

FLÁVIA MARIA KAZUE KURITA

**Assimilação de diferentes fontes nitrogenadas
na indução da multiplicação da bromélia
Alcantarea imperialis (Carrière) Harms
cultivada *in vitro***

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

SÃO PAULO

2015

FLÁVIA MARIA KAZUE KURITA

**Assimilação de diferentes fontes nitrogenadas
na indução da multiplicação da bromélia
Alcantarea imperialis (Carrière) Harms
cultivada *in vitro***

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

ORIENTADORA: DRA. VÍVIAN TAMAKI

CO-ORIENTADORA: DRA. ADRIANA HISSAE HAYASHI

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

Kurita, Flávia Maria Kazue
K96a Assimilação de diferentes fontes nitrogenadas na indução da multiplicação da bromélia *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms cultivada *in vitro*, São Paulo / Flávia Maria Kazue Kurita -- São Paulo, 2015.
115 p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2015.
Bibliografia.

1. Bromeliaceae. 2. Conservação. 3. Nitrogênio. I. Título.

CDU: 582.564

“A persistência é o menor caminho do êxito”

Charles Chaplin

“O que prevemos raramente ocorre;
o que menos esperamos geralmente acontece.”

Benjamin Disraeli

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são
como os timoneiros que entram no navio sem timão nem
bússola, nunca tendo certeza do seu destino”.

Leonardo da Vinci

Dedico,

Aos meus pais Osvaldo e Odinéia
e ao meu irmão Wilian,

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), pelo auxílio financeiro sob a forma de concessão de bolsa de Doutorado (Fapesp 2011/09116-6).

Ao Instituto de Botânica por disponibilizar as dependências para o desenvolvimento do projeto. Ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Botânica pela oportunidade de participar do curso e desenvolver este projeto.

Agradeço à Dra. Vívian Tamaki pela orientação, pelo bom convívio e paciência durante a execução do projeto e por acreditar em meu trabalho. Além disto, agradeço pelas diversas oportunidades profissionais concedidas, os quais foram importantes para o meu amadurecimento.

À Dra. Adriana Hissae Hayashi, pela orientação, pelos ensinamentos sobre as técnicas de anatomia e grande incentivo para o desenvolvimento do projeto. Muito obrigada pelas palavras de apoio, nos momentos difíceis, que tive durante esse trabalho.

À Dra. Catarina Carvalho Nievola, pelo apoio e amizade, pelos conhecimentos transmitidos e valiosas sugestões indispensáveis à elaboração e desenvolvimento do projeto.

Aos membros da banca de qualificação, Dr. Rogério Mamoru Suzuki. Dra. Vanessa Rebouças dos Santos e Dra. Maria Aurineide Rodrigues, pelas valiosas sugestões, e aos membros da banca examinadora da tese.

Aos pesquisadores do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais, em especial ao Dr. Shoey Kanashiro, pelos conhecimentos transmitidos e pela excelente convivência.

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais, Ivomar Aparecido Medina, e em especial ao Jorge Luiz Marx Young, pelo companheirismo e momentos de descontração. Aos os funcionários do Núcleo de Anatomia, pela ajuda durante a realização da tese. Ao Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica, pelo empréstimo de vários equipamentos, em especial a técnico de laboratório, Pedro, pela atenção e bom atendimento prestado.

Aos funcionários da Secretaria da Pós-graduação, em especial Márcia Regina Ângelo, pela atenção e bom atendimento prestado.

Aos colegas do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais pela amizade e apoio durante a realização do Doutorado e meus agradecimentos por tudo e pela convivência no laboratório. A Jaqueline Jorge e Rita Almeida, pela amizade durante o desenvolvimento deste trabalho.

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

Muito obrigada!

