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie*, 10: 521–528.
- Lüttge, U. 2004. Ecophysiology of Crassulacean Acid Metabolism (CAM). *Annals of botany*, 93(6): 629–52.
- Marques, A. R. 2002. *Ecofisiologia e contribuições para a conservação das bromélias da Serra da Piedade*. Universidade Federal de Minas Gerais.
- Marques, A. R., & Lemos-Filho, J. P. de. 2008. Fenologia reprodutiva de espécies de bromélias na Serra da Piedade, MG, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 22(2): 417–424.
- Martin, C. E. 1994. Physiological ecology of the Bromeliaceae. *The Botanical Review*, 60(1): 1–82.
- Martins-Júnior, R. R., Oliveira, M. S. C., Baccache, M. A., & Paula, F. M. De. 2008. Effects of Water Deficit and Rehydration on the Polar Lipid and Membranes Resistance Leaves of *Phaseolus vulgaris* L. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51(2): 361–367.
- Mercier, H., & Freschi, L. 2008. Flora epifítica de florestas tropicais: uma análise fisiológica sobre possíveis impactos causados pelas mudanças climáticas. In M. S. Buckeridge (Ed.), *Biologica & mudanças climáticas no Brasil*: 93–100. São Carlos, Brasil: RiMa Editora.
- Neuner, G., & Pramsohler, M. 2006. Freezing and high temperature thresholds of photosystem 2 compared to ice nucleation, frost and heat damage in evergreen subalpine plants. *Physiologia Plantarum*, 126: 196–204.

- Ogburn, R. M., & Edwards, E. J. 2010. The Ecological Water-Use Strategies of Succulent Plants. *Advances in Botanical Research*, 55: 179–225.
- Ogburn, R. M., & Edwards, E. J. 2012. Quantifying succulence: a rapid, physiologically meaningful metric of plant water storage. *Plant, cell & environment*, 35(9): 1533–1542.
- Osmond, B., Neales, T., & Stange, G. 2008. Curiosity and context revisited: crassulacean acid metabolism in the Anthropocene. *Journal of experimental botany*, 59(7): 1489–502.
- Popp, M., Janett, H.-P., Lüttge, U., & Medina, E. 2003. Metabolite gradients and carbohydrate translocation in rosette leaves of CAM and C3 bromeliads. *New Phytologist*, 157(3): 649–656.
- Prabha, C., Arora, Y. K., & Wagle, D. S. 1985. Phospholipids of wheat chloroplasts and its membranes under water stress. *Plant Science*, 38: 13–16.
- Schmidt, G., & Zotz, G. 2001. Ecophysiological consequences of differences in plant size: in situ carbon gain and water relations of the epiphytic bromeliad, *Vriesea sanguinolenta*. *Plant, Cell and Environment*, 24: 101–111.
- Schulte, P. J., & Nobel, P. S. 1989. Responses of a CAM plant to drought and rainfall: capacitance and osmotic pressure influences on water movement. *Journal of experimental botany*, 40(1): 61–70.
- Smith, A. K., Marlin, C. E., & Lüttge, U. 1989. Gas exchange and water vapor uptake in the atmospheric CAM bromeliad *Tillandsia recurvata* L.: the influence of trichomes. *Botanica Acta*, 102: 80–84.
- Smith, J. A. C., & Lüttge, U. 1985. Day-night changes in leaf water relations associated with the rhythm of crassulacean acid metabolism in *Kalanchoë daigremontiana*. *Planta*, 163: 272–282.
- Smith, L. B. 1934. Geographical evidence on the lines of evolution in Bromeliaceae. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie*, 66: 446–468.
- Smith, Lyman B., & Downs, R. J. 1979. Bromelioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica*: 14(3):1493–2142.
- Takahashi, C. A., Ceccantini, G. C. T., & Mercier, H. 2007. Differential capacity of nitrogen assimilation between apical and basal leaf positions of tank epiphytic bromeliad. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19(2): 119–126.
- Team, R. C. 2012. R: A language and environment for statistical computing. <http://www.r-project.org>, Vienna, Austria.: R Foundation for Statistical Computing.

- Valladares, F., & Pearcy, R. W. 1997. Interactions between water stress, sun-shade acclimation, heat tolerance and photoinhibition in the sclerophyll *Heteromeles arbutifolia*. *Plant, Cell and Environment*, 20: 25–36.
- Wang, D., Heckathorn, S. A., Barua, D., Joshi, P., Hamilton, E. W., & LaCroix, J. J. 2008. Effects of elevated CO₂ on the tolerance of photosynthesis to acute heat stress in C₃, C₄, and CAM species. *American Journal of Botany*, 95(2): 165–176.
- Weng, J., & Lai, M. 2005. Estimating heat tolerance among plant species by two chlorophyll fluorescence parameters. *Photosynthetica*, 43(3): 439–444.
- Went, F. W. 1953. The Effect of Temperature on Plant Growth. *Annual Review of Plant Physiology*, 4: 347–362.
- Yamada, M., Hidaka, T., & Fukamachi, H. 1996. Heat tolerance in leaves of tropical fruit crops as measured by chlorophyll fluorescence. *Scientia Horticulturae*, 67: 39–48.
- Zhang, J.-L., Poorter, L., Hao, G.-Y., & Cao, K.-F. 2012. Photosynthetic thermotolerance of woody savanna species in China is correlated with leaf life span. *Annals of botany*, 110(3): 1–17.

CAPÍTULO II

ASPECTOS DA TERMOTOLERÂNCIA DE *Aechmea blanchetiana*
(Baker) L.B. Sm., UMA BROMÉLIA CAM

RESUMO

Muitas plantas CAM ocorrem em ambientes sujeitos a grandes alterações no suprimento de água, amplas oscilações de temperatura, e diferentes níveis de exposição à radiação solar, variáveis conhecidas por limitar a tolerância fotossintética a altas temperaturas. No entanto, poucos estudos investigam a termotolerância fotossintética de bromélias CAM e nenhum deles testa a possível influência desse metabolismo sobre a termotolerância. Além disso, variações morfofisiológicas ao longo de uma única folha e diferentes taxas de exposição à luz em folhas com orientações distintas podem tornar a mensuração da termotolerância em bromélias CAM mais complexa. O presente trabalho teve como objetivo investigar variações diárias e sazonais da termotolerância fotossintética entre diferentes regiões e orientações foliares de uma bromélia CAM, *Aechmea blanchetiana*, e as possíveis correlações dessas variações com características morfológicas e fisiológicas. Foram testadas as variações diárias, sazonais e entre regiões e orientações distintas das folhas de *A. blanchetiana* em relação à termotolerância fotossintética, a acidez titulável, o índice de suculência, o conteúdo hídrico relativo e a densidade de estômatos e escamas. O ápice das folhas com orientação norte-sul apresentou as maiores temperaturas diárias e os menores acúmulos de ácidos orgânicos, mas diferenças entre orientações foliares distintas não foram observadas na termotolerância. Além disso, foi registrada maior termotolerância na base foliar, o que pode ter relação com uma possível estratégia desenvolvida por *A. blanchetiana* para proteger os meristemas foliares aí localizados. Foi observada uma variação diária significativa da termotolerância de *A. blanchetiana*, com os maiores valores no período da tarde, quando se detectou os menores acúmulos de ácidos orgânicos, o que pode ser devido às variações de temperatura ocorrentes ao longo do dia. Foi encontrada, também, uma relação negativa entre termotolerância e acidez titulável e, a partir de relações registradas entre variáveis climáticas e morfológicas com ambas, foi proposta uma grande influência do acúmulo de ácidos orgânicos na termotolerância de *A. blanchetiana*, onde variáveis que afetam a primeira afetam indiretamente a segunda.

Palavras-chave: *Aechmea blanchetiana*, termotolerância fotossintética, acidez titulável, metabolismo CAM, Bromeliaceae

INTRODUÇÃO

Dentre os processos fisiológicos vegetais, a fotossíntese é o mais afetado pelo aumento de temperatura e pode ser totalmente inibida antes mesmo que qualquer outro sintoma de estresse possa ser detectado (Björkman, 1975). A fotossíntese possui faixas ótimas de temperatura com limites altos e baixos distintos para cada espécie (Larcher, 1994). Temperaturas extremas podem inibir drasticamente a fotossíntese pela disrupção da integridade do aparato fotossintético (Berry & Björkman, 1980), resultando em uma queda do rendimento do transporte de elétrons (F_v/F_m) devido a modificações na transferência de energia entre os fotossistemas (Armond *et al.*, 1978). Dessa forma, a fluorescência da clorofila pode ser utilizada como ferramenta para a mensuração da tolerância fotossintética a altas temperaturas (Yamada *et al.*, 1996).

A tolerância da fotossíntese a altas temperaturas é limitada por diversos fatores ambientais como o suprimento de água, o nível de exposição à radiação solar e a temperatura ambiente (ver Berry & Björkman, 1980). Plantas submetidas a estresses hídricos ou luminosos, por exemplo, podem elevar em mais de 5°C sua tolerância fotossintética a altas temperaturas, quando comparadas a plantas de ambientes menos estressantes (Havaux, 1992; Knight & Ackerly, 2002). Plantas de habitats mais quentes podem, além disso, apresentar maiores tolerâncias fotossintéticas do que espécies de ambientes mais frios (Knight & Ackerly, 2002). Relações positivas entre a termotolerância e a temperatura ambiente também já foram observadas em plantas CAM (*Crassulacean Acid Metabolism*) (Didden-Zopfy & Nobel, 1982; Kappen & Lösch, 1984).

O metabolismo fotossintético do tipo CAM é tipicamente associado a plantas nativas de ambientes áridos e semiáridos, sujeitos a temperaturas extremas, baixa umidade relativa do ar e alta radiação solar (Cushman, 2001). A ampliação do número de ambientes como esses está entre as possíveis mudanças ambientais resultantes do aquecimento global (IPCC, 2007, 2012). Dessa forma, plantas com metabolismo CAM são apontadas como sendo, possivelmente, beneficiadas pelo aquecimento global (Cushman & Borland, 2002; Mercier & Freschi, 2008; Osmond *et al.*, 2008).

O metabolismo CAM ocorre em cerca de 6% das angiospermas atuais (Holtum *et al.*, 2007) e, em especial, em bromélias (Martin, 1994), família em que esse

metabolismo, certamente, influenciou no sucesso adaptativo a diversos habitats do continente americano (Benzing, 2000). Mensurar, porém, a termotolerância em bromélias CAM é complexo, especialmente naquelas que apresentam tanque, onde variações morfofisiológicas podem ocorrer ao longo de uma única folha (Freschi *et al.*, 2010; Popp *et al.*, 2003; Takahashi, 2008). Essas variações supostamente ocorrem devido a gradientes, de exposição solar e suprimento hídrico, criados pelo imbricamento de suas folhas (Popp *et al.*, 2003). Desta forma, o efeito das condições ambientais no ápice foliar de uma bromélia tanque provavelmente é diferente do observado na base. Em outras plantas, como em cactos do hemisfério sul, foi observado que os cladódios tendem a se inclinar em direção ao norte geográfico para aumentar a interceptação da luz solar pelos meristemas localizados no ápice caulinar (por Nobel, 1981). Geller & Nobel (1987), por sua vez, observaram diferenças na exposição da radiação fotossinteticamente ativa em cladódios de cactos com as faces adaxiais voltadas para diferentes pontos cardinais. Da mesma forma, portanto, é esperado que folhas com orientações distintas, em uma mesma bromélia, apresentem diferentes taxas de exposição à radiação solar, e conseqüentemente, de temperatura foliar, o que acentuaria as diferenças fisiológicas entre as distintas regiões das folhas.

Uma relação negativa entre a termotolerância, medida pelo grau de injúria visual, e a acidez titulável dos tecidos de duas crassuláceas CAM já foi observada em alguns trabalhos (Kappen & Lösch, 1984; Lösch & Kappen, 1983). No entanto, há poucos estudos na literatura utilizando a termotolerância fotossintética de bromélias CAM (Weng & Lai, 2005; Yamada *et al.*, 1996), e em nenhum deles foi testada a influência desse metabolismo ou de diferentes regiões foliares na termotolerância. Apesar do primeiro capítulo do presente trabalho ter testado essas relações, os resultados obtidos não apontaram diferenças na termotolerância de distintas regiões e orientações foliares das bromélias estudadas e a relação inversamente proporcional obtida com a acidez titulável da espécie CAM foi bastante fraca. Esses resultados podem ser explicados pelo tamanho reduzido das folhas das espécies estudadas a pleno sol e pela inclinação, praticamente vertical, de suas folhas. Além disso, as espécies do primeiro capítulo foram estudadas em condições naturais, sem nenhum controle de variáveis, ao contrário do estudo feito por Kappen & Lösch (1984). Espera-se, portanto, que estudos, em condições mais controladas, da termotolerância fotossintética de bromélias CAM com folhas de tamanhos maiores e inclinações menores possam

detectar possíveis diferenças entre regiões e orientações foliares, bem como uma maior relação entre a termotolerância fotossintética e a acidez titulável dessas espécies. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo investigar variações diárias e sazonais da termotolerância fotossintética entre diferentes regiões e orientações foliares de uma bromélia CAM com tanque, *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Sm., e as possíveis correlações dessas variações com características morfofisiológicas da espécie e variáveis ambientais.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécie estudada e informações meteorológicas

O estudo foi realizado em indivíduos cultivados de *Aechmea blanchetiana* do campus da Universidade Federal de Minas Gerais. Essa espécie possui metabolismo CAM obrigatório e suas folhas, dispostas em uma roseta em forma de funil, possuem cerca de 10 cm de largura, 90 cm de altura (Smith & Downs, 1979) e uma inclinação, em relação ao eixo vertical, de aproximadamente 45° quando totalmente formadas.

O estudo foi realizado na estação seca, em agosto de 2011, na estação chuvosa, em novembro de 2011, e durante um veranico, em fevereiro de 2012, época com características de estação seca no meio da estação chuvosa. Os dados climáticos (temperatura ambiente, umidade relativa do ar e radiação solar) do dia das avaliações e do dia anterior foram obtidos a partir de uma estação de superfície automática (Estação Pampulha – A521) localizada próximo à área de pesquisa onde se encontram os indivíduos de *A. blanchetiana*. O acesso a esses dados foi realizado através do website do INMET (Instituto Nacional de Meteorologia): <http://www.inmet.gov.br>.

Temperatura foliar

Para observar diferenças da temperatura entre regiões de folhas de *A. blanchetiana* com orientações distintas ao longo do dia, durante a estação seca, foi registrada a temperatura do ar circundante e da superfície adaxial de duas folhas de cinco indivíduos dessa espécie, uma com orientações norte-sul (N-S, ápice foliar apontando para o sul geográfico) e outra com orientação sul-norte (S-N, ápice foliar apontando para o norte geográfico) (Figura 1), em diferentes regiões do limbo foliar (ápice, meio e base) e a cada hora do dia (de 7 às 18 horas), através de termopares do

tipo K ajustados à superfície adaxial das folhas e acoplados a um termômetro digital modelo TD-880 (Icel Manaus).

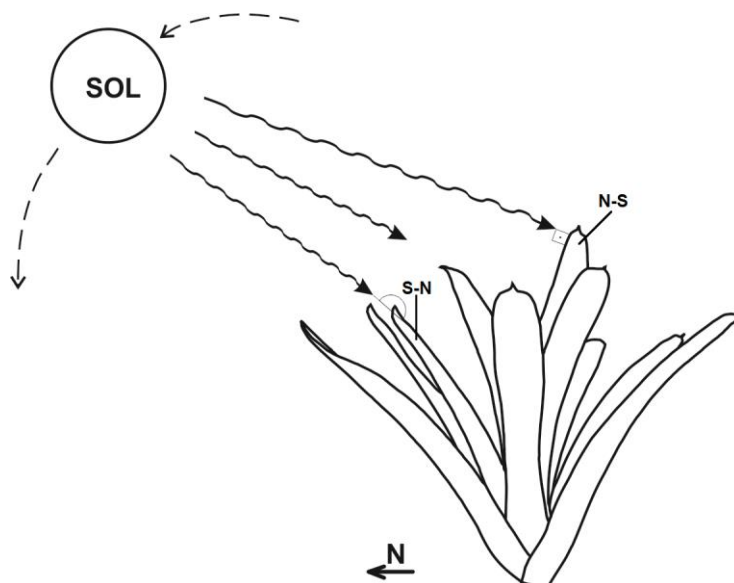


Figura 1: Ilustração esquemática mostrando os ângulos aproximados de incidência da radiação solar (setas onduladas) em folhas de *Aechmea blanchetiana* com diferentes orientações. As setas pontilhadas indicam o percurso do Sol (leste-oeste). N-S: orientação na qual o ápice foliar aponta para o sul e a base para o norte geográfico. S-N: orientação na qual o ápice foliar aponta para o norte e a base para o sul geográfico.

Delineamento amostral

Para a determinação da acidez titulável, índice de suculência (IS) e conteúdo hídrico relativo (CHR), foi coletado, para cada finalidade, um disco foliar de 1,5 cm² de três regiões foliares (ápice, meio e base, correspondentes ao terço superior, médio e inferior de cada folha) de folhas, com inclinação de aproximadamente 45°, com orientação N-S e S-N, de cinco indivíduos de *A. blanchetiana*. Essa amostragem foi realizada no início da manhã (8h) e à tarde (15h).

Tolerância do Fotossistema II a altas temperaturas

Para a determinação da termotolerância de *A. blanchetiana* as amostras foram acondicionadas em água deionizada durante 24 horas em sacos *zip-lock* e mantidas em laboratório, na presença de luz, até o teste da termotolerância, em laboratório. Esse procedimento foi previamente testado, em laboratório, e mostrou não afetar o rendimento quântico potencial (F_v/F_m) das amostras. Após serem retiradas dos sacos *zip-lock*, as amostras foram mantidas no escuro a 25°C, por 15 minutos, para a determinação do F_v/F_m inicial, através de um medidor de fluorescência modulada

(MINI-PAM, Walz). As amostras foram, então, colocadas entre duas placas metálicas forradas com papel filtro umedecido com água destilada, onde foi inserido o eletrodo de um termopar, do tipo K, ligado a um termômetro digital, modelo TD-880 (Icel Manaus). Esse conjunto foi colocado em outro saco de polietileno *zip-lock*, que foi submerso em banho-maria ultratermostático com circulador (modelo Quimis® 214D2), conforme Neuner & Pramsöhler (2006). As amostras foram submetidas a variações crescentes de temperatura a partir de 35°C – temperatura considerada o limite superior da faixa de temperatura ótima da maioria das plantas (Berry & Björkman, 1980; Went, 1953) – até 65°C, com o incremento de 1°C a cada 3 minutos. Medidas de F_v/F_m foram realizadas com um medidor de fluorescência modulada a cada 2°C de acréscimo na temperatura do termômetro digital. Foram calculadas as temperaturas de decaimento de 15% (T15) e 50% (T50) do F_v/F_m inicial, a partir do ajuste de equação sigmoïdal, conforme metodologia empregada por Gimeno *et al.* (2009) e Godoy *et al.* (2011), utilizando o pacote estatístico R 2.15.2 (R Core Team, 2012).

Acidez titulável, Índice de Suculência (IS) e Conteúdo Hídrico Relativo (CHR)

A acidez titulável foi realizada conforme Hartsock & Nobel (1976). Foi calculada, também, a variação diária da acidez titulável (ΔH^+) como a diferença da acidez obtida pela manhã (8h) pela obtida à tarde (15h) da mesma região foliar da mesma folha. O índice de suculência, ou o teor de água saturada, referente à capacidade de armazenamento de água nos tecidos foi determinado conforme Ogburn & Edwards (2010, 2012) como:

$$IS = \frac{MT - MS}{MS}$$

onde MT é a massa túrgida, determinada após a imersão das amostras em água deionizada por 24 horas, e MS é a massa seca das amostras, determinada após a secagem em estufa por 60°C até a estabilização da massa. O conteúdo hídrico relativo (CHR) se refere ao teor de água presente no tecido no momento da coleta. Foi calculado como:

$$\text{CHR} = \left(\frac{\text{MF} - \text{MS}}{\text{MT} - \text{MS}} \right) \times 100$$

onde MF é a massa fresca das amostras.