SUMÁRIO

I) INTRODUÇÃO.....	1
I.1) Bromeliaceae e <i>Alcantarea imperialis</i> (Carrière) Harms	1
I.2) Propagação de Bromeliaceae	1
I.3) Nitrogênio	2
I.3.1) Assimilação do nitrogênio	3
I.3.2) Diferentes fontes nitrogenadas na indução da multiplicação <i>in vitro</i>	5
I.4) Anatomia caulinar e radicular de Bromeliace.....	5
II) JUSTIFICATIVA	7
III) OBJETIVO	8
IV) MATERIAL E MÉTODOS	9
IV.1) Material vegetal	9
IV.2) Obtenção de plântulas <i>in vitro</i>	9
IV.3) Crescimento <i>in vitro</i> com diferentes fontes nitrogenadas	9
IV.4) Pigmentos fotossintéticos	12
IV.5) Atividades enzimáticas da redutase do nitrato (RN), sintetase da glutamina (GS) e desidrogenase do glutamato (GDH-NADH)	13
IV.6) Quantificação de amônio e nitrato endógeno	15
IV.7) Análises das proteínas totais solúveis	16
IV.8) Análise dos aminoácidos totais	16
IV.9) Experimento final (TF)	17
IV.10) Microscopia de luz	17
IV.11) Cultivo em ambiente controlado	18
IV.12) Análise estatística.....	19
V) RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
V.1) Crescimento <i>in vitro</i> e metabolismo do nitrogênio das plantas no tempo zero (T0)	20
V.2) Metabolismo do nitrogênio com diferentes concentrações de amônio (NH_4^+) – 1 dia (24 horas)	21
V.3) Metabolismo do nitrogênio com diferentes concentrações de nitrato (NO_3^-) – 1 dia (24 horas)	26
V.4) Metabolismo do nitrogênio com diferentes concentrações de nitrato de amônio (NH_4NO_3) – 1 dia (24 horas)	29

V.5) Crescimento <i>in vitro</i> e metabolismo do nitrogênio das plantas com diferentes concentrações de amônio (NH_4^+) – 3 meses (90 dias)	34
V.6) Crescimento <i>in vitro</i> e metabolismo do nitrogênio das plantas com diferentes concentrações de nitrato (NO_3^-) – 3 meses (90 dias)	41
V.7) Crescimento <i>in vitro</i> e metabolismo do nitrogênio das plantas com diferentes concentrações de nitrato de amônio (NH_4NO_3) – 3 meses (90 dias)	47
V.8) Crescimento <i>in vitro</i> e metabolismo do nitrogênio das plantas com diferentes concentrações de amônio (NH_4^+) – 6 meses (180 dias)	54
V.9) Crescimento <i>in vitro</i> e metabolismo do nitrogênio das plantas com diferentes concentrações de nitrato (NO_3^-) – 6 meses (180 dias)	60
V.10) Crescimento <i>in vitro</i> e metabolismo do nitrogênio das plantas com diferentes concentrações de nitrato de amônio (NH_4NO_3) – 6 meses (180 dias)	68
V.11) Crescimento das plantas no experimento final.....	75
V.12) Análises anatômicas	77
V.13) Crescimento das plantas em ambiente controlado no tempo zero (T0).....	86
V.14) Crescimento das plantas em ambiente controlado por 3 meses (90 dias)..	86
V.15) Crescimento das plantas em ambiente controlado por 6 meses(180 dias).	93
VI) CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	102
VII) PERSPECTIVAS FUTURAS	103
VIII) RESUMO	104
XI) ABSTRACT	105
X) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

LISTA DE ABREVIATURAS

N= Nitrogênio

NH_4^+ = Amônio

NO_3^- = Nitrato

RN= Redutase do nitrato

RNi= Redutase do nitrito

NO_2^- = Nitrito

GS= Sintetase da glutamina

GOGAT= Glutamato sintase

GDH-NADH= Desidrogenase do glutamato

I) INTRODUÇÃO

I.1) Bromeliaceae e *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms

Bromeliaceae representa uma das maiores famílias com distribuição neotropical, compreendendo 58 gêneros e aproximadamente 3.352 espécies (Luther, 2012). No Brasil há 44 gêneros e 1.343 espécies, sendo 85% endêmicos do Brasil (Forzza *et al.*, 2015). Bromeliaceae está distribuída em oito subfamílias: Bromelioideae, Puyoideae, Pitcairnioideae, Navioideae, Hechtioideae, Tillandsioideae, Lindmanioideae e Brocchinioideae (Givnish, *et al.*, 2011).

Seus representantes apresentam grande diversidade de formas de vida, sendo terrícolas, epífitas, saxícolas ou rupícolas, e muitas possuem fitotelma ou tanque (sobreposição de bainhas foliares nas quais podem ficar retidos água e nutrientes) (Benzing, 2000).

Alcantarea imperialis (Carrière) Harms, popularmente conhecida como bromélia imperial (Versieux & Wanderley, 2007; Bobrowski *et al.*, 2009), é uma espécie endêmica da Serra dos Órgãos, no Estado do Rio de Janeiro. As plantas são de grande porte, heliófilas, rupícolas ou saxícolas, com rosetas de cor verde até vermelho-escuro e que, geralmente, formam grandes aglomerados populacionais (Versieux, 2009). Para atingir seu porte majestoso, são necessárias algumas décadas, às vezes até 40 anos para se tornar uma planta adulta, sendo que a lentidão de seu desenvolvimento decorre da pequena quantidade de nutrientes disponíveis no ambiente em que vivem (Maun, 1994). Sua inflorescência pode atingir de dois a três metros de altura, com sépalos avermelhados e pétalas brancas (Versieux, 2009).

Inúmeros exemplares de espécies de bromélias ornamentais são retirados ilegalmente da mata para sua comercialização e o desenvolvimento de protocolos para sua produção, como em *A. imperialis*, pode ser uma ferramenta para a sua conservação, visto que se trata de uma na categoria “vulnerável a extinção” (Ministério do Meio Ambiente, 2014). Uma das formas utilizadas na conservação de espécies de bromélias é o uso da micropropagação (Santos *et al.*, 2010).

I.2) Propagação de Bromeliaceae

A forma de propagação mais utilizada por produtores de bromélias da região metropolitana de Curitiba é a partir de sementes (Santos *et al.*, 2005). A propagação de

bromélias a partir de sementes, dependendo da espécie cultivada, pode não ser capaz de fornecer um grande número de plantas em um curto espaço de tempo, sendo a uniformidade e o vigor das plantas uma característica interessante ao produtor comercial (Aoyama, 2010).

Nesse sentido, a micropropagação pode ser o cultivo mais adequado, diversos estudos foram realizados visando à micropropagação de bromélias de interesse ornamental e também das espécies endêmicas, raras e/ou ameaçadas de extinção (Kurita *et al.*, 2013; Kurita & Tamaki, 2014). As vantagens oferecidas por esse método de multiplicação de plantas são inúmeras, como a possibilidade de se obter um grande número de plantas em um curto espaço de tempo e com qualidade fitossanitária, o que não ocorre em ambiente natural (Mercier & Kerbauy, 1995). Além disso, o uso do cultivo *in vitro* para o estudo de nutrição mineral, é muito apropriado, pois como as plantas são cultivadas em condições assépticas é possível controlar o fornecimento de nutrientes (Mercier, 2004).

Um aspecto importante do cultivo *in vitro* é o suprimento mineral do meio de cultura, uma vez que a nutrição mineral é essencial para o crescimento e o desenvolvimento das plantas (Bunn *et al.*, 2011) sendo, portanto, fundamental a escolha de um meio com uma concentração adequada de elementos minerais (Naves, 2001). Os meios de cultura utilizados na maioria das vezes são baseados em formulações básicas modificadas (Kanashiro, 2005), e o mais utilizado é o desenvolvido por Murashige & Skoog (1962-MS) (Werner *et al.*, 2010), porém de acordo com Kurita & Tamaki (2014), diluições deste meio podem ser mais favoráveis para as plantas e, também, possibilita as melhores combinações dos sais.

Segundo Ohkama-Ohtsu & Wasaki (2010), as plantas necessitam de 17 elementos essenciais para completar seu ciclo de vida, entre eles o nitrogênio (N), o potássio (K), o fósforo (P) e o cálcio (Ca), sendo o primeiro elemento necessário em maior quantidade (White & Brown, 2010).

I.3) Nitrogênio

O nitrogênio (N), segundo Marschner (2012), é o principal componente de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, clorofilas e coenzimas. Quando em deficiência, o N é translocado das folhas mais velhas, que apresentam clorose para as jovens que apresentam um menor desenvolvimento. A concentração e a fonte nitrogenada influenciam o crescimento das plantas, sendo que a absorção de amônio (NH_4^+) depende de sua concentração enquanto a do nitrato (NO_3^-) independe da sua concentração (Yoneyama, 2001; Fukushima & Kusano, 2014).

As duas principais fontes de nitrogênio encontradas no solo são o NO_3^- e o NH_4^+ (Vidal *et al.*, 2014). De acordo com Inselsbacher *et al.* (2007), as formas nitrogenadas dentro do tanque de bromélias são as mesmas citadas acima, além de uréia, aminoácidos e proteínas.

O NH_4^+ é absorvido pelas raízes pelo processo ativo, quando em baixas concentrações e por processo passivo em altas concentrações (Kerbaudy, 2012). Após a absorção, o íon é rapidamente assimilado na forma orgânica (conforme explicado no item seguinte “I.3.1. Assimilação do nitrogênio”), pois o acúmulo do mesmo é prejudicial para a planta, uma vez que pode levar a sua morte ou prejudicar alguns processos como a respiração (Kerbaudy, 2008; Taiz & Zeiger, 2013).