Densidade de estômatos e de escamas

Foi coletada uma amostra, durante a estação seca, de cada uma das três regiões foliares (ápice, meio e base) da folha N-S e da folha S-N, dos cinco indivíduos de *A. blanchetiana*, para a determinação da densidade de estômatos, na face abaxial (bromélias são hipoestomáticas), e de tricomas peltados (escamas), em ambas as faces da folha. Para isso, as amostras foram colocadas em FAA (formaldeído a 37%, ácido acético glacial e etanol a 50%, na proporção de 1:1:18), durante uma semana, e estocadas em álcool 70% até o procedimento de contagem de estômatos e escamas. Os fragmentos foram então imersos em solução de hipoclorito de sódio comercial e água destilada (na proporção 2:1, respectivamente) durante três dias, para a diafanização das epidermes, que foram, então, coradas com uma solução de safranina (safranina a 0,25% em etanol a 12,5%) e azul de astra (azul de astra a 0,5% em água destilada), na proporção de 9:1. As epidermes diafanizadas e coradas foram montadas em lâmina com gelatina glicerinada de Kaiser. A contagem de estômatos e escamas foi feita em seis campos de 0,063mm², nas duas epidermes de cada amostra, com um aumento de 40X, em microscópio (Olympus), com auxílio de câmera clara.

Análises Estatísticas

Para avaliar o efeito da região foliar (ápice, meio e base), da orientação foliar (N-S e S-N), da hora da coleta (8h e 15h), do período do ano (estação seca, estação chuvosa e veranico), do IS, da acidez titulável, da densidade de estômatos e escamas e as interações entre essas variáveis na termotolerância de *A. blanchetiana* foram feitos modelos lineares de efeito misto (MLE), ajustados para dados longitudinais (medidas repetidas) com efeito espacial aninhado à região foliar, utilizando o pacote estatístico R 2.15.2 (R Core Team, 2012). Efeitos mistos possibilitam modelar possíveis correlações existentes entre dados agrupados (Buckley *et al.*, 2003), como os encontrados no presente estudo (valores de amostras de regiões e orientações foliares distintas, no

mesmo indivíduo, são correlacionados). Análises com medidas repetidas e estruturas de dados agrupados auxiliam a evitar a pseudoreplicação dos valores obtidos e elevam o poder estatístico da análise (Crawley, 2002). Região foliar (ápice, meio e base), orientação foliar (N-S e S-N), hora (8h e 15h), período do ano (seca, chuvosa e veranico), IS, acidez titulável e as interações entre essas variáveis, foram utilizadas como variáveis explicativas de T15 e T50. MLEs também foram gerados apenas com os dados obtidos durante a estação seca, para a inclusão das densidades de estômatos e de escamas nesses modelos. Outros MLEs foram construídos para a predição de IS, CHR e acidez titulável, no qual a região e orientação foliar, a hora da coleta e o período do ano foram utilizados como variáveis preditoras. Da mesma forma que feita com T15 e T50, também foram feitos MLEs somente com os dados da estação seca para a inclusão da densidade de estômatos e escamas como variáveis desses modelos. As relações das densidades de estômatos e escamas com a região e orientação foliar, além da epiderme (adaxial e abaxial) também foram testadas utilizando MLEs. Outro MLE foi construído utilizando a média da temperatura das superfície adaxial (registradas às 11, 12 e 13 horas, período com maior temperatura ambiente) como variável resposta e a região e orientação foliar como preditoras.

Em todos os MLEs gerados as variáveis preditoras foram atribuídas como efeito fixo e a designação de cada indivíduo analisado foi utilizada como efeito randômico. Todos os MLEs foram sujeitos a análises de variância (ANOVA), no qual foram simplificados progressivamente com a retirada das variáveis preditoras com maior valor p não significativo ($>0,05$), como o procedimento adotado por Buckley *et al.* (2003). Variáveis contínuas com relações significativas nos MLEs foram incluídas em modelos lineares simples (ML), para traçar as regressões e obter os valores de significância (p) e ajuste (r^2). As relações entre variáveis com valores de p significativos ($p < 0,05$) para os MLEs, mas não significativos para os ML não foram consideradas. Relações significativas nos MLEs com variáveis discretas com mais de dois tratamentos foram sujeitas ao teste de Tukey. Da mesma forma, diferenças entre as médias de variáveis com valores p significativos ($p < 0,05$) para os MLEs, mas não significativas no teste de Tukey também não foram consideradas.

Para verificar a influência de variáveis ambientais sobre a termotolerância (T50) e a acidez titulável foi realizada uma partição hierárquica, utilizando o algoritmo de

Chevan & Sutherland (1991). No qual é utilizado um método baseado em hierarquias que, a partir da decomposição do R^2 produzido por regressões múltiplas, determina-se a contribuição de cada variável independente. É calculada, então, a contribuição independente média, de cada variável, relativa ao total de todas as contribuições independentes (I_c) (Chevan & Sutherland, 1991). As variáveis utilizadas como preditoras foram a temperatura (definida como a média da temperatura ambiental obtida pelo INMET, na hora da coleta, uma hora a menos e uma hora a mais desse horário, nos três períodos do ano), a temperatura do dia anterior (definida como a média da temperatura ambiental obtida pelo INMET, 23, 24 e 25 horas antes da hora da coleta, nos três períodos do ano), radiação e umidade (definidas da mesma forma que a temperatura), radiação e umidade do dia anterior (definidas da mesma forma que a temperatura do dia anterior), região e orientação foliar. Essas últimas variáveis foram incluídas no teste pela possível interação com as variáveis ambientais citadas anteriormente. A partição hierárquica foi, então, randomizada para 1000 repetições, para a obtenção da significância dos valores de contribuição independente e relativa de cada variável ($p < 0,05$). Com as variáveis com maior contribuição relativa nas partições hierárquicas da termotolerância e da acidez titulável foram feitas regressões simples para obter os valores de significância (p) e de ajuste (r^2). Essas análises também foram todas realizadas através do pacote estatístico R 2.15.2 (R Core Team, 2012).

RESULTADOS

Foram registradas, durante o veranico e a estação seca, as menores umidades relativas do ar ao meio dia (33 e 36%, respectivamente), e os maiores valores diários de radiação solar (3710 e 3131 KJm^{-2} , respectivamente). O veranico apresentou a maior temperatura média (25,6 °C) e a estação seca a menor (19,5°C), já a estação chuvosa apresentou uma temperatura média de 22,5°C. Nessa última estação foi detectada a maior UR ao meio dia (67%) e a menor taxa de radiação solar (2571 KJm^{-2}) (figura 2).

No período do dia com as maiores valores da temperatura do ar (11-13 horas), foram observadas as maiores diferenças de temperatura entre o ar e as superfícies foliares (figura 3). A região apical das folhas com orientação N-S apresentaram as maiores temperaturas durante o dia (~42,5°C), cerca de 7°C acima da temperatura do ar (tabela 1). Já a região do ápice das folhas com orientação S-N apresentaram as menores temperaturas no período mais quente (~39,4°C), apenas 3°C acima da temperatura do

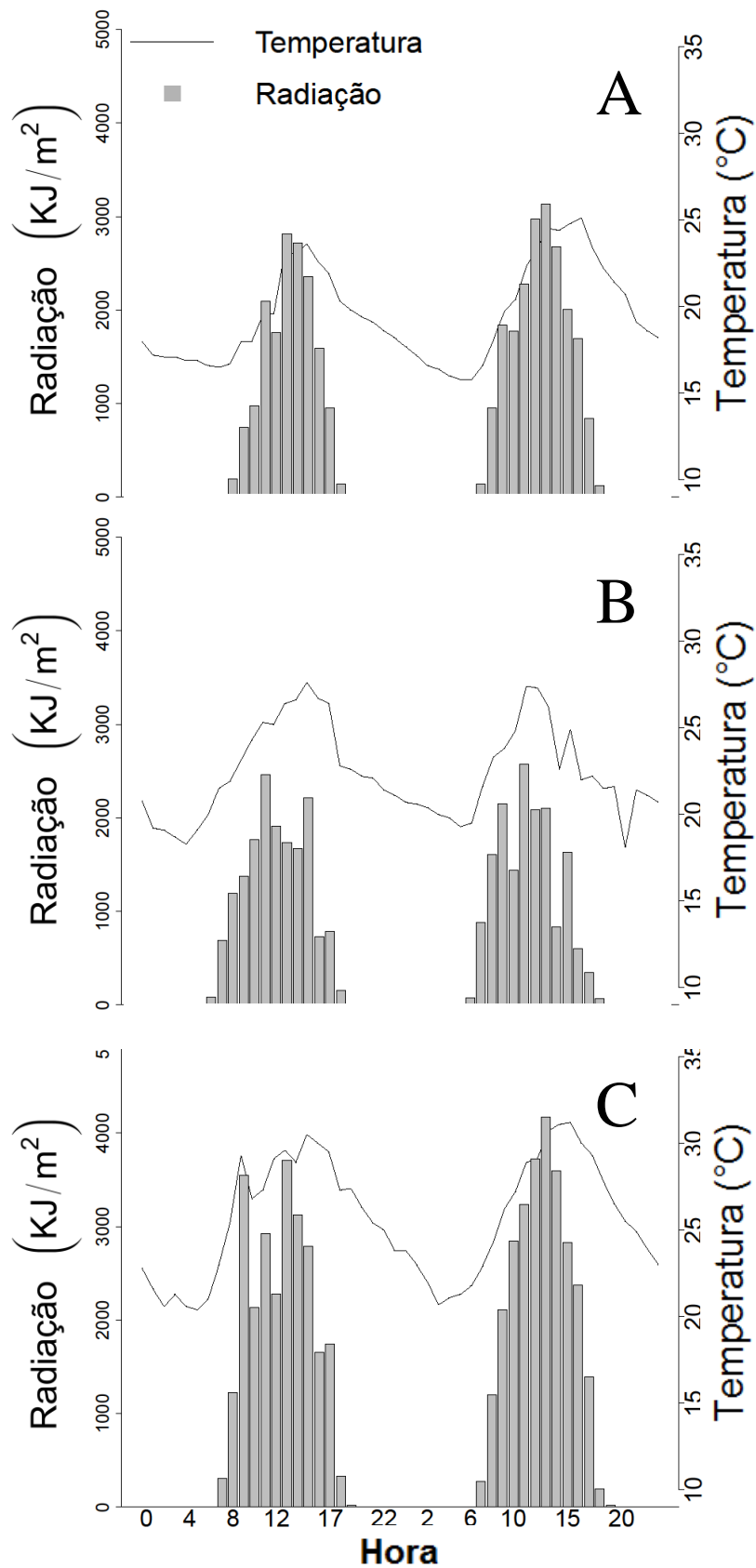


Figura 2: Radiação solar (barras) e temperatura do ar (linhas) registrados no dia da coleta dos materiais e 24 horas antes, na estação seca (A), chuvosa (B) e no veranico (C) pelo INMET, na estação Pampulha – A521.

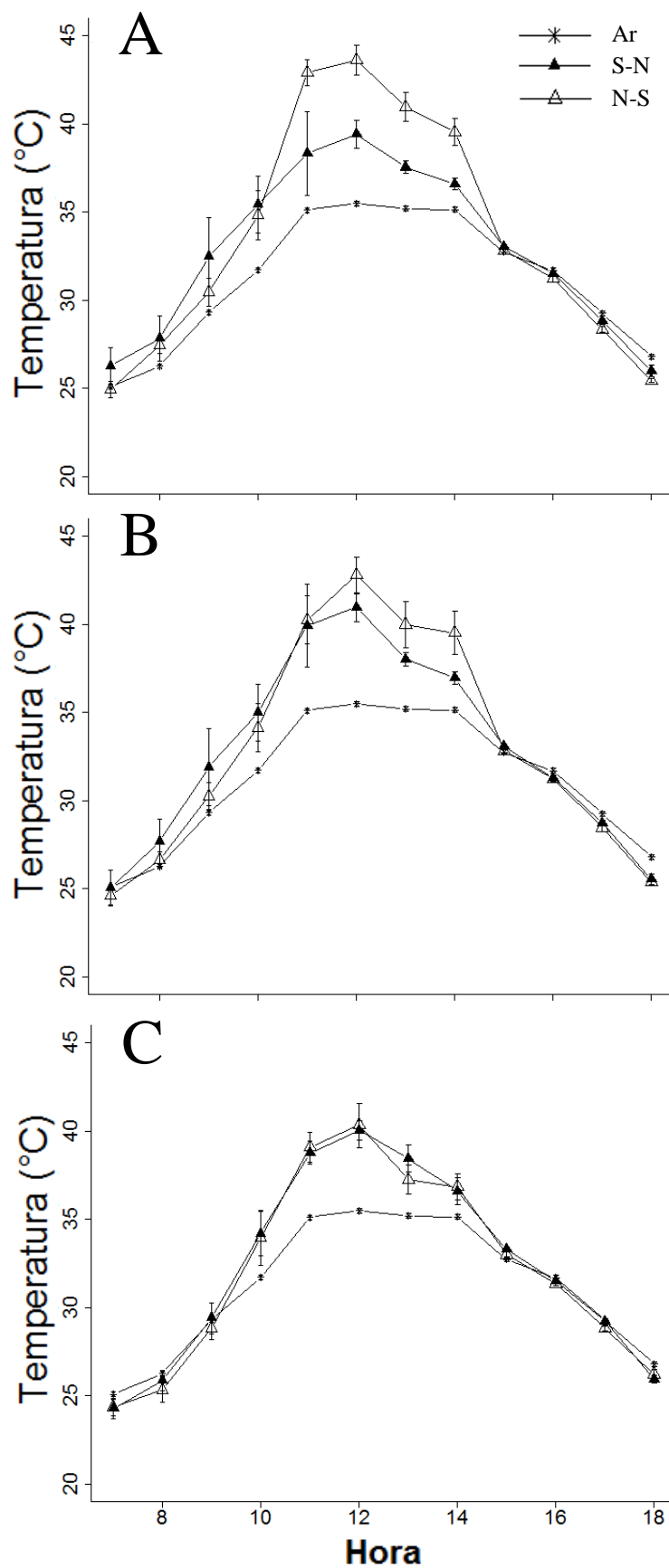


Figura 3: Temperaturas médias registradas ao longo do dia (7 as 18 horas) no ápice (A), meio (B) e base (C) de folhas de *A. blanchetiana* com orientação norte-sul (N-S) e sul-norte (S-N).

Tabela 1: Média \pm erro padrão da temperatura do ar e das temperaturas foliares registradas no ápice, meio e base das folhas de *A. blanchetiana* com orientação sul-norte (S-N) e norte-sul (N-S), no período do dia com as temperaturas mais elevadas (11, 12 e 13 horas).

Orientação foliar	Região foliar	Média \pm erro padrão
Sul-Norte	Ápice	38.42 \pm 0.9 ^C
	Meio	39.6 \pm 0.6 ^{BC}
	Base	39.09 \pm 0.4 ^{BC}
Norte-Sul	Ápice	42.51 \pm 0.6 ^A
	Meio	41.03 \pm 0.8 ^{AB}
	Base	38.89 \pm 0.7 ^{BC}
Ar		35.26 \pm 0.1

ar. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre as temperaturas registradas nas diferentes regiões das folhas com orientação S-N, ao contrário do observado para as folhas com orientação N-S, onde a região próxima ao ápice apresentou maiores valores que a região basal.

Foram observadas diferenças nos valores de T15 somente na estação chuvosa, quando as bases foliares apresentaram os maiores valores (48°C) em relação aos do ápice e meio das folhas no mesmo período (~44°C). Não foram observadas variações diárias nem sazonais significativas dos valores de T15 (tabela 2). A base das folhas coletadas durante o veranico apresentaram T50 estatisticamente maiores (52,5°C) do que o ápice e o meio das folhas coletadas nesse mesmo período (~46,7°C para ambos). Na estação seca e na chuvosa, porém, essa diferença não foi observada (tabela 3). Amostras coletadas às 15 horas apresentaram valores de T50 significativamente maiores (média de 49,6°C) do que as amostras coletadas às 8 horas (média de 45,7°C), principalmente na estação seca (tabela 3). De modo geral, não foram observadas diferenças sazonais significativas dos valores de T50 (tabela 2). Apesar de, no MLE, ter sido registrada uma interação entre os valores de T50, hora da coleta e região foliar, não foram observadas diferenças entre esses tratamentos pelo teste de Tukey. Foram observadas relações inversamente proporcionais entre T15 e acidez titulável nas amostras coletadas durante a estação chuvosa ($r^2 = 0,25$ e $p = 0,00003$) e no veranico ($r^2 = 0,16$ e $p = 0,0008$). Uma fraca relação negativa entre essas mesmas variáveis também

Tabela 2: Resultado dos MLEs para T15 e T50. A terceira e quarta colunas da tabela representam, cada uma, um MLE no qual a variável resposta está representada no cabeçalho. No cabeçalho das linhas estão representadas as variáveis utilizadas como preditoras dos MLEs e as suas interações que foram significativas para algum dos MLEs construídos. Os valores nas células representam a média \pm erro padrão de cada um dos tratamentos. P: valor de significância (p) encontrado para cada variável preditora utilizada. Letras diferentes representam médias estatisticamente diferentes.

		T15 (°C)	T50 (°C)
Hora do dia	8h	43.62 \pm 0.40	45.69 \pm 0.51
	15h	45.49 \pm 0.33	49.60 \pm 0.33
	P	0.13690	<0.0001
Região foliar	Ápice	43.84 \pm 0.44	46.63 \pm 0.55 ^B
	Meio	44.21 \pm 0.47	47.03 \pm 0.61 ^B
	Base	45.62 \pm 0.45	49.27 \pm 0.53 ^A
	P	0.32160	0.00010
Período do ano	Estação seca	44.24 \pm 0.38	46.83 \pm 0.39
	Estação chuvosa	44.45 \pm 0.35	47.46 \pm 0.54
	Veranico	44.97 \pm 0.62	48.65 \pm 0.75
	P	0.41060	0.06140
Orientação foliar	Sul-Norte	44.60 \pm 0.40	47.73 \pm 0.51
	Norte-Sul	44.51 \pm 0.35	47.56 \pm 0.44
	P	NS	NS
Acidez titulável	P	<0.0001	0.00150
Estômatos/mm ² **	P	NS	0.01000 **
Hora do dia X Região foliar	P	NS	0.00770
Região foliar X Período do ano	P	0.01790	<0.0001
Hora do dia X Acidez titulável	P	0.03720	NS
Período do ano X Acidez titulável	P	0.00230	0.02110

NS: valor $p > 0,05$, variável preditora não utilizada no MLE final

** Variável utilizada em um MLE separado, somente com os dados obtidos na estação seca

Tabela 3: Média \pm erro padrão dos valores de T50 obtidos em *A. blanchetiana* entre os horários de coleta, as regiões foliares e o período do ano. Letras iguais na segunda coluna representam médias de T50 estatisticamente iguais em todos os períodos do ano. Letras iguais, na última coluna representam médias estatisticamente iguais em de cada período do ano.