O NO_3^- é absorvido pelas raízes apenas por processo ativo e, em seguida, reduzido nas folhas e raízes para NH_4^+ , onde é assimilado em aminoácidos e proteínas (Kerbaudy, 2012); além disso, sabe-se que o NO_3^- induz a síntese de citocininas, promovendo o crescimento das plantas (Sakakibara *et al.*, 1998; Takei *et al.*, 2001a,b; Tamaki & Mercier, 2007).

Araujo *et al.* (2009) ressaltaram que a combinação destes dois íons favorece o crescimento *in vitro* de várias espécies, sendo que a razão entre estas duas fontes de nitrogênio parece ser o fator determinante causador deste estímulo. Entretanto, este processo ainda não é bem entendido (Niedz & Evens, 2008; Lu *et al.*, 2009). Villa *et al.* (2009), ao estudarem o efeito do nitrato de amônio (NH_4NO_3) no crescimento *in vitro* de amoreira-preta, observaram que esta substância favoreceu o crescimento dessa planta. Além disto, Kurita & Tamaki (2014) verificaram que 30 mM de NH_4NO_3 do meio MS induziu a multiplicação *in vitro* de *A. imperialis*, sendo 3,75 mM de N na forma de nitrato de potássio (KNO_3) e 26,25 mM de N na forma de NH_4NO_3 .

I.3.1) Assimilação do nitrogênio

O nitrogênio presente nas moléculas de NO_3^- pode ser assimilado em aminoácidos pelas plantas, apenas quando esses compostos nitrogenados são reduzidos ou hidrolisados, respectivamente, formando NH_4^+ . A redução completa do NO_3^- até NH_4^+ ocorre em duas etapas: após ser absorvido, o NO_3^- é reduzido a NO_2^- pela enzima redutase do nitrato (RN). O NO_2^- produzido pela redução do NO_3^- é citotóxico, devendo ser rapidamente reduzido a NH_4^+ . A enzima responsável por essa segunda etapa é denominada de redutase do nitrito (RNi) (Heldt, 1997).

De acordo com Santos (2010), as plantas disponibilizam cerca de 25% da energia gerada na fotossíntese para assimilar o nitrato. De acordo com este mesmo autor, o ciclo

diurno da RN é descrito para várias espécies, e que a maior parte das plantas reduz o nitrato durante o dia, sendo raros os estudos que relatam atividades no período escuro.

O NH_4^+ pode ser incorporado em aminoácidos pela ação combinada da sintetase da glutamina (GS) e sintase do glutamato (GOGAT). A GS é uma importante enzima do metabolismo do nitrogênio. Ela tem grande afinidade pela molécula de amônio e está presente em todos os tecidos vegetais (Miflin & Habash, 2002). Conhecem-se duas isoformas de GS nas plantas: uma, presente no citossol (GS-1) e outra localizada nos cloroplastos ou nos plastídios (GS-2) das raízes. Ambas as formas têm a função de combinar o amônio com o glutamato para produzir glutamina. Essa reação necessita da hidrólise de um ATP e envolve um cátion divalente, como o Mg^{+2} , Mn^{+2} ou Co^{+2} como co-fator (Xu *et al.*, 2012).

Posteriormente, a glutamina formada tem o seu grupo amida transferido para o 2-oxoglutarato, produzindo duas moléculas de glutamato (Lea, 1993). A enzima responsável por essa reação é a glutamato sintase (GOGAT) que pode estar presente nas plantas em duas formas: uma cloroplastídica, dependente de ferredoxina e outra plastídica, dependente de NADH e encontrada nos tecidos não fotossintetizantes (Dubois *et al.*, 2003).

A compreensão da regulação da GS e GOGAT é bastante complexa. Dependendo do tecido, da célula ou do compartimento celular em que essas enzimas se localizam ou do estágio de desenvolvimento do órgão vegetal, as atividades dessas enzimas são diferentes. É importante considerar essa complexidade ao se estudar a GS e a GOGAT, pois as suas funções em conjunto com as de outras enzimas permitem a planta balancear o metabolismo do carbono e nitrogênio em diferentes órgãos e regiões celulares, nas diferentes horas do dia e sob diversas condições ambientais (Miflin & Habash, 2002). Segundo Lawlor (2002), compreender os processos bioquímicos, moleculares e fisiológicos das plantas de valor econômico é a melhor forma para se conseguir elaborar novas estratégias que permitam aumentar a produtividade sem a necessidade do uso excessivo de fertilizantes.

A desidrogenase do glutamato (GDH) é outra enzima que tem uma importante função no metabolismo do nitrogênio (Miflin & Habash, 2002). Antes da descoberta da via de assimilação GS/GOGAT, acreditava-se que a GDH tinha a função única de catalisar a síntese de glutamato a partir de NH_4^+ e 2-oxoglutarato. Entretanto, o trabalho de Cammaerts & Jacobs (1985) sugeriu um duplo papel para essa enzima. Na presença de altas concentrações de NH_4^+ , a GDH atuaria no sentido de assimilação do amônio, enquanto a GDH-desaminante forneceria esqueletos carbônicos quando existissem concentrações mais baixas do íon amoniacal, como foi observado por Tamaki & Mercier (2007), em *Tillandsia pohliana*. Assim, a GDH faria uma ligação entre os metabolismos de carbono e de nitrogênio. Stitt *et al.*

(2002) sugerem que a ação da GDH possa variar de acordo com as necessidades celulares em relação aos conteúdos de glutamato e esqueletos carbônicos.

I.3.2) Diferentes fontes nitrogenadas na indução da multiplicação *in vitro*

Após a compreensão da assimilação do N e a determinação da melhor fonte nitrogenada para o crescimento e, visto que, de acordo com Kurita & Tamaki (2014) a espécie em estudo, *A.imperialis*, tem a capacidade de se multiplicar vegetativamente dependendo da concentração de N, o próximo passo é o entendimento deste processo.

O uso de NO_3^- ou de NH_4^+ separadamente ou combinados tem proporcionado bons resultados na organogênese e na morfogênese *in vitro* (Werner *et al.*, 2010). Estes mesmos autores ao estudarem a calogênese, observaram que usados separadamente o NH_4^+ e NO_3^- não foram tão eficientes quanto usados combinados. Laukkanen *et al.* (1997) estudaram o efeito de diferentes fontes de N em culturas de calos de *Pinus sylvestris* L. em meio MS modificado e indicaram que o crescimento dos calos foi baixo no meio de cultura que continha somente nitrato, comparados aos calos que cresceram na presença de nitrato de amônio, cujo o desenvolvimento mostrou-se superior.

I.4) Anatomia caular e radicular de Bromeliaceae

O processo de multiplicação poderia ser visualizado com o auxílio das análises anatômicas, cujos resultados favoreceriam a otimização da produção de plantas.

Os trabalhos que visam estudar a anatomia do caule em Bromeliaceae sem a adição de reguladores de crescimento são escassos na literatura, sendo poucas as espécies estudadas provenientes do ambiente natural: *Ananas comosus* (L.) Merr (Krauss, 1948), *Tillandsia fasciculata* Swartz (Tomlinson, 1969), *Dyckia brevifolia* Baker (Lobo, 2007) e *Bromelia antiacantha* Bertol. (Dettke *et al.*, 2008). O único trabalho que relaciona a anatomia do caule de bromélia em plantas cultivadas *in vitro* e suas brotações laterais é o de Galeck & Kukczanka (1996) que trata da influência dos reguladores de crescimento na propagação vegetativa de *Tillandsia coronata* e *Guzmania monostachya* (L.) Rusby ex. Mez.

Em espécies de Pitcairnioideae, que são terrestres, o sistema radicular é desenvolvido apresentando a função de absorção de água e nutrientes (Pittendrigh, 1948).

Os trabalhos com anatomia de raiz são mais comuns do que os com caule, destacando-se os trabalhos para algumas espécies brasileiras, como o de Silva & Scatena (2011), que analisaram a anatomia de raiz de nove espécies de bromélias da Amazônia, Proença & Sajo

(2008), que estudaram a raiz e o rizoma de 14 espécies do Cerrado, visando indicar possíveis adaptações ao ambiente e Pita & Menezes (2002), que estudaram em *Dyckia* Schult. F. e *Encholirium* Mart. Ex Schult. & Schult. F. a estrutura do velame.

II) JUSTIFICATIVA

O fornecimento diferencial de NO_3^- e de NH_4^+ para a planta pode afetar os níveis das enzimas envolvidas no metabolismo de nitrogênio, resultando em alterações no crescimento e na produção vegetal (Carvalho, 2012). Assim, para se compreender melhor o efeito das diferentes fontes nitrogenadas no crescimento vegetal é importante analisar como ocorre a assimilação do N a partir dessas fontes.