Período do ano	Região foliar	Hora do dia	Média T50 \pm erro padrão ($^{\circ}$ C)
Estação seca	Ápice ^B	8h	44.62 \pm 0.7 ^C
		15h	48.99 \pm 0.8 ^{AB}
	Meio ^B	8h	46.06 \pm 0.5 ^B
		15h	48.17 \pm 1.3 ^A
	Base ^B	8h	44.66 \pm 0.7 ^C
		15h	48.47 \pm 0.4 ^A
Estação chuvosa	Ápice ^B	8h	43.3 \pm 1.4 ^B
		15h	49.5 \pm 0.5 ^A
	Meio ^B	8h	43.8 \pm 0.01 ^B
		15h	50.7 \pm 0.8 ^A
	Base ^{AB}	8h	47.9 \pm 1.6 ^A
		15h	49.57 \pm 0.5 ^A
Veranico	Ápice ^B	8h	43.76 \pm 1.6 ^B
		15h	49.63 \pm 1 ^{AB}
	Meio ^B	8h	44.12 \pm 2.1 ^B
		15h	49.32 \pm 1.8 ^{AB}
	Base ^A	8h	53.02 \pm 1.3 ^A
		15h	52.03 \pm 0.8 ^A

foi observada nas amostras coletadas pela manhã em todas os períodos do ano ($r^2 = 0,07$ e $p = 0,007$). Uma fraca relação positiva foi observada entre T50 e densidade estomática, durante a estação seca ($r^2 = 0,06$ e $p = 0,035$). Foi encontrada, ainda, uma relação negativa entre T50 e a acidez titulável, principalmente na estação chuvosa (figura 4) ($r^2 = 0,55$ e $p < 0,00001$), mas também na estação seca ($r^2 = 0,13$ e $p = 0,003$) e no veranico ($r^2 = 0,30$ e $p = 0,00001$).

Os maiores valores da acidez titulável foram registrados no período da manhã (8h) em todas as regiões foliares analisadas (tabela 4), sendo que os maiores acúmulos de ácidos orgânicos foram registrados no ápice e no meio das folhas (cerca de 268,3 e 253,1 $\mu\text{eq H}^+\text{g}^{-1}\text{MF}$, respectivamente) pela manhã. Nessas mesmas regiões foliares, também foram observadas as maiores variações diárias da acidez titulável (tabela 5). Além disso, o acúmulo de ácidos, pela manhã, foi significativamente maior durante a estação chuvosa (302 $\mu\text{eq H}^+\text{g}^{-1}\text{MF}$) do que nos outros períodos do ano (192,6 e 127,3 $\mu\text{eq H}^+\text{g}^{-1}\text{MF}$, para a estação seca e o veranico, respectivamente). Maiores valores de ΔH^+ foram observados no ápice e no meio das folhas (figura 5). As folhas S-N apresentaram acidez titulável às 8h significativamente maior (227,6 $\mu\text{eq H}^+\text{g}^{-1}\text{MF}$) do que as folhas com orientação N-S (187 $\mu\text{eq H}^+\text{g}^{-1}\text{MF}$), similar ao observado para ΔH^+ (tabela 5). Apesar de ter sido sugerida, pelo MLE (tabela 4), uma relação significativa entre a acidez titulável, a densidade de escamas e a região foliar, isso não foi evidenciado pelo ML. Foi observada, porém, uma fraca, mas significativamente positiva, relação entre a densidade de estômatos e a acidez titulável, nos dois horários de coleta durante a estação seca ($r^2 = 0,11$ e $p = 0,04$, às 8h e $r^2 = 0,23$ e $p = 0,004$, às 15h). Além disso, uma relação negativa de ΔH^+ com a densidade de escamas foi observada na folha S-N ($r^2 = 0,3$ e $p = 0,02$).

Os valores do índice de succulência (IS) foram estatisticamente maiores na região foliar do ápice durante a estação seca (7,1, para o ápice e 5,9 e 5,8, para o meio e a base, respectivamente). Nas outras estações, porém, essa diferença não foi observada, variando em torno dos 5,5 em todas as regiões foliares. O conteúdo hídrico relativo (CHR) foi estatisticamente maior às 8h apenas durante o veranico (88,3% as 8h e 81,7% as 15h), quando esses valores foram estatisticamente menores do que nas outras estações (tabela 4). Na estação chuvosa, foram encontrados valores de CHR significativamente maiores no ápice e no meio das folhas (91 e 89,6%,

Tabela 4: Resultado dos MLEs para o conteúdo hídrico relativo (CHR), índice de succulência (IS) e acidez titulável. A terceira, quarta e quinta colunas da tabela representam, cada uma, um MLE no qual a variável resposta está representada no cabeçalho. No cabeçalho das linhas estão representadas as variáveis utilizadas como preditoras dos MLEs e as suas interações que foram significativas para ao menos um dos MLEs apresentados. Os valores nas células representam a média \pm erro padrão de cada um dos tratamentos. P: valor de significância (p) encontrado para cada variável preditora utilizada. Letras diferentes representam médias estatisticamente diferentes.

		CHR (%)	IS	Acidez titulável ($\mu\text{eq H}^+\text{g}^{-1}$ MF)
Hora do dia	8h	88.31 \pm 0.38	5.64 \pm 0.07	207.30 \pm 13.74
	15h	86.81 \pm 0.64	5.76 \pm 0.17	48.61 \pm 4.0
	P	0.00370	NS	<0.0001
Região foliar	Ápice	88.92 \pm 0.61 ^A	5.98 \pm 0.25 ^A	196.57 \pm 17.97 ^A
	Meio	88.06 \pm 0.73 ^A	5.50 \pm 0.07 ^B	202.12 \pm 20.14 ^A
	Base	85.69 \pm 0.53 ^B	5.61 \pm 0.08 ^B	77.35 \pm 8.64 ^B
	P	0.00030	0.04630	<0.0001
Período do ano	Estação seca	89.40 \pm 0.37 ^A	6.27 \pm 0.24 ^A	159.58 \pm 17.59 ^B
	Estação chuvosa	88.26 \pm 0.59 ^A	5.41 \pm 0.06 ^B	220.15 \pm 21.37 ^A
	Veranico	85.02 \pm 0.79 ^B	5.42 \pm 0.06 ^B	96.32 \pm 10.73 ^B
	P	0.00190	0.00280	<0.0001
Orientação foliar	Sul-Norte	87.47 \pm 0.58	5.68 \pm 0.12	177.72 \pm 15.72
	Norte-Sul	87.65 \pm 0.48	5.71 \pm 0.13	139.64 \pm 15.49
	P	NS	NS	0.01610
Escamas/mm ² **	P	0.83680**	NS	0.77400**
Estômatos/mm ² **	P	0.11250**	NS	0.00150**
Hora do dia X Região foliar	P	NS	NS	<0.0001
Hora do dia X Período do ano	P	<0.0001	NS	<0.0001
Hora do dia X Orientação foliar	P	NS	NS	0.01280
Hora do dia X Estômatos/mm ² **	P	NS	NS	0.04090**
Região foliar X Período do ano	P	0.00150	0.00850	<0.0001
Região X Escamas/mm ² **	P	NS	NS	0.01600**
Região X Estômatos/mm ² **	P	0.01300**	NS	NS
Período do ano X Orientação foliar	P	NS	NS	0.02910
Direção X Estômatos/mm ² **	P	0.04300**	NS	NS
Escamas X Estômatos/mm ² **	P	0.01440**	NS	NS

NS: valor $p > 0,05$, variável preditora não utilizada no MLE final

** Variável utilizada em um MLE separado, somente com os dados obtidos na estação seca

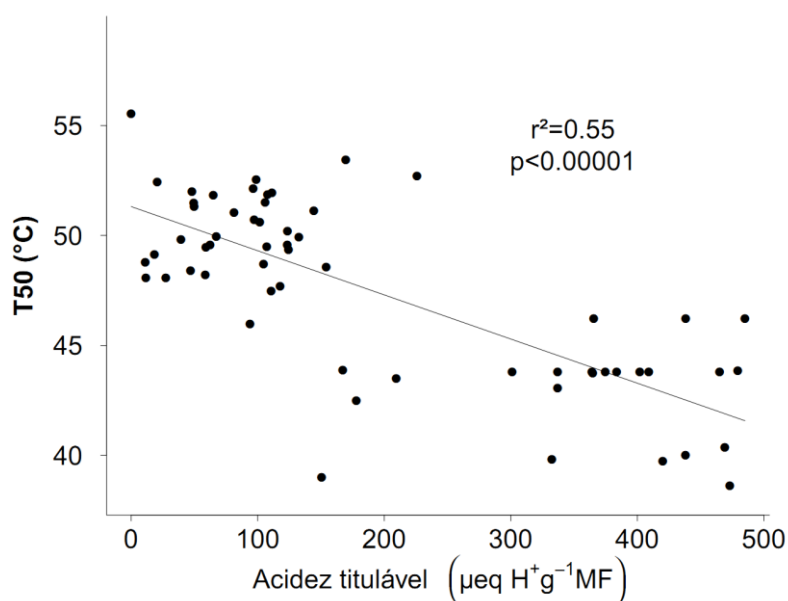


Figura 4: Relação entre T50 e a acidez titulável de folhas de *A. blanchetiana* coletadas durante a estação chuvosa.

Tabela 5: Resultado do MLE para ΔH^+ . A primeira coluna representa as variáveis utilizadas como preditoras para o modelo. A última coluna mostra as médias \pm erros-padrão de cada tratamento dentro de cada variável. Nessa coluna também foi representado o valor p encontrado para cada variável do modelo. Letras diferentes representam médias estatisticamente diferentes.

		ΔH^+ ($\mu\text{eq H}^+\text{g}^{-1}\text{MF}$)
Região foliar	Ápice	198.570 ± 17.97^A
	Meio	202.125 ± 20.14^A
	Base	77.351 ± 8.64^B
	P	<0.0001
Período do ano	Estação seca	159.582 ± 17.59^B
	Estação chuvosa	220.146 ± 21.37^A
	Veranico	96.316 ± 10.73^C
	P	<0.0001
Orientação foliar	Sul-Norte	177.723 ± 15.72
	Norte-Sul	139.639 ± 15.49
	P	0.0051
Região foliar X Período do ano	P	0.0004
Período do ano X Orientação foliar	P	0.0061

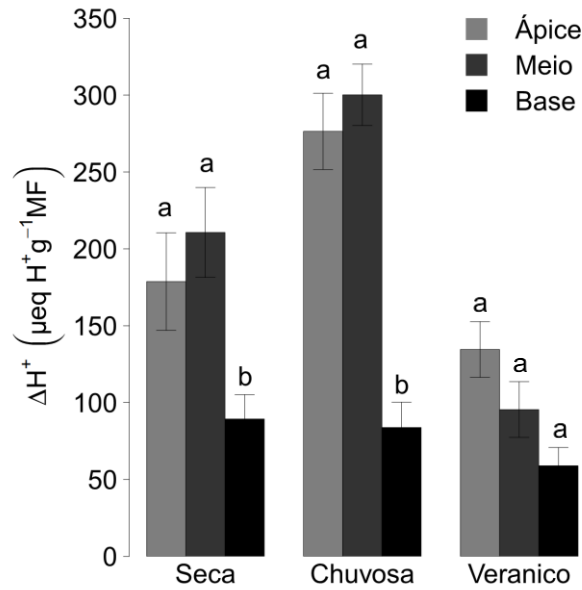


Figura 5: Média \pm erro padrão da variação diária da acidez titulável (ΔH^+) no ápice, meio e base das folhas de *A. blanchetiana* coletadas na estação seca, chuvosa e no veranico. Letras diferentes representam médias estatisticamente diferentes entre as regiões foliares em cada período do ano.

respectivamente), quando comparados à base (84,2%), o que não foi observado no veranico e nem na estação seca. Foram observadas fracas relações positivas entre CHR e densidade de estômatos na base das folhas ($r^2 = 0,25$ e $p = 0,015$) e em todas as regiões das folhas N-S ($r^2 = 0,11$ e $p = 0,04$). Relações significativas entre CHR, densidade de escamas e densidade de estômatos, observados no MLE (tabela 4), não foram evidenciadas no ML.

A epiderme abaxial das folhas de *A. blanchetiana* apresentaram maiores densidades de escamas ($19,8 \text{ mm}^{-2}$) do que a epiderme adaxial ($14,5 \text{ mm}^{-2}$) (tabela 6). O ápice e o meio das folhas de *A. blanchetiana* apresentaram densidades estatisticamente maiores de estômatos ($129,85$ e $124,3 \text{ mm}^{-2}$, respectivamente) do que a base foliar (94 mm^{-2}) (tabela 6).

As partições hierárquicas mostraram, tanto para a T50, quanto para a acidez titulável, uma maior contribuição relativa das variáveis ambientais registradas no dia anterior à coleta das amostras, comparadas às registradas no momento da coleta (figura 6). Além disso, foi observada, em ambas as análises, uma alta contribuição relativa da região foliar e uma baixa e não significativa contribuição da orientação foliar (figura 6). As variáveis ambientais que apresentaram maior contribuição independente, na partição hierárquica realizada para T50, foram a umidade do dia anterior e a região foliar (figura

6.A), no qual o total de todas as contribuições individuais (I_c) foi cerca de 0,29. Na partição hierárquica realizada para a acidez titulável, as variáveis ambientais que apresentaram maior contribuição independente também foram a umidade do dia anterior e a região foliar (figura 6.B), sendo que o total de todas as contribuições individuais (I_c) foi de aproximadamente 0,75.

Tabela 6: Resultado do MLE para a densidade de estômatos e de tricomas nas folhas de *A. blanchetiana* coletadas durante a estação seca. A segunda e terceira colunas da tabela representam, cada uma, um MLE no qual a variável resposta está representada no cabeçalho. No cabeçalho das linhas estão representadas as variáveis utilizadas como preditoras dos MLEs. Os valores nas células representam a média \pm erro padrão de cada um dos tratamentos. P: valor de significância (p) encontrado para cada variável preditora utilizada. Letras diferentes representam médias estatisticamente diferentes.

		Escamas/mm ²	Estômatos/mm ²
Epiderme foliar	Abaxial	19.75 \pm 0.94	
	Adaxial	14.52 \pm 0.8	NA
	P	<0.0001	
Região foliar	Ápice	16.51 \pm 0.9	129.85 \pm 6.26 ^A
	Meio	16.39 \pm 1.21	124.31 \pm 8.68 ^A
	Base	18.51 \pm 1.47	94.05 \pm 9.28 ^B
	P	NS	0.01010
Orientação foliar	Sul-Norte	16.12 \pm 1.04	113.97 \pm 8.94
	Norte-Sul	18.15 \pm 0.92	118.17 \pm 6.38
	P	NS	NS

NS: valor $p > 0,05$, variável preditora não utilizada no MLE final

NA: não se aplica

A partir dos resultados obtidos nas partições hierárquicas, foram feitas regressões comparando os valores de T50 e de acidez titulável, obtidos em cada região foliar, com os valores registrados para a umidade relativa do ar, a temperatura ambiente e a radiação solar, registradas no dia anterior à coleta das amostras (figura 7). As relações encontradas para T50 foram positivas para a temperatura ambiente e para a radiação solar e negativa para a umidade relativa do ar (figuras 7.A-C). Para a acidez titulável, por outro lado, as relações com as variáveis ambientais foram exatamente o inverso das observadas para T50 (figuras 7.D-F). A única relação não significativa ($p > 0,05$) observada dentre essas regressões foi encontrada entre a radiação solar e os valores de T50 registrados no meio das folhas de *A. blanchetiana* (tabela 7). Os valores de ajuste (r^2) observados nas regressões utilizando a acidez titulável foram, geralmente, maiores que os obtidos para T50 (tabela 7).

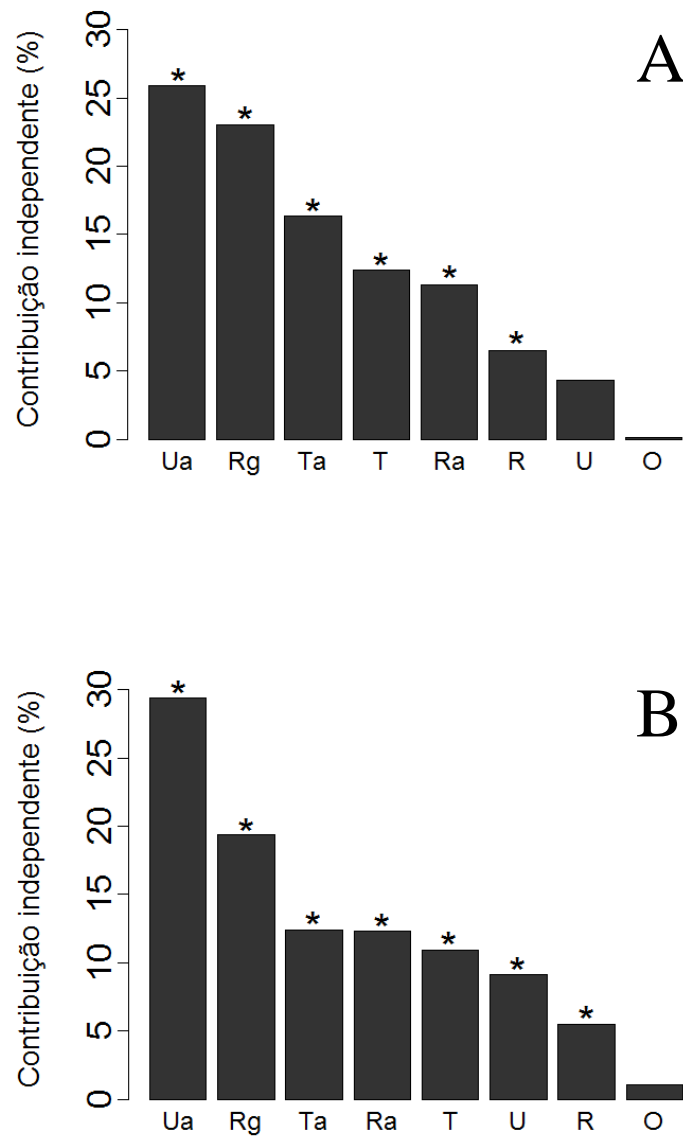


Figura 6: Contribuição independente relativa da umidade (U), umidade do dia anterior (Ua), radiação (R), radiação do dia anterior (Ra), temperatura (T), temperatura do dia anterior (Ta), região (Rg) e orientação foliar (O) nas partições hierárquicas realizadas com os valores de T50 (A) e de acidez titulável de *A. blanchetiana* (B). Os asteriscos (*) representam valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) para a contribuição de cada variável em uma randomização de 1000 repetições.