Além disso, parece ser possível substituir os reguladores de crescimento no meio de cultura por nutrientes orgânicos e inorgânicos na multiplicação de bromélias (Silva *et al.*, 2005). A substituição de alguns reguladores de crescimento por NH_4NO_3 em protocolos de multiplicação *in vitro* possibilitaria uma redução significativa nos custos de operação de um laboratório industrial, visto que muitos reguladores de crescimento possuem custo elevado (Silva *et al.*, 2005). Maldener *et al.* (2006) observaram que reduções no fornecimento de N induziram a multiplicação em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen *in vitro*, pois com 50% de N do meio MS, associada a um incremento na dose de sacarose de 30 g L⁻¹ para 45g L⁻¹ favoreceu o crescimento em altura, número de segmentos nodais e brotações, bem como a produção de biomassa. Kurita & Tamaki (2014) observaram que *A. imperialis* apresentava o surgimento de brotos ao ser cultivada *in vitro* com 30 mM de NH_4NO_3 , e Andrade & Tamaki (2014), constataram, em outra bromélia, a *Nidularium minutum* Mez a multiplicação vegetativa ocorria ao cultivar *in vitro* as plantas com 175 mM de NH_4NO_3 .

III) OBJETIVO

III.1) OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi determinar a melhor fonte nitrogenada para a propagação *in vitro* de *A. imperialis*, contribuindo para sua conservação, já que se trata de uma espécie vulnerável a extinção.

III.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- acompanhar a assimilação do nitrogênio na presença de amônio, nitrato e nitrato de amônio;
- acompanhar a atividade de RN, GS e GDH-NADH durante 24 horas nos tempos de 1 dia, 90 dias e 180 dias;
- acompanhar o crescimento em ambiente controlado em diferentes fontes nitrogenadas;
- estudar a anatomia do caule a fim de verificar a ontogênese das gemas e a anatomia da raiz para comparar a ocorrência de diferenças estruturais de plantas cultivadas em diferentes fontes nitrogenadas.

IV) MATERIAL E MÉTODOS

IV.1) Material vegetal

Nos experimentos foram utilizadas sementes de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms que foram coletadas de exemplares cultivados no Núcleo de Pesquisas em Plantas Ornamentais, da Coleção Viva de Bromélias do Instituto de Botânica de São Paulo. Após colhidas, as sementes foram acondicionadas em sacos de papel pardo e armazenadas a 10 °C.

IV.2) Obtenção de plântulas *in vitro*

As sementes (aproximadamente 36.000), as quais foram retirados os apêndices plumosos, foram submetidas à desinfestação superficial em frasco de 250 mL contendo álcool a 70% por cinco minutos, sendo, em seguida, imersas em solução de fungicida Benomyl 0,1% por quinze minutos e, posteriormente, colocadas em solução de hipoclorito de sódio a 2%, acrescida de duas gotas de Tween 20, durante uma hora. A seguir, em câmara de fluxo de ar estéril, a solução de hipoclorito foi retirada e o processo foi finalizado com quatro lavagens consecutivas das sementes com água destilada esterilizada em autoclave por 60 minutos. Após a desinfestação, as sementes foram colocadas em frascos de 250 mL contendo 10 mL de meio composto por água e sacarose 3%. O pH do meio foi ajustado para 5,8 com NaOH/HCl, antes da adição de 5 g L⁻¹ de agar. A esterilização dos meios foi realizada a 120 °C durante 15 minutos. As sementes foram mantidas em sala de cultura com fotoperíodo de 12 horas, radiação fotossinteticamente ativa de 30 µmol.m⁻².s⁻¹ e temperatura de 26±2 °C até a obtenção de plântulas (aproximadamente 45 dias).

IV.3) Crescimento *in vitro* com diferentes fontes nitrogenadas

As plântulas, 30.000, sendo 2.500 por tratamento (250 frascos de 250 mL com 10 plantas) foram colocadas nos tratamentos com 40 mL de meio de Murashige & Skoog (1962-MS) modificado em relação à fonte nitrogenada por seis meses *in vitro* (Figura 1):

Tratamento 1 (T1) - amônio (NH₄⁺) nas concentrações de 5, 15, 30 e 60 mM de N (Tabela 1).

Tratamento 2 (T2) - nitrato (NO₃⁻) nas concentrações de 5, 15, 30 e 60 mM de N (Tabela 2).

Tratamento 3 (T3) - nitrato de amônio (NH₄NO₃) nas concentrações de 5, 15, 30 e 60 mM de N (Tabela 3).

Tabela 1: Tratamentos com diferentes concentrações de nitrogênio (N) (5, 15, 30 e 60 mM) na forma de amônio do meio de Murashige & Skoog (1962) modificado.

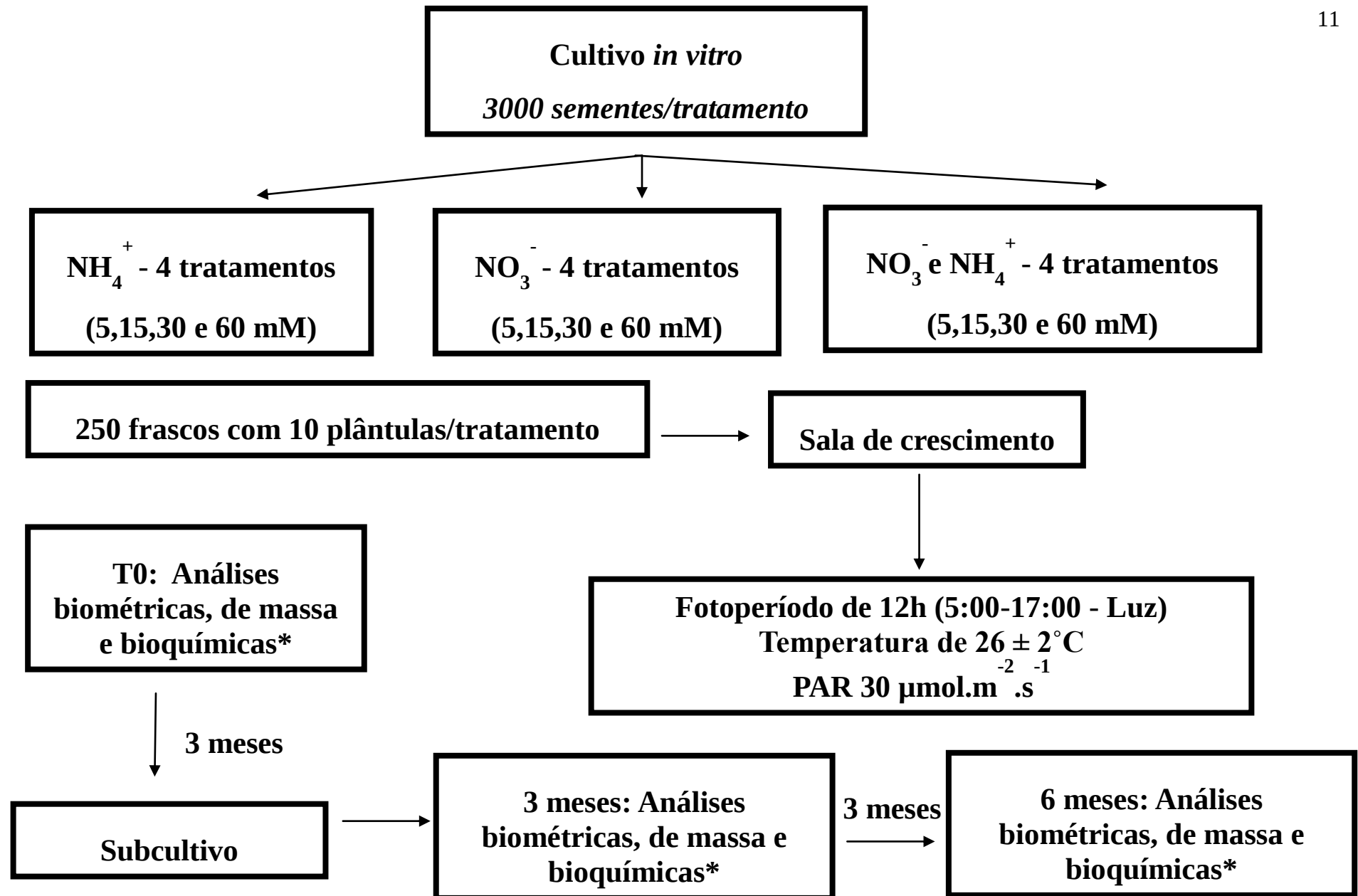
Sais (g.L ⁻¹)	Tratamentos (mM de NH ₄ ⁺)			
	5	15	30	60
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,17	0,50	0,99	1,91
(NH ₄)Cl	0,13	0,40	0,80	1,68
KH ₂ PO ₄	0,17	0,17	0,17	0,17
KCl	0,70	0,70	0,70	0,70
K ₂ SO ₄	0,81	0,81	0,81	0,81
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,44	0,44	0,44	0,44
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,37	0,37	0,37	0,37

Tabela 2: Tratamentos com diferentes concentrações de nitrogênio (N) (5, 15, 30 e 60 mM) na forma de nitrato do meio de Murashige & Skoog (1962) modificado.