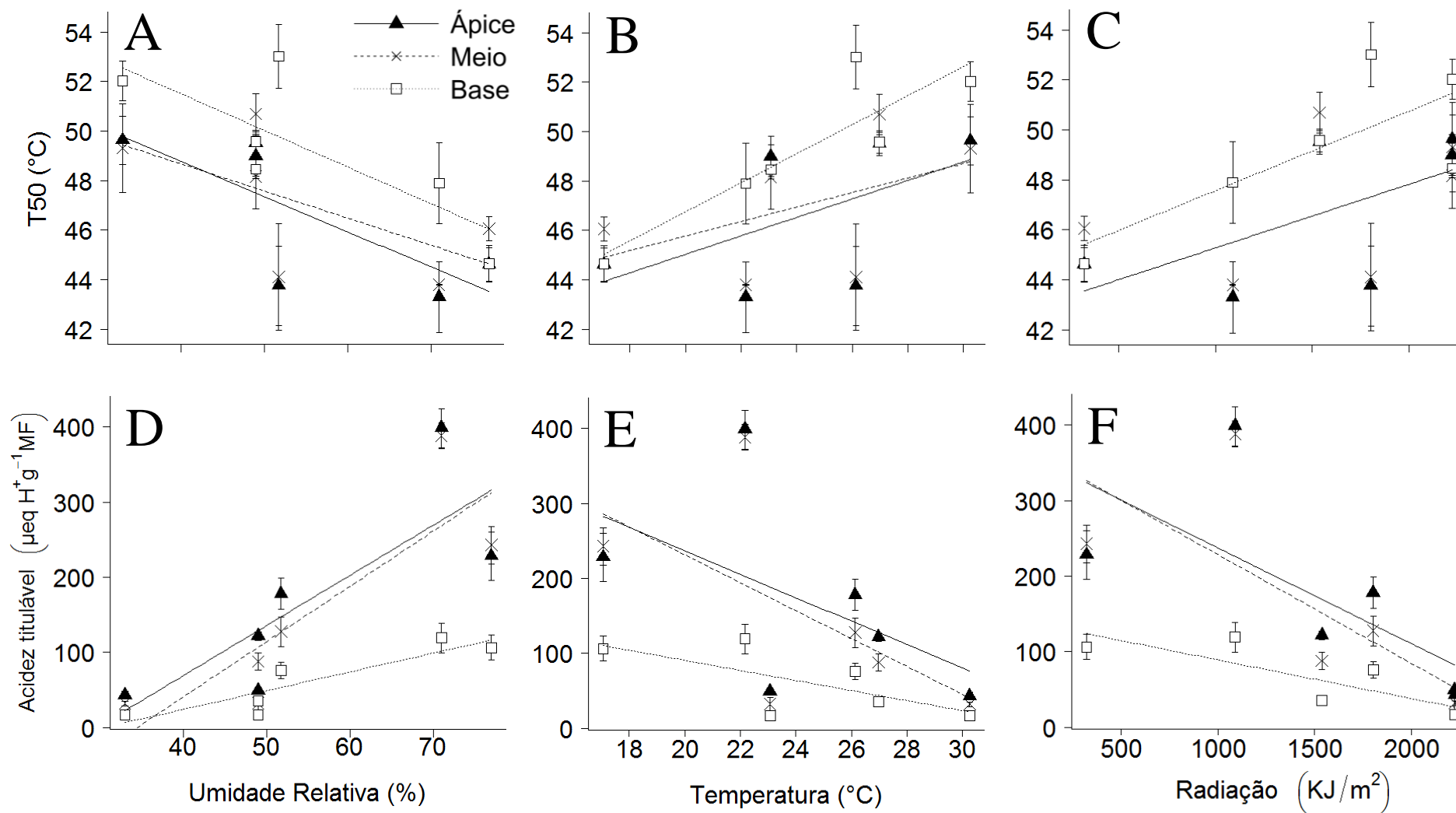


Figura 7: Relações significativas ($p < 0,05$) da acidez titulável (A, B e C) e dos valores de T50 (D, E e F) obtidos em cada região foliar de *A. blanchetiana*, com a umidade relativa do ar (A e D), a temperatura do ar (B e E) e a radiação solar (C e F), registradas pelo INMET nos dois horários, um dia antes dos experimentos (23, 24 e 25 horas antes de cada amostragem). Os valores da significância (p) e do ajuste (r^2) de cada regressão encontram-se representados na tabela 7.

Tabela 7: Valores de significância (p) e de ajuste (r^2) obtidos nas regressões lineares feitas com os valores de T50 e da acidez titulável com a umidade relativa do ar, a temperatura do ar e a radiação solar registradas, pelo INMET (figura 7), nos dois horários, um dia antes dos experimentos (23, 24 e 25 horas antes de cada amostragem).

		T50			Acidez titulável		
		Ápice	Meio	Base	Ápice	Meio	Base
Umidade Relativa do ar	p	0.00006	0.007	< 0.00001	< 0.00001	< 0.00001	< 0.00001
	r^2	0.23	0.1	0.28	0.53	0.63	0.45
Temperatura do ar	p	0.0038	0.0449	< 0.00001	0.00009	0.00002	0.00003
	r^2	0.12	0.05	0.35	0.22	0.31	0.25
Radiação solar	p	0.0014	> 0.05	0.00002	< 0.00001	< 0.00001	< 0.00001
	r^2	0.15		0.26	0.39	0.49	0.39

DISCUSSÃO

Cactos de ambientes desérticos localizados no hemisfério sul tendem a se inclinar em direção ao norte geográfico em busca de uma maior taxa de radiação solar no ápice caulinar (Nobel, 1981), sendo que as faces dos cladódios de cactos orientados em direção ao norte geográfico recebem menor radiação fotossinteticamente ativa (PAR) do que os direcionados para o sul (Geller & Nobel, 1987). Considerando que o ângulo de incidência dos raios solares em uma folha afeta diretamente a temperatura foliar (Medina *et al.*, 1978; Wolpert, 1962), as maiores temperaturas registradas no ápice das folhas N-S de *A. blanchetiana* provavelmente se devem ao posicionamento mais perpendicular dessas folhas em relação à radiação solar, recebendo, portanto, maior incidência de luz do que as folhas S-N, que estão mais paralelas à radiação (figura 1). No entanto, essas diferenças na variação diária da temperatura observada entre folhas com orientações distintas de *A. blanchetiana*, apesar de possivelmente ter influenciado o acúmulo de ácidos orgânicos, não influenciou de forma significativa a variação da termotolerância registrada nessa espécie.

O valor médio de T50 encontrado para *A. blanchetiana* (47,64°C) foi menor do que o encontrado por Weng & Lai (2005) para *Ananas comosus*, outra bromélia CAM (T50 = 49,16°C, calculado a partir do Tc encontrado pelos autores, segundo fórmula apresentada por Knight & Ackerly, 2002), mas foi superior à média de T50 encontrada em *V. bituminosa* (45,7°C) e *V. minarum* (46,2°C) (capítulo I). O valores de T50 encontrados em *A. blanchetiana*, no entanto, foram menores do que os encontrados em

indivíduos sombreados de *A. nudicaulis* (capítulo I; 49,4°C), mas foram maiores do que os indivíduos a pleno sol dessa mesma espécie (46,8°C). Assim como observado nos indivíduos a pleno sol de *A. nudicaulis* (capítulo I) e de *Loiseleuria procumbens*, um arbusto andino (Braun *et al.*, 2002), foram registradas grandes variações diárias da termotolerância de *A. blanchetiana* (de até 7°C), na estação chuvosa. Diferentemente do observado nas três espécies do capítulo I, foram observados valores de termotolerância 9,3°C superiores nas bases foliares de *A. blanchetiana*, durante o veranico, quando comparados aos obtidos no ápice das folhas dessa espécie, no mesmo período do ano. Além disso, a base foliar de *A. blanchetiana*, que apresentou a maior termotolerância, foi a única região foliar que apresentou variação sazonal da tolerância a altas temperaturas, com um acréscimo de cerca de 8°C nos valores de T50 registrados no veranico, quando comparados aos observados na estação seca. Essa variação sazonal foi superior à encontrada para *A. comosus* (~0,7°C de diferença; Weng & Lai, 2005) e *V. bituminosa* (~1,5°C de diferença; capítulo I). A variação da termotolerância entre as regiões foliares de *A. blanchetiana* indica um possível papel de proteção do ápice foliar, região mais fotossinteticamente ativa (Freschi *et al.*, 2010), pela base foliar. Condição que se reflete também nas outras diferenças existentes entre o ápice e a base foliar, já registradas em outras espécies (Freschi *et al.*, 2010; Popp *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2007; Takahashi & Mercier, 2011) e reiteradas, no presente trabalho, pelas variações detectadas na acidez titulável, suculência e densidade de estômatos. Dentre essas, a que mais merece destaque é a acidez titulável que, a despeito da baixa relação com a termotolerância de *A. nudicaulis*, detectada no primeiro capítulo, teve uma forte relação negativa com a termotolerância de *A. blanchetiana*. Resultados similares foram descritos por Kappen & Lösch (1984), no qual a acidez titulável de *Aeonium haworthii* e de *Aichryson laxum*, duas crassuláceas, foram relacionadas com a sua termotolerância, medida em graus de injúria visual. Segundo esses autores, essa relação pode ser explicada pelo aumento da fluidez do tonoplasto, que possibilita a elevação da permeabilidade e do efluxo do malato acumulado no vacúolo, danificando diversas estruturas celulares (Kappen & Lösch, 1984; Lösch & Kappen, 1983), dentre elas o aparato fotossintético. Dessa forma, quanto maior a quantidade de ácidos acumulados no vacúolo, maior seria o dano ao aparato fotossintético com a elevação da temperatura e, por consequência, menor seria sua termotolerância.

Outros aspectos que podem envolver a termotolerância fotossintética em plantas são as variáveis ambientais, como o nível de radiação solar, temperatura ambiente e a disponibilidade de água. Segundo Valladares & Pearcy (1997), por exemplo, o estresse hídrico pode aumentar a resistência fotossintética a altas temperaturas e o estresse luminoso pode elevar os danos provocados por altas temperaturas ao fotossistema II. No entanto, o aumento do estresse por altas temperaturas é frequentemente associado à baixa disponibilidade hídrica (Simões-Araújo *et al.*, 2003). O aumento da taxa de transpiração, por exemplo, induz a uma deficiência hídrica que leva à perturbação de muitos processos fisiológicos (Tsukaguchi *et al.*, 2003), como a fotossíntese. Isso poderia explicar a negativa relação entre a termotolerância de *A. blanchetiana* e a umidade relativa do ar, observada no presente estudo. Além disso, conforme Knight & Ackerly (2002), há uma relação negativa entre a termotolerância fotossintética de espécies costeiras e desérticas da Flórida, Estados Unidos, e os níveis de insolação e de precipitação. Relações positivas entre a temperatura foliar e a radiação solar também foram observadas em *L. procumbens*, por Braun *et al.* (2002). A alta irradiação solar e a alta temperatura ambiental co-ocorrem em muitos ambientes naturais. Dessa forma, um aumento da adaptação fotossintética a altas temperaturas podem resultar em um aumento da resistência a alta radiação solar, o que poderia explicar a relação positiva observada entre essas variáveis e a termotolerância fotossintética de *A. blanchetiana*.

Além disso, foi observado nas partições hierárquicas, da termotolerância e da acidez titulável, a maior contribuição individual relativa das variáveis ambientais registradas no dia anterior a coleta das amostras de *A. blanchetiana*. Esses resultados indicam que as variações, tanto da termotolerância, quanto do acúmulo de ácidos orgânicos nessa espécie não são instantâneas, mas se relacionam a modificações ambientais ocorridas em um passado recente. No entanto, o baixo valor total de contribuições individuais das variáveis ambientais, obtido na partição hierárquica de T50 ($I_c = 0,29$), e os baixos valores de ajuste das regressões construídas com as variáveis ambientais de maior contribuição individual, nessa partição (maior valor de $r^2 = 0,35$ e menor valor de $r^2 = 0,05$), sugerem a existência de outras variáveis influenciando a termotolerância de *A. blanchetiana*. Uma delas poderia ser a acidez titulável, que, além de estar diretamente relacionada aos valores de T50, foi mais influenciada pelas variáveis ambientais ($I_c = 0,75$, na partição hierárquica; $0,22 < r^2 < 0,63$, nas regressões), que podem indiretamente ter afetado a termotolerância.

A influência de variáveis ambientais, como a intensidade de radiação solar, a temperatura ambiente e a umidade relativa do ar no acúmulo de ácidos orgânicos de plantas CAM já foram intensivamente estudadas em vários trabalhos. Como foi observado no presente estudo, a elevação da temperatura ambiente e da radiação solar podem reduzir o acúmulo de ácidos orgânicos (Geller & Nobel, 1987; Grams *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 2006; Lüttge, 2004) e a elevação da disponibilidade hídrica pode induzir o efeito inverso (Friemert *et al.*, 1988; Kliemchen *et al.*, 1993). Uma variável morfológica que também teve relações significativas com a termotolerância e com a acidez titulável foi a densidade de estômatos. Essas relações, da mesma forma do observado para as variáveis climáticas, apresentaram maiores valores de ajustes para a acidez titulável do que para a termotolerância. Dessa forma, relações observadas entre a acidez titulável e outras variáveis podem influenciar indiretamente a termotolerância.

Além das diferenças observadas no acúmulo de ácidos orgânicos, também foram observadas diferenças na densidade estomática e na succulência entre diferentes regiões foliares de *A. blanchetiana*. Esses resultados se assemelham ao observado por Freschi *et al.* (2010) e podem indicar uma maior capacidade fotossintética do ápice das folhas de *A. blanchetiana*, que estão mais expostos às radiações solares e possuem menos restrições a trocas gasosas que as bases foliares, que estão em contato direto com a água do tanque e expostas a menores taxas luminosas (Freschi *et al.*, 2010). Tais diferenças podem se refletir em respostas distintas das regiões foliares a alterações das condições ambientais (Freschi *et al.*, 2010; Zotz & Hietz, 2001), explicando as diferenças de termotolerância observadas entre as regiões foliares de *A. blanchetiana*.

A variação na termotolerância fotossintética parece estar mais proximamente relacionada ao acúmulo diferencial de ácidos orgânicos em *A. blanchetiana*. Variações espaciais e ambientais da acidez titulável, portanto, provavelmente influenciam de forma indireta a termotolerância fotossintética dessa espécie. O presente trabalho é o primeiro a apresentar uma variação significativa da termotolerância fotossintética entre regiões foliares distintas de uma planta e o primeiro a relacioná-la ao acúmulo diferencial de ácidos orgânicos em uma planta CAM. As hipóteses levantadas neste trabalho podem ser investigadas por estudos em condições mais controladas, onde o acúmulo de ácidos orgânicos e a termotolerância fotossintética de uma planta CAM

sejam isolados das demais influências ambientais, de modo que a relação entre elas possa ser melhor estudada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Armond, P. A., Schreiber, U., & Björkman, O. 1978. Photosynthetic acclimation to temperature in the desert shrub, *Larrea divaricata*. *Plant Physiology*, 61: 411–415.
- Benzing, D. H. 2000. *Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation*: 710. Cambridge: Cambridge University Press.
- Berry, J. A., & Björkman, O. 1980. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 31: 491–543.
- Björkman, O. 1975. Photosynthetic responses of plants from contrasting thermal environments. Thermal stability of the photosynthetic apparatus in intact leaves. *Carnegie Institution of Washington Year Book*, 74: 748–751.
- Braun, V., Buncher, O., & Neuner, G. 2002. Thermotolerance of photosystem 2 of three alpine species under field conditions. *Photosynthetica*, 40(4): 587–549.
- Buckley, Y. M., Briese, D. T., & Rees, M. 2003. Demography and management of the invasive plant species *Hypericum perforatum*. I. Using multi-level mixed-effects models for characterizing growth, survival and fecundity in a long-term data set. *Journal of Applied Ecology*, 40: 481–493.
- Chevan, A., & Sutherland, M. 1991. Hierarchical Partitioning. *The American Statistician*, 45(2): 90–96.
- Crawley, M. J. 2002. *Statistical Computing: An Introduction to Data Analysis using S-Plus*: 772. Wiley.
- Cushman, J. C., & Borland, A. M. 2002. Induction of Crassulacean acid metabolism by water limitation. *Plant, Cell and Environment*, 25: 295–310.
- Cushman, John C. 2001. Crassulacean Acid Metabolism. A plastic photosynthetic adaptation to arid environments. *Plant Physiology*, 127: 1439–1448.
- Didden-Zopf, B., & Nobel, P. S. 1982. High temperature tolerance and heat acclimation of *Opuntia bigelovii*. *Oecologia*, 52: 176–180.
- Freschi, L., Takahashi, C. A., Cambui, C. A., Semprebom, T. R., Cruz, A. B., Mito, P. T., et al. 2010. Specific leaf areas of the tank bromeliad *Guzmania monostachia* perform distinct functions in response to water shortage. *Journal of Plant Physiology*, 167(7): 526–33.
- Friemert, V., Heininger, D., Kluge, M., & Ziegler, H. 1988. Temperature effects on malic-acids efflux from the vacuoles and on the carboxylation pathways in Crassulacean-acid-metabolism plants. *Planta*, 174(4): 453–461.
- Geller, G. N., & Nobel, P. S. 1987. Comparative cactus architecture and PAR interception. *American Journal of Botany*, 74(7): 998–1005.

- Gimeno, T. E., Pías, B., Lemos-Filho, J. P. de, & Valladares, F. 2009. Plasticity and stress tolerance override local adaptation in the responses of Mediterranean holm oak seedlings to drought and cold. *Tree physiology*, 29(1): 87–98.
- Godoy, O., De Lemos-Filho, J. P., & Valladares, F. 2011. Invasive species can handle higher leaf temperature under water stress than mediterranean natives. *Environmental and Experimental Botany*, 71(2): 207–214.
- Grams, T., Borland, a. M., Roberts, A., Griffiths, H., Beck, F., & Lüttge, U. 1997. On the Mechanism of Reinitiation of Endogenous Crassulacean Acid Metabolism Rhythm by Temperature Changes. *Plant physiology*, 113(4): 1309–1317.
- Hartsock, T. L., & Nobel, P. S. 1976. Watering converts a CAM plant to daytime CO₂ uptake. *Nature*, 262: 574–576.
- Havaux, M. 1992. Stress tolerance of photosystem II in vivo. Antagonistic Effects of water, heat, and photoinhibition stresses. *Plant Physiology*, 100: 424–432.
- Holtum, J. A. M., Winter, Kl., Weeks, M. A., & Sexton, T. R. 2007. Crassulacean acid metabolism in the ZZ plant *Zamioculcas zamiifolia* (Araceae). *American Journal of Botany*, 94(10): 1670–1676.
- IPCC. 2007. Summary for Policymakers. In M. L. Parry, O. F. Canzianik, J. P. Palutikof, P. J. van der Linden, & C. E. Hanson (Eds.), *Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*: 7–22. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- IPCC. 2012. *Managing the Risks of Extreme Events and Disasters to Advance Climate Change Adaptation. A Special Report of Working Groups I and II of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. (C. B. Field, V. Barros, T. F. Stocker, D. Qin, D. J. Dokken, K. L. Ebi, et al., Eds.): 582. Cambridge, UK and New York, USA: Cambridge University Press.
- Kappen, L., & Lösch, R. 1984. Diurnal patterns of heat tolerance in relation to CAM. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 114(1): 87–96.
- Kliemchen, A., Schomburg, M., Galla, H. J., Lüttge, U., & Kluge, M. 1993. Phenotypic changes in the fluidity of the tonoplast membrane of crassulacean-acid-metabolism plants in response to temperature and dalinity stress. *Planta*, 189(3): 403–409.
- Knight, C. A., & Ackerly, D. D. 2002. An ecological and evolutionary analysis of photosynthetic thermotolerance using the temperature-dependent increase in fluorescence. *Oecologia*, 130(4): 505–514.
- Larcher, W. 1994. Photosynthesis as a tool for indicating temperature events. In E.-D. Schulze & M. . M. Caldwell (Eds.), *Ecophysiology of photosynthesis*: 261–277. Berlin: Springer-Verlag.

- Lin, Q., Abe, S., Nose, A., Sunami, A., & Kawamitsu, Y. 2006. Effects of high night temperature on Crassulacean Acid Metabolism (CAM) photosynthesis of *Kalanchoë pinnata* and *Ananas comosus*. *Plant Production Science*, 9(1): 10–19.
- Lösch, R., & Kappen, L. 1983. Die temperaturresistenz makaronesischer Sempervivoidae. *Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie*, 10: 521–528.
- Lüttge, U. 2004. Ecophysiology of Crassulacean Acid Metabolism (CAM). *Annals of botany*, 93(6): 629–52.
- Martin, C. E. 1994. Physiological Ecology of the Bromeliaceae. *The Botanical Review*, 60(1): 1–82.
- Medina, E., Sobrado, M., & Herrera, R. 1978. Significance of leaf orientation for leaf temperature in an Amazonian sclerophyll vegetation. *Radiation and Environmental Biophysics*, 15(2): 131–40.
- Mercier, H., & Freschi, L. 2008. Flora epifítica de florestas tropicais: uma análise fisiológica sobre possíveis impactos causados pelas mudanças climáticas. In M. S. Buckeridge (Ed.), *Biologica & mudanças climáticas no Brasil*: 93–100. São Carlos, Brasil: RiMa Editora.
- Neuner, G., & Pramsöhler, M. 2006. Freezing and high temperature thresholds of photosystem 2 compared to ice nucleation, frost and heat damage in evergreen subalpine plants. *Physiologia Plantarum*, 126: 196–204.
- Nobel, P. S. 1981. Influences of photosynthetically active radiation on cladode orientation, stem tilting, and height of cacti. *Ecology*, 62(4): 982–990.
- Ogburn, R. M., & Edwards, E. J. 2010. The Ecological Water-Use Strategies of Succulent Plants. *Advances in Botanical Research*, 55: 179–225.
- Ogburn, R. M., & Edwards, E. J. 2012. Quantifying succulence: a rapid, physiologically meaningful metric of plant water storage. *Plant, cell & environment*, 35(9): 1533–1542.
- Osmond, B., Neales, T., & Stange, G. 2008. Curiosity and context revisited: crassulacean acid metabolism in the Anthropocene. *Journal of experimental botany*, 59(7): 1489–502.
- Popp, M., Janett, H.-P., Lüttge, U., & Medina, Ernesto. 2003. Metabolite gradients and carbohydrate translocation in rosette leaves of CAM and C3 bromeliads. *New Phytologist*, 157(3): 649–656.
- Simões-Araújo, J. L., Rumjanek, N. G., & Margis-Pinheiro, M. 2003. Small heat shock proteins genes are differentially expressed in distinct varieties of common bean. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 15(1): 33–41.
- Smith, L. B., & Downs, R. J. 1979. Bromelioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica*: 14(3):1493–2142.

- Takahashi, C. A. 2008. *Assimilação do nitrogênio em diferentes regiões foliares de uma bromélia epifítica com tanque.*
- Takahashi, C. A., Ceccantini, G. C. T., & Mercier, H. 2007. Differential capacity of nitrogen assimilation between apical and basal leaf positions of tank epiphytic bromeliad. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19(2): 119–126.
- Takahashi, C. A., & Mercier, H. 2011. Nitrogen metabolism in leaves of a tank epiphytic bromeliad: Characterization of a spatial and functional division. *Journal of Plant Physiology*, 168(11): 1208–1216.
- Team, R. C. 2012. R: A language and environment for statistical computing. <http://www.r-project.org>, Vienna, Austria.: R Foundation for Statistical Computing.
- Tsukaguchi, T., Kawamitsu, Y., Takeda, H., Suzuki, K., & Egawa, Y. 2003. Water status of flower buds and leaves as affected by high temperature in heat-tolerance and heat-sensitive cultivars of snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Production Science*, 6(1): 24–27.
- Valladares, F., & Pearcy, R. W. 1997. Interactions between water stress, sun-shade acclimation, heat tolerance and photoinhibition in the sclerophyll *Heteromeles arbutifolia*. *Plant, Cell and Environment*, 20: 25–36.
- Weng, J., & Lai, M. 2005. Estimating heat tolerance among plant species by two chlorophyll fluorescence parameters. *Photosynthetica*, 43(3): 439–444.
- Went, F. W. 1953. The Effect of Temperature on Plant Growth. *Annual Review of Plant Physiology*, 4: 347–362.
- Wolpert, A. 1962. Heat transfer analysis of factors affecting plant leaf temperature. *Plant Physiology*, 37(2): 113–120.
- Yamada, M., Hidaka, T., & Fukamachi, H. 1996. Heat tolerance in leaves of tropical fruit crops as measured by chlorophyll fluorescence. *Scientia Horticulturae*, 67: 39–48.
- Zotz, G., & Hietz, P. 2001. The physiological ecology of vascular epiphytes: current knowledge, open questions. *Journal of experimental botany*, 52(364): 2067–78.

CAPÍTULO III

RELAÇÕES ENTRE ACIDEZ TITULÁVEL E A TOLERÂNCIA DO FOTOSSISTEMA II A TEMPERATURAS EXTREMAS EM UMA BROMÉLIA CAM

RESUMO

Folhas maduras são capazes de modificar seu aparato fotossintético em resposta a variações de temperatura. Entretanto, modificações que levam ao aumento da performance fotossintética a altas temperaturas desempenham o papel inverso a baixas temperaturas. O objetivo do presente trabalho foi testar se frações das mesmas folhas de uma bromélia CAM, *Aechmea blanchetiana*, mantidas em temperaturas constantes de 10°C e 35°C, ou sob variações diárias naturais, apresentam um acúmulo diferencial de ácidos orgânicos e diferentes termotolerâncias fotossintéticas a altas e baixas temperaturas. Foi testada, também, a influência da região foliar, apical ou basal, na variação dessas respostas. Durante o período de incubação foi observado que a base foliar das amostras mantidas em temperaturas constantes apresentou uma maior fotoinibição do que o ápice, que, provavelmente, é mais resistente a temperaturas não letais (10-35°C). No entanto, a região basal apresentou a maior termotolerância registrada a altas temperaturas, mostrando que essa região é mais resistente a temperaturas extremas. A termotolerância ao resfriamento apresentada pelas amostras mantidas a 10 e 35°C foram similares, sugerindo que plantas CAM crescendo no limite ótimo de temperatura apresentam maiores termotolerâncias a baixas temperaturas. Além disso, foram observadas maiores termotolerâncias a altas temperaturas, no período da tarde, somente nas amostras não incubadas, único tratamento em que não foram observadas variações diárias da termotolerância ao resfriamento. Foi proposto, portanto, que altas radiações, típicas do período vespertino, influenciam mais a termotolerância ao resfriamento do que ao aquecimento. Em relação ao acúmulo de ácidos orgânicos, ele foi significativamente maior nas amostras mantidas a 10°C e menor nas mantidas a 35°C. No entanto, devido à variação natural da temperatura ao longo do dia, a maior variação diária da acidez titulável foi observada nas amostras mantidas em temperatura ambiente. Foram encontradas relações negativas entre a acidez titulável e a termotolerância a altas e baixas temperaturas, à exceção das amostras mantidas a 35°C, onde essa relação, durante o resfriamento, foi positiva, sugerindo um efeito benéfico do ácido málico, quando em baixas concentrações, a variações de temperatura. Esse estudo demonstra a complexidade da termotolerância de bromélias CAM e gera novas perspectivas de estudos que esclareçam esse mecanismo.

Palavras-chave: Bromeliaceae, termotolerância fotossintética, acidez titulável, aclimação, temperaturas extremas.

INTRODUÇÃO

A exposição a condições desfavoráveis, particularmente fora da faixa de temperatura ótima, pode resultar em danos irreversíveis para as plantas (Berry & Björkman, 1980). A capacidade fotossintética, em especial, é perdida de acordo com a extensão do dano provocado por esse estresse (Bauer & Senser, 1979), que a altas temperaturas está relacionado com o aumento da energia cinética e do movimento de moléculas através das membranas, causando um afrouxamento das ligações químicas e tornando as bicamadas lipídicas mais fluidas (Savchenko *et al.*, 2002). O aumento da fluidez da membrana dos tilacóides causa a dissociação dos aceptores primários de elétrons (Bukhov *et al.*, 1990) e a separação do complexo de evolução do oxigênio, que resulta no aumento da fluorescência (F_0) do tecido fotossintético (Bukhov *et al.*, 1990; Schreiber & Armond, 1978; Yamane *et al.*, 2000). A exposição a altas temperaturas em plantas com metabolismo CAM (*Crassulacean Acid Metabolism*), além de favorecer a remoção do malato acumulado nos vacúolos, pode provocar, um aumento da fluidez do tonoplasto e, conseqüentemente, uma elevação de sua permeabilidade a esse ácido, que é descompartimentado (Friemert *et al.*, 1988; Kappen & Lösch, 1984; Nimmo *et al.*, 1995).

Em condições de baixas temperaturas os lipídios das membranas sofrem alterações, passando da fase fluida para gel ou sólida (Lyons, 1973). A perda gradual da mobilidade dos lipídios, gerada por essa mudança de fase, além de causar alterações na difusão de substâncias (Wolfe, 1978), reduz a atividade de várias enzimas ligadas às membranas (Kasamo *et al.*, 1992, 2000). De forma similar ao que é observado a altas temperaturas, foi descrito por vários autores que baixas temperaturas também estimulam o aumento da fluorescência (F_0) da clorofila, devido à redução do transporte de elétrons entre os fotossistemas (Briantais *et al.*, 1993; Neuner & Pramsöhler, 2006). Temperaturas mais amenas em plantas CAM, além de estimularem a síntese de ácido málico, também provocam a redução da fluidez do tonoplasto e, conseqüentemente, estimulam o estoque desse ácido nos vacúolos (Kliemchen *et al.*, 1993; Lüttge, 2004; Medina & Osmond, 1981).

Folhas maduras são capazes de reverter completamente sua resposta fotossintética em função de variações da temperatura (Björkman & Badger, 1979). A aclimação de membranas celulares a temperaturas estressantes se reflete na alteração

dos padrões de sua fluidez, que auxilia a reduzir os danos, principalmente, ao aparato fotossintético (Berry & Björkman, 1980). Porém, modificações que levam a um aumento da performance fotossintética a altas temperaturas desempenham o papel inverso em baixas temperaturas (Berry & Björkman, 1980). Enquanto a aclimação a altas temperaturas reduz a fluidez das membranas celulares, a aclimação a baixas temperaturas aumenta essa fluidez (Behzadipour *et al.*, 1998; Kliemchen *et al.*, 1993). Além disso, alterações celulares que incrementam o acúmulo de ácidos orgânicos, em plantas CAM em altas temperaturas, podem reduzir o desempenho desse tipo de metabolismo em baixas temperaturas (Behzadipour *et al.*, 1998). Foi descrito por alguns autores que a menor tolerância a altas temperaturas, medida pelo grau de injúria visual, coincidiu com o máximo de acúmulo de malato em plantas CAM (Kappen & Lösch, 1984; Lösch & Kappen, 1983). Da mesma forma, foi observado no capítulo II, da presente dissertação, que amostras foliares de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Sm. com maior acúmulo de ácidos orgânicos apresentaram os menores valores de termotolerância fotossintética. Isso pode ter relação com o possível efluxo do ácido málico acumulado nos vacúolos e os consequentes danos celulares gerados pelo aumento de sua concentração fora dessas organelas (Kappen & Lösch, 1984). No capítulo II, foram observadas, ainda, diferenças significativas da termotolerância em regiões foliares distintas de *A. blanchetiana*, o que também pode estar relacionado ao acúmulo diferencial de ácidos orgânicos em cada região das folhas e à possível maior capacidade fotossintética do ápice, em relação à base foliar (Freschi *et al.*, 2010).

Tendo em vista a relação entre a acidez titulável e a termotolerância fotossintética a altas temperaturas, observada no capítulo II, o objetivo do presente trabalho foi responder as seguintes questões: (1) a acidez titulável também tem relação com a termotolerância fotossintética de *A. blanchetiana* a baixas temperaturas? (2) Folhas, dessa espécie, mantidas experimentalmente em altas e baixas temperaturas exibem essas relações de formas distintas entre si e em relação ao observado à temperatura ambiente? (3) Folhas mantidas em alta ou baixa temperatura, por cerca de 24 horas, apresentam um decaimento do rendimento quântico fotossintético durante esse período? (4) Regiões foliares distintas mantidas nas mesmas condições luminosas e hídricas e em temperaturas estressantes apresentam diferentes limites de termotolerância fotossintética?

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho experimental

O estudo foi realizado em indivíduos cultivados de *Aechmea blanchetiana* do campus Pampulha da Universidade Federal de Minas Gerais. Essa bromélia possui metabolismo CAM (Medina *et al.*, 1977) e suas folhas, com cerca de 10 cm de largura e 90 cm de altura são dispostas em uma roseta em forma de funil (Smith & Downs, 1979). Para descartar diferenças intrínsecas de cada indivíduo na resposta a temperaturas potencialmente estressantes, foram selecionadas, aleatoriamente, no período da manhã (8h), uma folha com orientação sul-norte (ápice apontando em direção ao norte geográfico) de cinco indivíduos de *A. blanchetiana*. Essas folhas foram divididas em três partes, no sentido da largura, cada uma com cerca de três centímetros de largura. Cada parte compôs um grupo experimental: uma permaneceu na planta e as outras duas foram destacadas e subdivididas em porção apical (terço superior) e porção basal (terço inferior). Os segmentos de folhas, ápices e bases, foram colocados em frascos com 150 ml de água e mantidos durante 31 horas, em câmaras de germinação (BODs) à temperatura constante, um a 10°C e o outro a 35°C. Essas temperaturas foram escolhidas por se tratarem dos limites, inferior e superior, da faixa de temperatura considerada ótima para a maioria das plantas (Berry & Björkman, 1980). A PPF (Photosynthetic Photon Flux Density) medida nas câmaras de germinação foi de cerca de 85 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e o fotoperíodo foi de 12h.

Após um período de 24 e 31 horas (respectivamente, 8 e 15 horas do dia seguinte) os segmentos de folhas foram utilizados para a determinação da acidez titulável e da tolerância fotossintética a altas ou baixas temperaturas.

Para observar o efeito da temperatura durante o período de tratamento em temperaturas controladas, comparativamente com as condições do ambiente natural, foi determinado os valores do rendimento quântico potencial do fotossistema II (Fv/Fm) através de um medidor de fluorescência modulada (MINI-PAM, Waz). As medidas foram realizadas 1, 4, 7, 10, 24 e 31 horas após o início dos tratamentos.

Tolerância do Fotossistema II a altas e baixas temperaturas e acidez titulável

Para a determinação da acidez titulável foi utilizado o procedimento descrito por Hartsock & Nobel (1976). A termotolerância do PSII foi determinada utilizando-se

medidas de fluorescência da clorofila com um medidor de fluorescência modulada (MINI-PAM, Walz). Amostras foliares de 1 cm² foram retiradas de cada região foliar e mantidas no escuro à temperatura ambiente (~25°C) por 15 minutos para a determinação dos valores iniciais de F_v/F_m . Posteriormente, as amostras foram colocadas entre duas placas metálicas forradas com papel filtro umedecido com água destilada, onde foi inserido um termopar, do tipo K, ligado a um termômetro digital, modelo TD-880 (Icel Manaus). Esse conjunto foi colocado em um saco de polietileno *zip-lock* fechado, que foi submerso em um banho-maria ultratermostático com circulador (modelo Quimis® 214D2), conforme procedimento adotado por Neuner & Pramsöhler (2006). No teste para a tolerância fotossintética a altas temperaturas as amostras foram submetidas a variações crescentes de temperatura de 38 a 60°C, com o incremento de 1°C a cada 3 minutos. Medidas de F_v/F_m foram novamente realizadas a cada 2°C de acréscimo na temperatura observada no termômetro digital. Foram calculadas as temperaturas de decaimento de 15% (T_{H15}) e 50% (T_{H50}) do F_v/F_m inicial, a partir do ajuste de equação sigmoideal, conforme metodologia empregada por Gimeno *et al.* (2009) e Godoy *et al.* (2011), utilizando o pacote estatístico R 2.15.2 (R Core Team, 2012).

Na determinação da tolerância fotossintética a baixas temperaturas o procedimento foi similar ao realizado para altas temperaturas, no entanto as amostras foram submetidas a variações decrescentes de temperaturas de 10 a -16°C com a redução média de 1°C a cada 3 minutos. As medidas de F_v/F_m ao longo do resfriamento foram feitas, em média, a cada 3°C de decréscimo da temperatura observada no termômetro digital. As temperaturas de decaimento de 15% (T_{C15}) e 50% (T_{C50}) do F_v/F_m inicial foram feitas da mesma forma que para T_{H15} e T_{H50} .

Dados meteorológicos

Foram coletados dados meteorológicos (temperatura ambiente e radiação solar), durante os dias de incubação e os dados obtidos nos horários das coletas foram relacionados aos valores de termotolerância e acidez titulável obtidos dos segmentos foliares das plantas crescendo no ambiente natural. Os dias de incubação ocorreram no mês de abril de 2012, para o teste da termotolerância a altas temperaturas, e agosto de 2012, para a termotolerância a baixas temperaturas. Os dados meteorológicos foram obtidos através de uma estação de superfície automática (Estação Pampulha – A521)

localizada próxima à área onde se encontram os indivíduos de *A. blanchetiana*. O acesso a esses dados foi realizado através do website do INMET (Instituto Nacional de Meteorologia): <http://www.inmet.gov.br>.

Análises Estatísticas

Para avaliar o efeito da hora da coleta (8h e 15h), da região foliar (ápice e base) e do tratamento (ambiente, 10°C e 35°C) na da acidez titulável e de todas as variáveis anteriormente citadas na termotolerância (T_{H15} , T_{H50} , T_{C15} e T_{C50}) de *A. blanchetiana* foram utilizados modelos lineares de efeito misto (MLE), ajustados para dados longitudinais (medidas repetidas) com efeito espacial aninhado à região foliar, utilizando o pacote estatístico R 2.15.2 (R Core Team, 2012). Efeitos mistos possibilitam modelar possíveis correlações existentes entre dados agrupados (Buckley *et al.*, 2003), como os encontrados no presente estudo (valores de amostras de regiões foliares distintas, na mesma folha, são correlacionados). Além disso, análises com medidas repetidas e estruturas de dados agrupados auxiliam a evitar a pseudoreplicação dos valores e elevam o poder estatístico da análise (Crawley, 2002). Dessa forma, a hora da coleta, a região foliar, o tratamento, a acidez titulável e as interações entre essas variáveis, foram utilizados como variáveis explicativas da termotolerância. Todos os MLEs foram sujeitos a análises de variância (ANOVA), e foram simplificados progressivamente com a retirada das variáveis preditoras com maior valor de significância ($p > 0,05$), como o procedimento adotado por Buckley *et al.* (2003).

Variáveis contínuas com relações significativas nos MLEs foram incluídas em modelos lineares simples (ML), para traçar as regressões e obter os valores os valores de significância (p) e ajuste (r^2). Relações entre variáveis com valores p significativos ($p < 0,05$) para os MLEs, mas não significativos para os ML não foram consideradas. Relações significativas nos MLEs com variáveis discretas com mais de dois tratamentos foram sujeitas ao teste de Tukey ($p < 0,05$). Da mesma forma, médias de tratamentos com diferenças significativas nos MLEs, mas não significativas no teste de Tukey também não foram consideradas.

RESULTADOS

As temperaturas ambientais registradas foram, de modo geral, maiores no mês de abril (máxima de 28,6°C e mínima de 17,4°C), quando foi realizado o teste de termotolerância a altas temperaturas, do que em agosto (máxima de 23,1°C e mínima de 12,4°C), quando foi realizado o teste de termotolerância a baixas temperaturas. A radiação solar do primeiro dia de incubação de abril foi a menor observada (máxima de 1118 KJ.m⁻²), mas no segundo dia desse período a radiação foi similar à observada no mês de agosto (máximas de 3152 e 3004 KJ.m⁻², respectivamente) (figura 1). Durante as 8 e 15 horas dos dias das coletas das amostras para os testes de termotolerância, as temperaturas registradas em abril foram, respectivamente, 20,8 e 27,9°C, e em agosto foram 16,3 e 21,6°C. A radiação solar, por sua vez, foi de 890,7 e 2116 KJ.m⁻², no mês de abril, e 814,9 e 1240,5 KJ.m⁻², no mês de agosto, as 8 e 15 horas, respectivamente.

Durante o período de incubação os valores de F_v/F_m decaíram de modo significativo nas bases foliares mantidas nas BODs de 10 e 35°C apenas a partir das medidas realizadas 24 horas após o início da incubação, uma hora após o início do fotoperíodo das BODs (figura 2). Nos ápices foliares desses mesmos tratamentos, só foi registrado um decaimento de F_v/F_m após as 31 horas de incubação, nove horas após o início do fotoperíodo (figura 2).

Os valores de T_{H15} e T_{H50} foram maiores às 15 horas do que às 8 horas, nas amostras mantidas à temperatura ambiente (tabelas 1 e 2). Nos outros tratamentos, porém, essa diferença não foi observada (tabela 2). As amostras coletadas às 15 horas, dos tratamentos a 10 e 35°C, apresentaram maiores T_{C15} e T_{C50} do que as coletadas às 8 horas (tabelas 1 e 2). Nas amostras mantidas a temperatura ambiente, essa diferença só foi observado para T_{C15} (tabelas 1 e 2). Entre as regiões foliares, os valores de T_{H15} foram diferentes apenas nas amostras incubadas a 10°C (tabela 3), já para os valores de T_{H50} , isso também foi observado nas amostras mantidas à temperatura ambiente (tabela 3). Diferenças significativas dos valores de T_{C15} e T_{C50} entre as regiões foliares e os tratamentos não foram detectadas pelo teste de Tukey (tabela 3), ainda que no MLE a interação tenha sido significativa para T_{C50} . De modo geral, as amostras foliares mantidas a 10°C apresentaram menores valores de T_{H50} , do que as incubadas a 35°C e à temperatura ambiente (tabela 1). Já as amostras mantidas a 35°C apresentaram, em média, maiores valores de T_{C15} do que as incubadas a 10°C e à temperatura ambiente

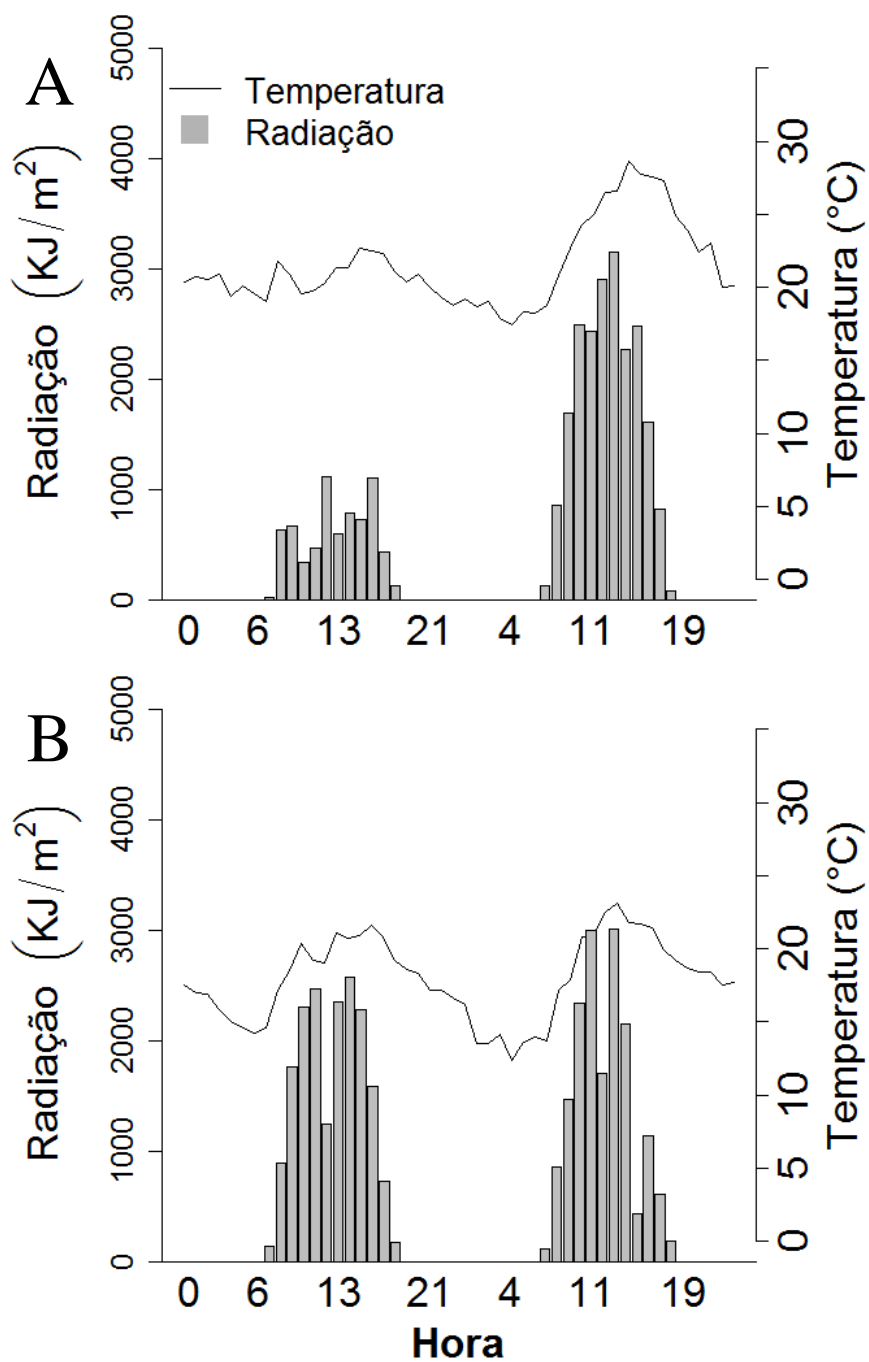


Figura 1: Radiação solar e temperatura do ar registrados, pelo INMET, durante os períodos de incubação em abril de 2012 (A), quando foi feito o teste de termotolerância a altas temperaturas, e em agosto de 2012 (B), quando foi feito o teste de termotolerância a baixas temperaturas.

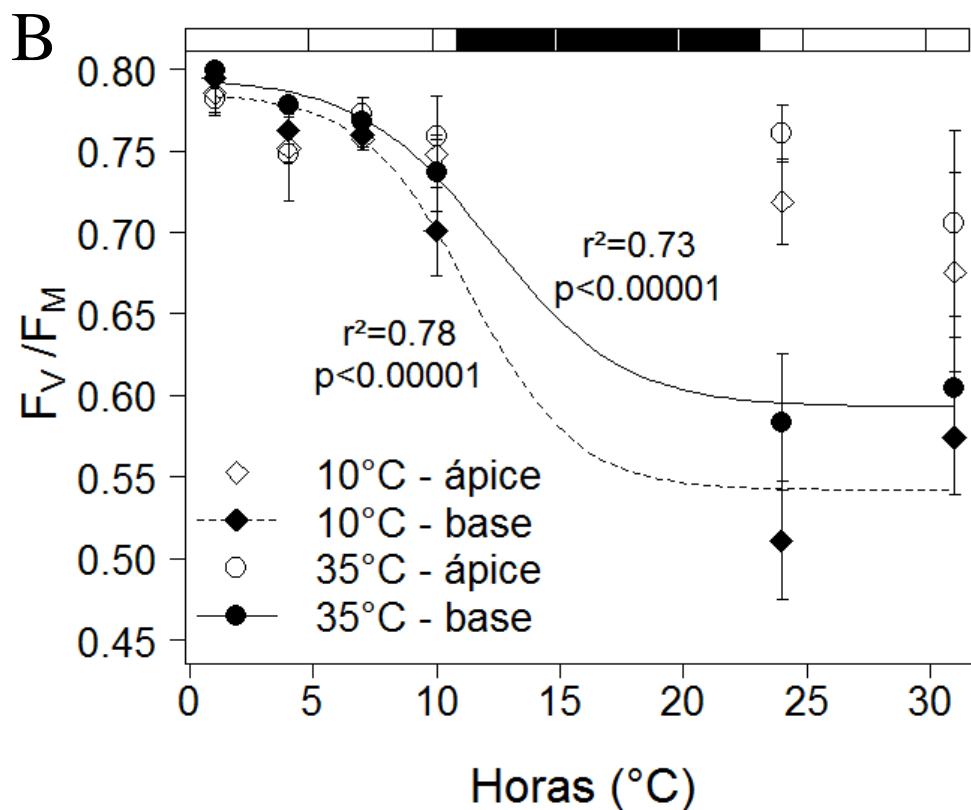
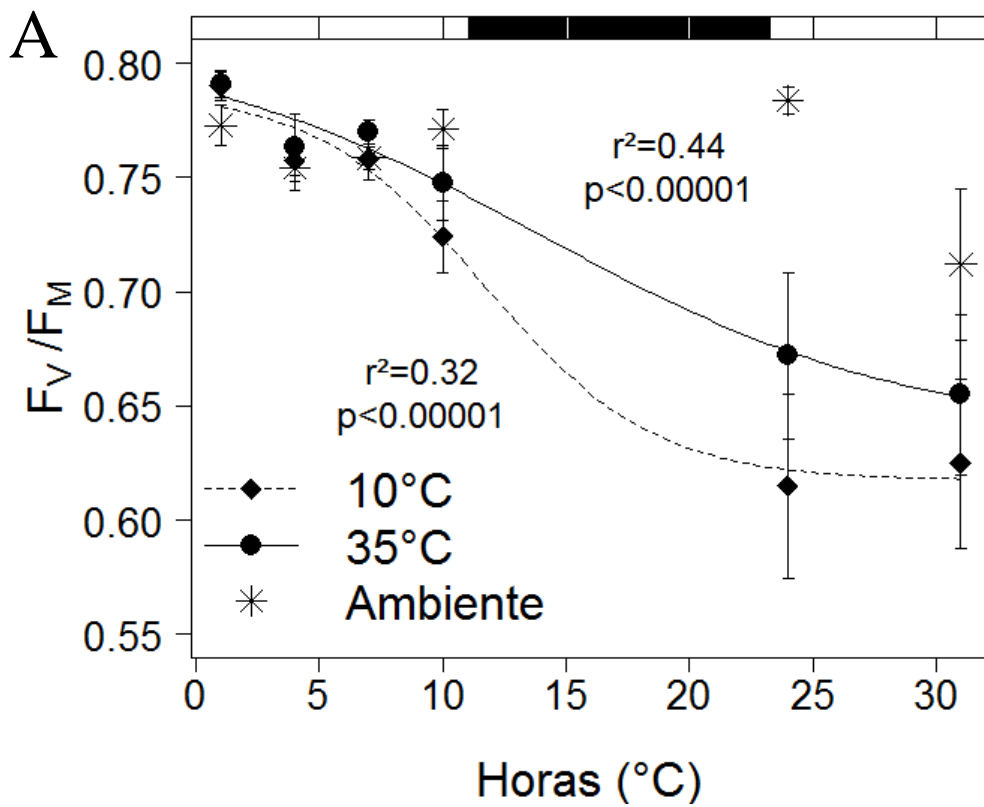


Figura 2: A: Média \pm erro padrão do rendimento quântico potencial (F_v/F_m) das amostras mantidas à temperatura ambiente e a 10 e 35 $^{\circ}C$ durante o período de incubação. B: Média \pm erro padrão do F_v/F_m das amostras da bases e do ápices foliares mantidos a 10 e 35 $^{\circ}C$ durante o período de incubação. As barras acima dos gráficos representam o fotoperíodo das BODs, onde a porção preenchida representa o período escuro e porção aberta representa o período claro.

(tabela 1). As amostras mantidas à temperatura ambiente apresentaram os maiores valores de T_{C50} (tabela 1).

Em relação à acidez titulável, apenas as amostras mantidas a temperatura ambiente apresentaram diferenças significativas entre os horários de coleta, que foram maiores pela manhã (tabela 4). Além disso esse tratamento foi o que apresentou os maiores valores de ΔH^+ (tabela 3 e 4). A acidez titulável registradas pela manhã nas amostras mantidas à temperatura ambiente foi similar a acidez registrada nas amostras incubadas a 10°C, nos dois horários (tabela 2). De forma semelhante, a acidez acumulada pelas amostras mantidas à temperatura ambiente, à tarde, foi semelhante à acidez acumulada pelas amostras incubadas a 35°C, nos dois horários (tabela 2). Entre as regiões foliares a acidez titulável registrada nos ápices foliares mantidos à temperatura ambiente e a 10°C, foi maior do que a registrada nas bases desses mesmos tratamentos (tabela 3).

Tabela 1: Resultado dos MLEs para os valores de termotolerância (T_{H15} , T_{H50} , T_{C15} e T_{C50}). Cada coluna, a partir da terceira representa os resultados de um MLE no qual a variável resposta está representada no cabeçalho. No cabeçalho das linhas estão representadas as variáveis utilizadas como preditoras dos MLEs e as suas interações que foram significativas para ao menos um dos MLEs apresentados. Os valores nas células representam a média \pm erro padrão de cada um dos tratamentos. P: valor de significância (p) encontrado para cada variável preditora utilizada. Letras diferentes representam médias estatisticamente diferentes. NS: variável preditora não utilizada no modelo final ($p > 0,05$).

		T_{H15}	T_{H50}	T_{C15}	T_{C50}		
Hora	8h	42.072 \pm 0.62	44.406 \pm 0.74	-2.016 \pm 1.0	-9.56 \pm 0.6		
	15h	44.142 \pm 0.55	47.315 \pm 0.69	-9.113 \pm 0.44	-13.703 \pm 0.8		
	P	0.0009	<0.0001	<0.0001	<0.0001		
Região	Ápice	42.019 \pm 0.6	44.118 \pm 0.78	-4.643 \pm 1.20	-10.314 \pm 0.85		
	Base	44.195 \pm 0.58	47.603 \pm 0.59	-6.485 \pm 0.75	-12.949 \pm 0.67		
	P	0.0005	<0.0001	0.0413	0.0007		
Tratamento	Ambiente	42.677 \pm 0.82	46.411 \pm 0.94 ^A	-5.263 \pm 0.86 ^A	-8.959 \pm 0.65 ^B		
	10°C	42.537 \pm 0.89	43.966 \pm 1.11 ^B	-7.707 \pm 0.81 ^A	-12.743 \pm 0.87 ^A		
	35°C	44.107 \pm 0.46	47.204 \pm 0.51 ^A	-3.724 \pm 1.71 ^B	-13.194 \pm 1.1 ^A		
	P	0.0622	0.0002	0.0022	<0.0001		
Acidez	P	<0.0001	<0.0001	NS	0.5192		
Hora	X	0.0122	NS	0.0003	0.0175		
Tratamento	Região	X	P	0.0237	NS	NS	0.0462
Tratamento	Acidez	X	P	NS	NS	NS	0.0326
Hora							

Tabela 2: Média \pm erro padrão, entre os horários de coleta, dos valores de termotolerância (T_{H15} , T_{H50} , T_{C15} e T_{C50}) e da acidez titulável das amostras foliares de *A. blanchetiana* incubadas à temperatura ambiente, a 10 e a 35°C. Letras iguais representam médias estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

Tratamento	Hora	T_{H15} (°C)	T_{H50} (°C)	T_{C15} (°C)	T_{C50} (°C)	Acidez ($\mu\text{eq H}^+\text{g}^{-1}$ MF)
Ambiente	8h	39.99 ± 0.6^B	43.71 ± 1.3^{BC}	-3.02 ± 1.3^B	-8.40 ± 1.0^B	134.81 ± 27.3^A
	15h	45.36 ± 1.0^A	49.11 ± 0.7^A	-7.50 ± 0.5^A	-9.52 ± 0.9^B	52.47 ± 8.6^B
10°C	8h	42.13 ± 1.4^{AB}	43.19 ± 1.7^C	-5.58 ± 1.0^{AB}	-10.60 ± 0.5^B	182.75 ± 31.4^A
	15h	42.95 ± 1.1^{AB}	44.74 ± 1.4^{ABC}	-9.83 ± 0.8^A	-14.89 ± 1.4^A	174.64 ± 30.8^A
35°C	8h	44.10 ± 0.7^A	46.32 ± 0.3^{ABC}	2.56 ± 1.8^C	-9.68 ± 1.4^B	52.98 ± 9.6^B
	15h	44.12 ± 0.7^A	48.09 ± 0.9^{AB}	-10.01 ± 0.7^A	-16.71 ± 0.7^A	41.89 ± 4.9^B

Tabela 3: Média \pm erro padrão dos valores de termotolerância (T_{H15} , T_{H50} , T_{C15} e T_{C50}), da acidez titulável e da variação diária da acidez titulável (ΔH^+) das regiões foliares amostradas de *A. blanchetiana* incubadas à temperatura ambiente, a 10 e a 35°C. Letras iguais representam médias estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

Tratamento	Região foliar	T_{H15} (°C)	T_{H50} (°C)	T_{C15} (°C)	T_{C50} (°C)	Acidez ($\mu\text{eq H}^+\text{g}^{-1}$ MF)	ΔH^+ ($\mu\text{eq H}^+\text{g}^{-1}$ MF)
Ambiente	Ápice	42.49 ± 1.3^{AB}	44.16 ± 1.4^{BC}	-3.82 ± 1.4^A	-7.41 ± 0.6^B	168.62 ± 20.0^B	162.19 ± 15.7^A
	Base	42.86 ± 1.1^{AB}	48.66 ± 0.8^A	-6.71 ± 0.8^A	-10.51 ± 0.9^{AB}	18.66 ± 2.4^D	2.47 ± 3.7^B
10°C	Ápice	39.84 ± 0.7^B	40.84 ± 0.9^C	-7.51 ± 0.8^A	-10.60 ± 0.6^{AB}	281.45 ± 21.2^A	40.69 ± 43.1^B
	Base	45.23 ± 1.1^A	47.09 ± 1.5^{AB}	-7.91 ± 1.5^A	-14.89 ± 1.3^A	75.94 ± 19.4^C	-24.48 ± 24.1^B
35°C	Ápice	43.72 ± 0.7^A	47.35 ± 0.8^{AB}	-2.61 ± 3.2^A	-12.93 ± 2.1^A	68.57 ± 7.7^{CD}	21.29 ± 10.61^B
	Base	44.49 ± 0.7^A	47.06 ± 0.6^{AB}	-4.84 ± 1.5^A	-13.46 ± 0.8^A	26.30 ± 3.4^D	0.89 ± 4.9^B

Tabela 4: Resultado dos MLEs para a acidez titulável e a variação diária da acidez titulável (ΔH^+). A terceira e quarta colunas representam, cada uma, os resultados do MLE no qual a variável resposta está representada no cabeçalho. No cabeçalho das linhas estão representadas as variáveis utilizadas como preditoras e as suas interações que foram significativas para ao menos um dos MLEs apresentados. Os valores nas células representam a média \pm erro padrão de cada um dos tratamentos. P: valor de significância (p) encontrado para cada variável preditora utilizada. Letras diferentes representam médias estatisticamente diferentes. NS: variável preditora não utilizada no modelo final ($p > 0,05$). NA: não se aplica.

		Acidez	ΔH^+
Hora	8h	123.511 \pm 15.6	
	15h	89.669 \pm 13.2	NA
	P	0.0014	
Região	Ápice	172.88 \pm 15.0	109.276 \pm 30.64
	Base	40.299 \pm 7.3	-14.607 \pm 15.96
	P	<0.0001	<0.0001
Tratamento	Ambiente	93.641 \pm 15.6 ^B	101.16 \pm 31.78 ^A
	10°C	178.695 \pm 21.7 ^A	15.303 \pm 49.64 ^B
	35°C	47.4348 \pm 5.4 ^B	25.541 \pm 9.99 ^B
	P	<0.0001	0.0011
Hora X Região	P	0.0001	NS
Hora X Tratamento	P	0.0052	NS
Região X Tratamento	P	<0.0001	0.0062

O ΔH^+ das amostras das bases foliares mantidas à temperatura ambiente foi semelhante ao registrado nos ápices e bases foliares incubados a 10 e 35°C (tabela 3). Apenas os valores de T_{H15} das amostras incubadas a 10°C apresentaram relação negativa significativa com a acidez titulável ($p < 0,00001$ e $r^2 = 0,67$). Já para T_{H50} essa relação também foi observada nas amostras mantidas à temperatura ambiente (figura 3). Não foram observadas interações com o horário da coleta das amostras. A acidez titulável não teve relação significativa com T_{C15} , mas sim com T_{C50} , às 15 horas, sendo que as amostras mantidas à temperatura ambiente e a 10°C apresentaram uma relação positiva (figuras 4.A-B) e as amostras incubadas a 35°C a apresentaram de forma negativa (figuras 4.C).

As temperaturas das câmaras e a registrada no momento da coleta das amostras das plantas mantidas no ambiente foram relacionadas de forma significativa com a acidez titulável e os valores de T_{H50} dos ápices foliares, onde foram ajustadas funções sigmoidais (figuras 5.A-B). Relações significativas também foram observadas entre as temperaturas e os valores de T_{C50} tanto do ápice quanto da base foliar, onde foram ajustadas funções quadráticas (figura 5.C).

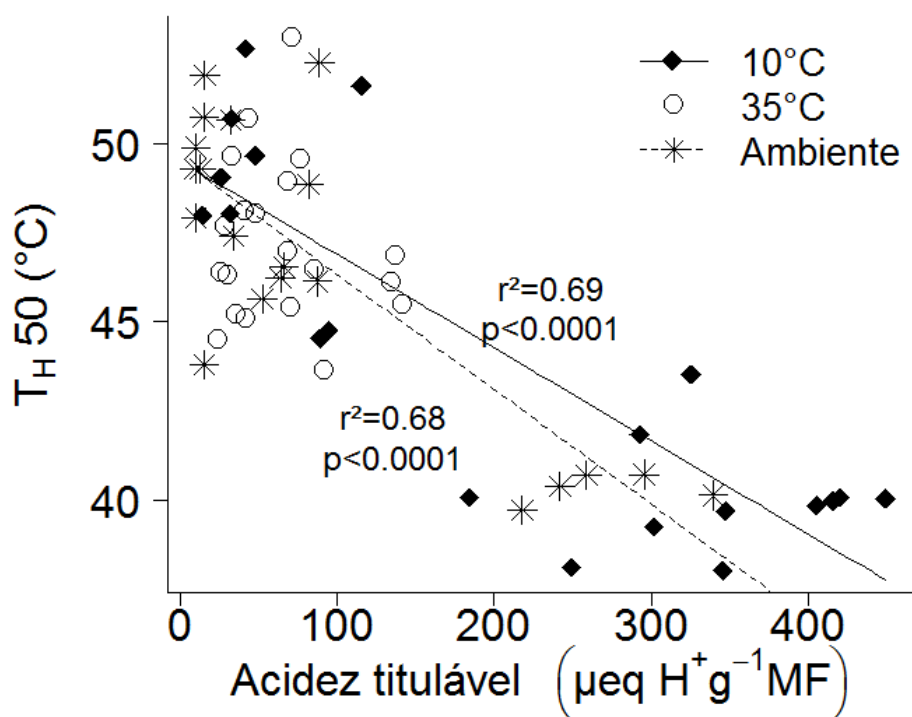


Figura 3: Relação entre a termotolerância (T_{H50}) e a acidez titulável das amostras mantidas à temperatura ambiente e a 10 e 35°C.

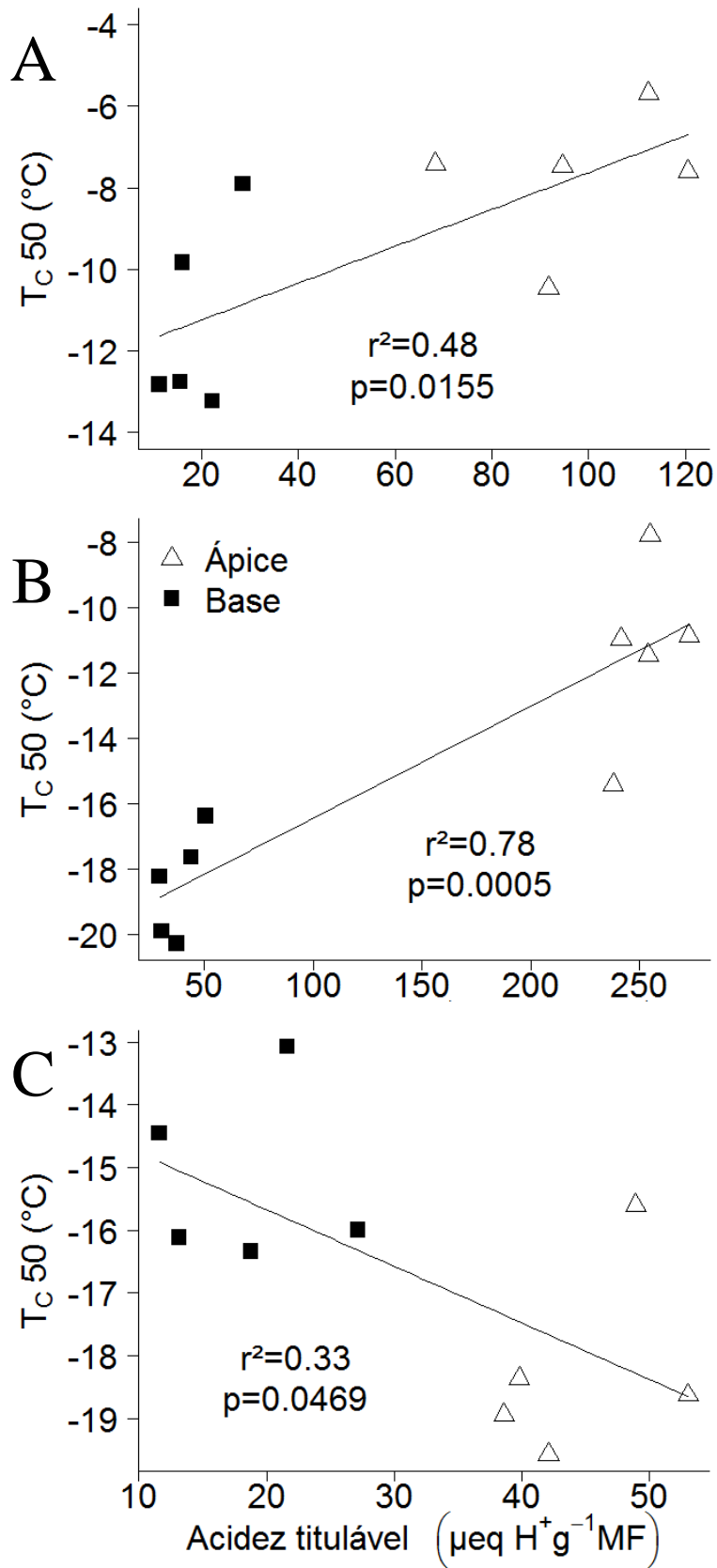


Figura 4: Relação entre a termotolerância (T_{C50}) e a acidez titulável das amostras mantidas à temperatura ambiente (A) e a 10 (B) e 35°C (C), às 15 horas, registradas nas duas regiões foliares amostradas.

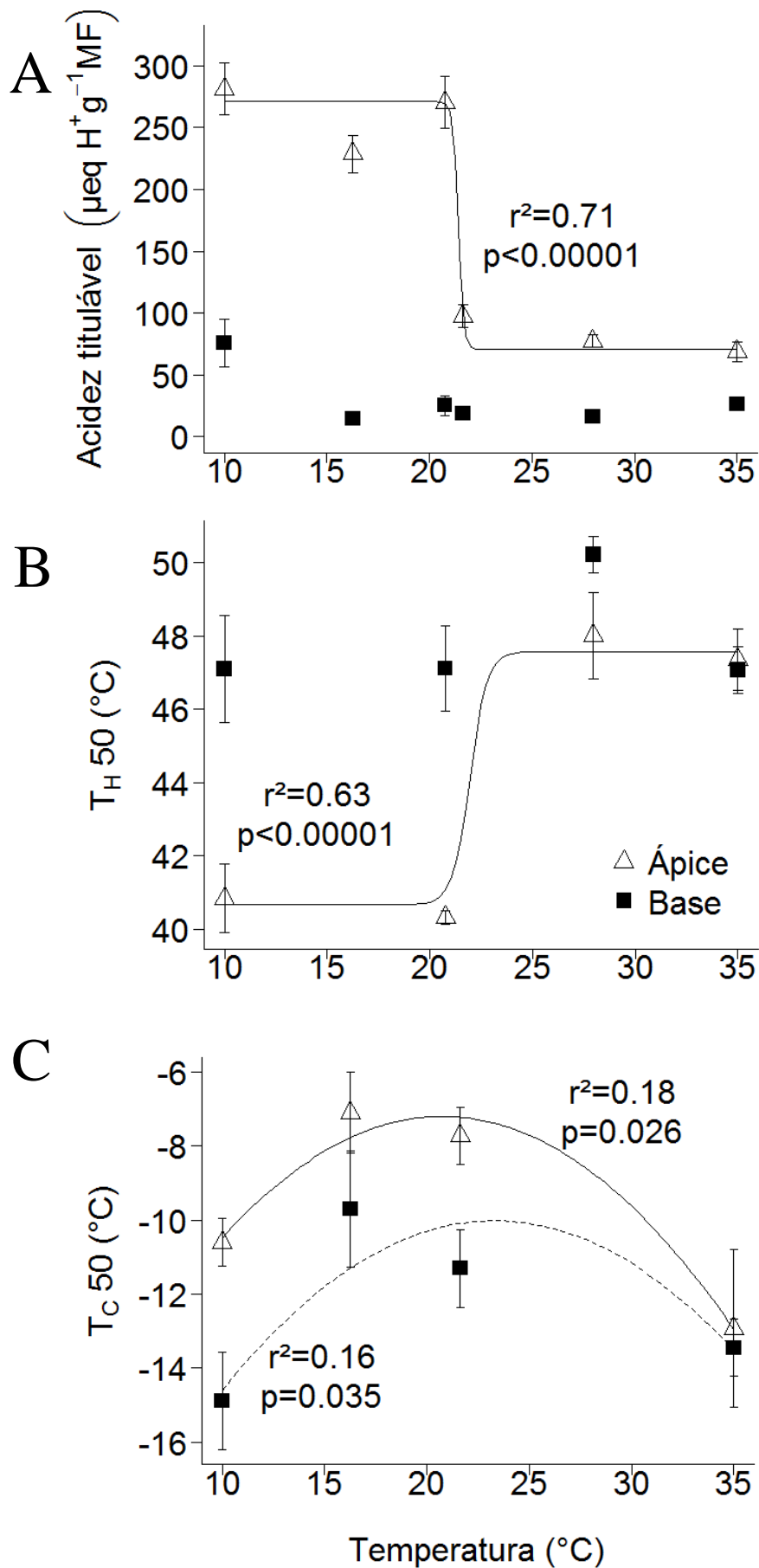


Figura 5: Relação entre a temperatura (registrada nas BODs e no ambiente) e a acidez titulável (A) e a termotolerância ($T_H 50$ e $T_C 50$) a altas (B) e baixas temperaturas (C), registradas nas duas regiões foliares amostradas. As curvas representam as funções que foram ajustadas para os dados: sigmoidais (A e B) e quadrática (C).

DISCUSSÃO

A aclimação do aparato fotossintético e do metabolismo CAM pode ocorrer de minutos a horas em temperaturas moderadamente altas (Behzadipour *et al.*, 1998; Havaux, 1993). Os resultados do presente estudo demonstraram que os segmentos de folhas de *A. blanchetiana* exibiram, em um curto espaço de tempo, uma aclimação da termotolerância do fotossistema II (PSII) e do metabolismo CAM às elevações e reduções da temperatura ambiente. Foi observado no capítulo II que tanto a tolerância a altas temperaturas quanto o acúmulo de ácidos também estão relacionados a variações climáticas do dia anterior. Em conjunto, esses resultados sugerem, como observado em outros trabalhos (ver Berry & Björkman, 1980), que o metabolismo CAM e a termotolerância são afetados por fatores climáticos recentes e históricos e que a aclimação a variações ambientais, dentro de uma faixa ótima, pode ocorrer rapidamente em bromélias CAM.

A elevação da temperatura acentua a fluidez do tonoplasto, que fica mais permeável ao ácido málico acumulado no vacúolo, que é, então, extravasado para o citosol (Friemert *et al.*, 1988). Com a redução da temperatura, por outro lado, os lipídios do tonoplasto podem se solidificar, causando a contração dessa membrana e criando fissuras que aumentam a sua permeabilidade (Lyons, 1973), favorecendo a descompartimentação dos ácidos acumulados no vacúolo. Em estudos utilizando sinais de injúrias visuais pelo calor em tecidos de plantas CAM foi observado, como no presente trabalho, que a termotolerância a altas temperaturas está negativamente relacionada com o acúmulo de ácidos orgânicos (Kappen & Lösch, 1984; Lösch & Kappen, 1983). Dessa forma, o aumento ou redução da temperatura foliar, além de sua faixa ótima, pode ser mais prejudicial a tecidos com grandes concentrações de ácidos orgânicos do que a tecidos com menores concentrações que, conseqüentemente, apresentam uma maior termotolerância.

Efeitos benéficos do ácido málico, em baixas concentrações, por outro lado, já foram relatados por alguns autores tanto em baixas quanto em altas temperaturas (Petinov & Molotkovsky, 1957; Santarius, 1971). Em baixas temperaturas o malato pode proteger os tilacóides contra o frio, por interagir com sais que inibem as membranas fotossintetizantes a baixas temperaturas (Santarius, 1971). Sob altas temperaturas, por sua vez, o malato pode interagir com a amônia, altamente citotóxica,

que é produzida pela degradação de proteínas, comum nesse tipo de estresse (Petinov & Molotkovsky, 1957). Sendo assim, baixas concentrações de ácido málico nas folhas de *A. blanchetiana* poderiam aumentar a tolerância fotossintética dessa espécie a altas e baixas temperaturas, mas concentrações desse ácido acima de um limite poderiam ser prejudiciais. Essa seria uma explicação para a relação negativa entre T_{C50} e a acidez foliar observada nas amostras mantidas a 35°C, e os menores T_{C50} e maiores T_{H50} , observados nesse mesmo tratamento, onde menores quantidades de ácidos orgânicos foram acumulados. Da mesma forma, os maiores valores de T_{H15} e T_{H50} das bases foliares, em relação aos ápices, também podem ser um reflexo do acúmulo diferencial de ácidos orgânicos existente entre essas regiões foliares.

Diferentes regiões das folhas de uma bromélia tanque, como a *A. blanchetiana*, podem possuir distintos papéis funcionais no metabolismo regular da planta e em resposta a estresses ambientais (Freschi *et al.*, 2010). Diferenças na espessura do hidrênquima (Freschi *et al.*, 2010), na densidade de tricomas e de estômatos e no acúmulo de ácidos orgânicos entre o ápice e a base das folhas (ver capítulo II, Freschi *et al.*, 2010; Popp *et al.*, 2003) são exemplos disso e podem estar relacionados, inclusive, a uma maior capacidade absorptiva da região basal (Takahashi & Mercier, 2011) e fotossintética da porção apical da folha (Freschi *et al.*, 2010). Da mesma forma, os menores efeitos da exposição tanto a 10 quanto a 35°C no rendimento quântico potencial (F_v/F_m) no ápice foliar indica uma maior tolerância do PSII dessa região à temperaturas moderadamente estressantes. Isso pode ter relação com a sua localização, acima do tanque, onde ocorrem maiores variações das condições ambientais (ver capítulo II). No entanto, ainda que o ápice foliar de *A. blanchetiana* tenha apresentado uma menor fotoinibição ao longo da incubação a temperaturas moderadamente estressantes, ela exibiu menor termotolerância do que a porção basal da folha. Dessa forma, o acúmulo diferencial de ácidos orgânicos entre as regiões foliares, além de estar relacionado a uma provável divisão funcional da folha, também pode ser um indício de uma estratégia desenvolvida por bromélias CAM para que a região basal foliar proteja a região apical, possivelmente mais fotossintetizante (Freschi *et al.*, 2010) e, portanto, com uma menor termotolerância.

Variações diárias da termotolerância já foram relatadas, inclusive em plantas CAM (capítulo II, Braun *et al.*, 2002; Kappen & Lösch, 1984; Larcher, 1980). Como

observado por Kappen & L6sch (1984) e Braun *et al.* (2002), a tolerância a altas temperaturas parece ser positivamente relacionada à variação diária da temperatura ambiente. A relação da tolerância fotossintética sob resfriamento com a temperatura ambiente, por sua vez, parece se desenvolver de forma que plantas de ambientes com temperaturas próximas ao limite, inferior e superior, de sua faixa de temperatura ótima são, possivelmente, mais tolerantes ao resfriamento do que as plantas submetidas a temperaturas dentro dessa faixa. Foi observado, além disso, que a tolerância fotossintética ao aquecimento apresenta maiores variações diárias ($\sim 6^{\circ}\text{C}$), em condições normais, do que a tolerância a baixas temperaturas ($\sim 4^{\circ}\text{C}$). As amostras foliares de *A. blanchetiana* mantidas tanto a 10 como a 35°C, em condições de PFD inferiores à natural, apresentaram variações diárias de T_{C50} de forma mais marcante do que as amostras mantidas à temperatura ambiente. Uma variação similar na tolerância ao aquecimento não foi observada, mas, os valores de T_{H15} e T_{H50} registrados nas amostras à temperatura ambiente, à tarde, quando a radiação solar era mais intensa, foram similares aos apresentados pelas amostras mantidas nas BODs, no mesmo horário. Dessa forma, a variação da radiação solar ao longo do dia parece exercer uma influência relativamente menor na tolerância fotossintética a altas temperaturas do que na tolerância a baixas temperaturas.

Condições ambientais, como as relacionadas à exposição a altas radiações solares, podem acentuar os danos por temperatura ao PSII (Valladares & Pearcy, 1997), mas fatores end6genos, como os ritmos circadianos, podem elevar a resist6ncia da planta a esse tipo de estresse (Rikin *et al.*, 1993). De modo geral, os ritmos circadianos regulam o desenvolvimento de fases de resist6ncia próximas ao meio do dia, para altas temperaturas (Rikin, 1992), e a partir do final do dia, para baixas temperaturas (McMillan & Rikin, 1990). Amostras foliares coletadas ao final do dia, portanto, apresentam uma maior tolerância a baixas temperaturas do que as coletadas no início dele, como foi observado nas amostras mantidas à temperatura constante, 10 ou 35°C, quando os efeitos de outras variáveis ambientais, como a alta exposição à radiação solar, não estiveram presentes. Entretanto, nas amostras coletadas diretamente das plantas, sujeitas à variação diária natural da temperatura e da radiação solar, não foi constatada maior tolerância a baixas temperaturas no período da tarde, possivelmente devido a um efeito prejudicial da alta radiação registrada nesse horário.

Outro mecanismo fisiológico que pode ser controlado por ritmos circadianos é o metabolismo CAM (Nimmo, 2000). Porém, o estoque de ácido málico nos vacúolos de plantas com esse metabolismo depende, fortemente, da fluidez do tonoplasto (Kluge *et al.*, 1991), que é influenciada por mudanças na temperatura foliar ao longo do dia (Behzadipour *et al.*, 1998). A síntese e o efetivo estoque de ácido málico nos vacúolos são, supostamente, facilitados por uma rigidez relativa do tonoplasto (Kliemchen *et al.*, 1993) que é proporcionada pela redução das temperaturas foliares, comuns no período noturno (Behzadipour *et al.*, 1998; Kliemchen *et al.*, 1993; Osmond, 1978). A elevação da temperatura ao longo do dia, por outro lado, influencia na descarboxilação do malato e no aumento relativo da fluidez do tonoplasto, que propicia a remobilização desse ácido (Friemert *et al.*, 1988). Dessa forma, as mudanças de temperaturas ao longo do dia, com menores temperaturas à noite e maiores durante o dia, favorecem o metabolismo CAM (Lüttge, 2004). No entanto, baixas variações de temperatura ao longo do dia, com temperaturas baixas durante o dia, ou altas durante a noite, podem prejudicar, tanto a remobilização, quanto o estoque do malato nos vacúolos, como foi observado por Haag-Kerwer *et al.* (1992) para *Clusia minor*, uma planta CAM-facultativa. A reduzida variação diária da acidez titulável observada nas amostras mantidas em temperatura constante de 10 e 35°C, no presente trabalho, seria, portanto, uma consequência da ausência de variações diárias da temperatura, onde baixas temperaturas, no período claro, prejudicaram a remobilização dos ácidos orgânicos e altas temperaturas, no período escuro, prejudicaram o seu estoque.

O presente estudo é o primeiro a mostrar a relação entre a acidez titulável e a termotolerância fotossintética, que ocorre de forma negativa, em uma planta CAM, exposta não apenas a altas como também a baixas temperaturas. Também foi constatada a influência de variáveis ambientais (radiação e temperatura ambiente) na variação diária da acidez titulável e na termotolerância fotossintética. Foi demonstrado que regiões foliares distintas de *A. blanchetiana* podem apresentar diferentes respostas a variações da temperatura e da radiação solar e que isso pode ser parte de uma estratégia contra danos aos seus meristemas. Uma das possíveis explicações para a relação negativa entre a termotolerância e a acidez titulável é o efeito da temperatura na fluidez do tonoplasto. Entretanto, são necessários estudos adicionais para a melhor elucidação dos vários aspectos da termotolerância de bromélias CAM, como a síntese de proteínas de choque térmico (HSPs), as variações da fluidez das membranas fotossintetizantes e vacuolares,

possivelmente por espectroscopia EPR (*Electron Paramagnetic Resonance*), e os vários aspectos das trocas gasosas dessas plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bauer, H., & Senser, M. 1979. Photosynthesis of ivy leaves (*Hedera helix* L.) after heat stress II. Activity of Ribulose Bisphosphate Carboxylase, Hill reaction, and chloroplast ultrastructure. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 91(4): 359–369.
- Behzadipour, M., Ratajczak, R., Faist, K., Pawlitschek, P., Trémolières, A., & Kluge, M. 1998. Phenotypic adaptation of tonoplast fluidity to growth temperature in the CAM plant *Kalanchoë daigremontiana* Ham. et Per. is accompanied by changes in the membrane phospholipid and protein composition. *Journal of Membrane Biology*, 166: 61–70.
- Berry, J. A., & Björkman, O. 1980. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 31: 491–543.
- Björkman, O., & Badger, M. 1979. Time course of thermal acclimation of the photosynthetic apparatus in *Nerium oleander*. *Carnegie Institution of Washington Year Book*, 78: 262–275.
- Braun, V., Buncher, O., & Neuner, G. 2002. Thermotolerance of photosystem 2 of three alpine species under field conditions. *Photosynthetica*, 40(4): 587–549.
- Briantais, J.-M., Ducret, J.-M., Hodges, M., & Krause, G. H. 1992. The effects of low temperature acclimation and photoinhibitory treatments on Photosystem 2 studied by thermoluminescence and fluorescence decay kinetics. *Photosynthesis Research*, 31: 1–10.
- Buckley, Y. M., Briese, D. T., & Rees, M. 2003. Demography and management of the invasive plant species *Hypericum perforatum*. I. Using multi-level mixed-effects models for characterizing growth, survival and fecundity in a long-term data set. *Journal of Applied Ecology*, 40: 481–493.
- Bukhov, N. G., Sabat, S. C., & Mohanty, P. 1990. Analysis of chlorophyll a fluorescence changes in weak light in heat treated *Amaranthus* chloroplasts. *Photosynthesis research*, 23: 81–87.
- Crawley, M. J. 2002. *Statistical Computing: An Introduction to Data Analysis using S-Plus*: 772. Wiley.
- Freschi, L., Takahashi, C. A., Cambui, C. A., Semprebom, T. R., Cruz, A. B., Mito, P. T., et al. 2010. Specific leaf areas of the tank bromeliad *Guzmania monostachia* perform distinct functions in response to water shortage. *Journal of Plant Physiology*, 167(7): 526–33.
- Friemert, V., Heininger, D., Kluge, M., & Ziegler, H. 1988. Temperature effects on malic-acids efflux from the vacuoles and on the carboxylation pathways in Crassulacean-acid-metabolism plants. *Planta*, 174(4): 453–461.

- Gimeno, T. E., Pías, B., Lemos-Filho, J. P. de, & Valladares, F. 2009. Plasticity and stress tolerance override local adaptation in the responses of Mediterranean holm oak seedlings to drought and cold. *Tree physiology*, 29(1): 87–98.
- Godoy, O., De Lemos-Filho, J. P., & Valladares, F. 2011. Invasive species can handle higher leaf temperature under water stress than mediterranean natives. *Environmental and Experimental Botany*, 71(2): 207–214.
- Haag-Kerwer, A., Franco, A. C., & Lüttge, U. 1992. The effect of temperature and light on gas exchange and acid accumulation in the C3-CAM plant *Clusia minor* L. *Journal of Experimental Botany*, 43(3): 345–352.
- Hartsock, T. L., & Nobel, P. S. 1976. Watering converts a CAM plant to daytime CO₂ uptake. *Nature*, 262: 574–576.
- Havaux, M. 1993. Rapid photosynthetic adaptation to heat stress triggered in potato leaves by moderately elevated temperatures. *Plant, Cell and Environment*, 46: 461–467.
- Huner, N. P. A., Öquist, G., Hurry, V. M., Krol, M., Falk, S., & Griffith, M. 1993. Photosynthesis, photoinhibition and low temperature acclimation in cold tolerant plants. *Photosynthesis Research*, 37: 19–39.
- Kappen, L., & Lösch, R. 1984. Diurnal patterns of heat tolerance in relation to CAM. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 114(1): 87–96.
- Kasamo, K., Kagita, F., Yamanishi, H., & Sakaki, T. 1992. Low temperature-induced changes in the thermotropic properties and fatty acid composition of the plasma membrane and tonoplast of cultured rice (*Oryza sativa* L.) cells. *Plant & Cell Physiology*, 33(5): 609–616.
- Kasamo, K., Yamaguchi, M., & Nakamura, Y. 2000. Mechanism of the chilling-induced decrease in proton pumping across the tonoplast of rice cells. *Plant & cell physiology*, 41(7): 840–849.
- Kliemchen, A., Schomburg, M., Galla, H. J., Lüttge, U., & Kluge, M. 1993. Phenotypic changes in the fluidity of the tonoplast membrane of crassulacean-acid-metabolism plants in response to temperature and salinity stress. *Planta*, 189(3): 403–409.
- Kluge, M., Kliemchen, A., & Galla, H. J. 1991. Temperature effects on crassulacean acid metabolism: EPR spectroscopic studies on the thermotropic phase behaviour of the tonoplast membranes of *Kalanchoë daigremontiana*. *Botanica acta*, 104(5): 355–360.
- Larcher, W. 1980. Klimastreß im Gebirge - Adaptationstraining und selektionsfilter für pflanzen. *Rheinisch-Westf. Akad. Wiss., Vorträge N 291*: 49–78.
- Lösch, R., & Kappen, L. 1983. Die temperaturresistenz makaronesischer Sempervivoidae. *Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie*, 10: 521–528.

- Lüttge, U. 2004. Ecophysiology of Crassulacean Acid Metabolism (CAM). *Annals of botany*, 93(6): 629–52.
- Lyons, J. M. 1973. Chilling injury in plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 24: 445–466.
- McMillan, K. D., & Rikin, A. 1990. Relationships between circadian rhythm of chilling resistance and acclimation to chilling in cotton seedlings. *Planta*, 182(3): 455–460.
- Medina, E., Delgado, M., Troughton, J. H., & Medina, J. D. 1977. Physiological ecology of CO₂ fixation in Bromeliaceae. *Flora*, 166: 137–152.
- Medina, E., & Osmond, C. B. 1981. Temperature Dependence of Dark CO₂ Fixation and Acid Accumulation in *Kalanchoé daigremontiana*. *Australian Journal of Plant Physiology*, 8(6): 641–649.
- Neuner, G., & Pramsöhler, M. 2006. Freezing and high temperature thresholds of photosystem 2 compared to ice nucleation, frost and heat damage in evergreen subalpine plants. *Physiologia Plantarum*, 126: 196–204.
- Nimmo, H. G., Carter, P. J., Fewson, C. A., Nelson, J. P. S., Nimmo, G. A., & Wilkins, M. B. 1995. Regulation of malate synthesis in CAM plants and guard cells; effects of light and temperature on the phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase. In N. Smirnoff (Ed.), *Environment and Plant Metabolism*: 34–44. Oxford, UK: Bios Scientific Publish Ltda.
- Nimmo, Hugh G. 2000. The regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in CAM plants. *Trends in Plant Science*, 5(2): 75–80.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12773193>.
- Osmond, C. B. 1978. Crassulacean Acid Metabolism: A Curiosity in Context. *Annual Review of Plant Physiology*, 29(1): 379–414.
- Petinov, N. S., & Molotkovsky, Y. G. 1957. Protective reactions in heat-resistant plants induced by high temperatures. *Fiziologiyi Rasteny (Plant Physiology)*, 4: 221–225.
- Popp, M., Janett, H.-P., Lüttge, U., & Medina, E. 2003. Metabolite gradients and carbohydrate translocation in rosette leaves of CAM and C₃ bromeliads. *New Phytologist*, 157(3): 649–656.
- Rikin, A. 1992. Circadian rhythm of heat resistance in cotton seedlings. Synthesis of heat shock proteins. *European Journal of Cell Biology*, 59(1): 160–165.
- Rikin, A., Dillwith, J. W., & Bergman, D. K. 1993. Correlation between the circadian rhythm of resistance to extreme temperatures and changes in fatty acid composition in Cotton seedlings. *Plant physiology*, 101: 31–36.
- Santarius, K. A. 1971. The effect of freezing on thylakoid membranes in the presence of organic acids. *Plant physiology*, 48(2): 156–62.

- Savchenko, G. E., Klyuchareva, E. A., Abramchik, L. M., & Serdyuchenko, E. V. 2002. Effect of periodic heat shock on the inner membrane system of etioplasts. *Russian Journal of Plant Physiology*, 49(3): 349–359.
- Schreiber, U., & Armond, P. A. 1978. Heat-induced changes of chlorophyll fluorescence in isolated chloroplasts and related heat-damage at pigment level. *Biochimica et Biophysica Acta*, 502: 138–151.
- Smith, L. B., & Downs, R. J. 1979. Bromelioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica*: 14(3):1493–2142.
- Takahashi, C. A., & Mercier, H. 2011. Nitrogen metabolism in leaves of a tank epiphytic bromeliad: Characterization of a spatial and functional division. *Journal of Plant Physiology*, 168(11): 1208–1216.
- Team, R. C. 2012. R: A language and environment for statistical computing. <http://www.r-project.org>, Vienna, Austria.: R Foundation for Statistical Computing.
- Valladares, F., & Pearcy, R. W. 1997. Interactions between water stress, sun-shade acclimation, heat tolerance and photoinhibition in the sclerophyll *Heteromeles arbutifolia*. *Plant, Cell and Environment*, 20: 25–36.
- Wolfe, J. 1978. Chilling injury in plants - the role of membrane lipid fluidity. *Plant, Cell and Environment*, 1: 241–247.
- Yamane, Y., Shikanai, T., Kashino, Y., Koike, H., & Satoh, K. 2000. Reduction of QA in the dark: Another cause of fluorescence F_0 increases by high temperatures in higher plants. *Photosynthesis research*, 63: 23–34.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi observado que o metabolismo CAM, por si só, não é responsável pela elevação da termotolerância fotossintética das plantas que o possuem. Ao invés disso, o ácido málico, principal componente desse metabolismo, parece atuar de forma negativa na aquisição de termotolerância dessas espécies. Comparando-se os resultados obtidos com o observado em outros trabalhos com plantas que possuem metabolismos C3, C4 e CAM (tabela 1), é possível notar que, apesar das maiores termotolerâncias registradas nas espécies CAM estudadas, *Aechmea nudicaulis* e *Aechmea blanchetiana*, serem similares à registrada em outra bromélia CAM, *Ananas comosus* (Weng & Lai, 2005), esses valores foram bem inferiores ao observado em outras espécies que não apresentam esse metabolismo. Além disso, a termotolerância observada nas espécies da Serra da Piedade foi similar, ou inferior, à observada em espécies dos Alpes austríacos (Braun *et al.*, 2002) e as maiores termotolerâncias observadas, dentre todas as espécies estudadas, foram próximas a de espécies nativas da costa e de um chaparral da Flórida, Estados Unidos (Knight & Ackerly, 2002). É possível notar, também na tabela 1, que as espécies com maior termotolerância ou possuem uma ampla distribuição equatorial na América do Sul (Campos, 2011) ou são de ambientes naturalmente submetidos a altas temperaturas, como as de desertos da Flórida (Knight & Ackerly, 2003). Dessa forma, é provável que além de estar possivelmente relacionada com a aclimação às variações de temperatura típicas de seu ambiente natural, a termotolerância de uma espécie pode ser resultante de variações ambientais históricas, que podem ter favorecido espécies com grande termotolerância potencial (Knight & Ackerly, 2003).

Outro ponto importante dos resultados apresentados é a influência da região foliar na termotolerância de bromélias, onde cada porção das folhas parece desenvolver diferentes respostas a alterações da temperatura ambiente. Neste trabalho, o ápice foliar apresentou maior capacidade de aclimação a temperaturas não letais (10-35°C), mas menor termotolerância a temperaturas extremas do que a base foliar. Dessa forma, o menor acúmulo de ácidos orgânicos na base foliar, além de ter relação com possíveis divisões funcionais nas folhas (Freschi *et al.*, 2010), pode funcionar como uma estratégia de bromélias CAM para que a região basal foliar proteja a região apical, possivelmente mais fotossintetizante (Freschi *et al.*, 2010) e, portanto, com uma menor termotolerância.

Até o momento, a única espécie CAM utilizada em estudos envolvendo termotolerância fotossintética foi o abacaxizeiro (*Ananas comosus*) (Weng & Lai, 2005; Yamada *et al.*, 1996), uma bromélia de valor agrônômico. Essa é também a única espécie utilizada em estudos de termotolerância da família Bromeliaceae. No entanto, o conhecimento do mecanismo e da magnitude da termotolerância de bromélias envolve muito mais do que a questão da produção alimentícia, é de extrema importância para a compreensão dos impactos de mudanças ambientais na formação e na manutenção do ecossistema a que essa família está relacionada.

Tabela 1 (próxima página). Comparação dos resultados encontrados, no presente trabalho, com o observado por outros autores. Foi construído o “T50 corrigido” que consiste em uma transformação do Tc, utilizado em alguns dos trabalhos, segundo fórmula construída por Knight & Ackerly (2003). Os valores estão todos apresentados em ordem crescente para a melhor comparação dos resultados encontrados, que estão em negrito e diferenciados por capítulo.

Família	Espécie	Metabolismo	Tc (°C)	T50 (°C)	T50 (°C) corrigido	Referência
Rutaceae	<i>Citrus sinensis</i>	C3	36.71		39.05	Weng & Lai, 2005
Bromeliaceae	<i>Aechmea blanchetiana</i> (10°C, Ápice)	CAM		40.8	40.8	Capítulo III
Poaceae	<i>Saccharum officinarum</i>	C4	41.31		43.65	Weng & Lai, 2005
Poaceae	<i>Zea mays</i>	C4	42.67		45.01	Weng & Lai, 2005
Fabaceae	<i>Acacia confusa</i>	C3	43.25		45.59	Weng & Lai, 2005
Bromeliaceae	<i>Vriesea bituminosa</i>	C3		45.7	45.7	Capítulo I
Primulaceae	<i>Soldanella pusilla</i>	C3	43.6		45.94	Braun <i>et al.</i> , 2002
Rosaceae	<i>Rubus L. subgenus Idaeobatus</i>	C3	43.7		46.04	Molina-Bravo <i>et al.</i> , 2011
Caricaceae	<i>Carica papaya</i>	C3	43.85		46.19	Weng & Lai, 2005
Bromeliaceae	<i>Vriesea minarum</i>	C3		46.2	46.2	Capítulo I
Ericaceae	<i>Rhododendron ferrugineum</i>	C3	43.9		46.24	Braun <i>et al.</i> , 2002
Bromeliaceae	<i>Aechmea blanchetiana</i> (Ápice)	CAM		46.6	46.6	Capítulo II
Poaceae	<i>Miscanthus floridulus</i>	C4	44.39		46.73	Weng & Lai, 2005
Bromeliaceae	<i>Aechmea nudicaulis</i> (Sol)	CAM		46.8	46.8	Capítulo I
Bromeliaceae	<i>Aechmea blanchetiana</i> (10°C, Base)	CAM		47.1	47.1	Capítulo III
Bromeliaceae	<i>Aechmea blanchetiana</i> (35°C, Base)	CAM		47.1	47.1	Capítulo III
Bromeliaceae	<i>Aechmea blanchetiana</i> (35°C, Ápice)	CAM		47.3	47.3	Capítulo III
Hydrophyllaceae	<i>Eriodictyon californicum</i>	C3		48	48	Knight & Ackerly, 2002
Amaranthaceae	<i>Atriplex leucophylla</i>	C3		48.7	48.7	Knight & Ackerly, 2002
Ericaceae	<i>Loiseleuria procumbens</i>	C3	46.4		48.74	Braun <i>et al.</i> , 2002
Grossulariaceae	<i>Ribes californicum</i>	C3		49	49	Knight & Ackerly, 2002
Bromeliaceae	<i>Aechmea blanchetiana</i> (Base)	CAM		49.3	49.3	Capítulo II
Bromeliaceae	<i>Aechmea nudicaulis</i> (Sombra)	CAM		49.4	49.4	Capítulo I
Bromeliaceae	<i>Ananas comosus</i>	CAM	47.19		49.53	Weng & Lai, 2005
Rosaceae	<i>Heteromeles arbutifolia</i>	C3		51.5	51.5	Knight & Ackerly, 2002
Melastomataceae	<i>Miconia ibaguensis</i>	C3		53.48	53.48	Campos, 2011
Caprifoliaceae	<i>Lonicera hipidula</i>	C3		54.4	54.4	Knight & Ackerly, 2002
Melastomataceae	<i>Miconia lepidota</i>	C3		54.80	54.80	Campos, 2011
Fabaceae	<i>Bauhinia longifolia</i>	C3		55.01	55.01	Campos, 2011
Amaranthaceae	<i>Atriplex hymenelytra</i>	C3		55.7	55.7	Knight & Ackerly, 2002
Melastomataceae	<i>Miconia albicans</i>	C3		56.63	56.63	Campos, 2011
Zygophyllaceae	<i>Larrea tridentata</i>	C3		63.2	63.2	Knight & Ackerly, 2002

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Braun, V., Buncher, O., & Neuner, G. 2002. Thermotolerance of photosystem 2 of three alpine species under field conditions. *Photosynthetica*, 40(4): 587–549.
- Campos, P. T. 2011. *Fenologia e variações sazonais no status hídrico e na termotolerância em espécies lenhosas em um fragmento de mata semidecídua em Belo Horizonte, MG*. Universidade Federal de Minas Gerais.
- Freschi, L., Takahashi, C. A., Cambui, C. A., Semprebom, T. R., Cruz, A. B., Miotto, P. T., et al. 2010. Specific leaf areas of the tank bromeliad *Guzmania monostachia* perform distinct functions in response to water shortage. *Journal of Plant Physiology*, 167(7): 526–33.
- Knight, C. A., & Ackerly, D. D. 2002. An ecological and evolutionary analysis of photosynthetic thermotolerance using the temperature-dependent increase in fluorescence. *Oecologia*, 130(4): 505–514.
- Knight, C. A., & Ackerly, D. D. 2003. Evolution and plasticity of photosynthetic thermal tolerance, specific leaf area and leaf size: congeneric species from desert and coastal environments. *New Phytologist*, 160(2): 337–347.
- Molina-Bravo, R., Arellano, C., Sosinski, B. R., & Fernandez, G. E. 2011. A protocol to assess heat tolerance in a segregating population of raspberry using chlorophyll fluorescence. *Scientia Horticulturae*, 130(3): 524–530.
- Weng, J., & Lai, M. 2005. Estimating heat tolerance among plant species by two chlorophyll fluorescence parameters. *Photosynthetica*, 43(3): 439–444.
- Yamada, M., Hidaka, T., & Fukamachi, H. 1996. Heat tolerance in leaves of tropical fruit crops as measured by chlorophyll fluorescence. *Scientia Horticulturae*, 67: 39–48.