Sais (g.L ⁻¹)	Tratamentos (mM de NO ₃ ⁻)			
	5	15	30	60
KNO ₃	0,20	1,21	2,73	5,76
Ca (NO ₃) ₂ . 7H ₂ O	0,35	0,35	0,35	0,35
KH ₂ PO ₄	0,17	0,17	0,17	0,17
KCl	0,62	0,25	-	-
K ₂ SO ₄	0,73	0,29	-	-
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,22	0,22	0,22	0,22
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,37	0,37	0,37	0,37

Tabela 3: Tratamentos com diferentes concentrações de nitrogênio (N) (5, 15, 30 e 60 mM) na forma de nitrato de amônio do meio de Murashige & Skoog (1962) modificado.

Sais (g.L ⁻¹)	Tratamentos (mM de NH ₄ NO ₃)			
	Relação NH ₄ ⁺ : NO ₃ ⁻			
	5 1:1,2	15 1:1,70	30 1:1,3	60 1:1,3
KNO ₃	0,38	0,38	0,38	0,38
NH ₄ NO ₃	0,05	0,45	1,05	2,25
KH ₂ PO ₄	0,17	0,17	0,17	0,17
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,44	0,44	0,44	0,44
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,37	0,37	0,37	0,37



* Análises bioquímicas: pigmentos fotossintéticos, análise de macro e micronutrientes, ensaios enzimáticos, nitrato e amônio endógenos e quantificação de proteínas e aminoácidos

Figura 1: Fluxograma das etapas do crescimento *in vitro* com diferentes concentrações fontes nitrogenadas.

Além disto, todos os meios citados anteriormente, continham a concentração de micronutrientes do MS (H_3BO_3 -6,2 mg.L^{-1} , $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -22,3 mg.L^{-1} , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -8,6 mg.L^{-1} , KI -0,83 mg.L^{-1} , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -0,25 mg.L^{-1} , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -0,025 mg.L^{-1} , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -0,025 mg.L^{-1} , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 27,8 mg.L^{-1} e Na_2EDTA - 37,2 mg.L^{-1}), acrescidos de 100 mg.L^{-1} de *myo* inositol, 0,1 mg.L^{-1} de tiamina e 30 g.L^{-1} de sacarose. Os pH dos meios foram ajustados para 5,8 com NaOH/HCl , antes da adição de 5 g.L^{-1} de agar. As plantas permaneceram em sala de cultura com fotoperíodo de 12 horas (das 5h00 às 17h00), radiação fotossinteticamente ativa de 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de 26 ± 2 °C.

Após a transferência das plântulas para os tratamentos, as coletas dos dados foram realizadas durante 24 horas, de 4 em 4 horas, com início das coletas às 10h00. Portanto, as coletas foram realizadas às 10h00 (0ª hora - antes das transferências para os meios de cultura), 14h00 (4ª hora), 18h00 (8ª hora), 22h00 (12ª hora), 02h00 (16ª hora), 06h00 (20ª hora) e 10h00 (24ª hora).

As plântulas foram analisadas quanto à assimilação do nitrogênio por meio dos ensaios enzimáticos e quantificação de NH_4^+ e NO_3^- endógenos; além disso, foram determinados os teores dos pigmentos fotossintéticos, das proteínas totais solúveis e dos aminoácidos totais, e também foram feitas análises biométricas (número de folhas, comprimento da parte aérea e radicular) e de massas fresca (MF) e seca (MD) da parte aérea e radicular e a quantificação dos brotos por planta. E o pH do meio de cultura também foi medido, antes e após a transferência das plantas.

Após 90 dias do início da transferência, as plantas foram colocadas em novos meios de cultura com as mesmas concentrações dos tratamentos T1, T2 e T3 para garantir que não ocorresse deficiência nutricional. Após esta transferência e após mais 90 dias de cultivo foram feitas as mesmas coletas descritas acima, porém para as plantas com 180 dias, a coleta não foi feita durante 24 horas.

O conteúdo de macronutrientes nos tecidos foliares foram determinados aos seis meses de cultivo (aproximadamente 50 plantas), sendo que em todas as análises foram utilizadas três amostras compostas de folhas.

IV.4) Pigmentos fotossintéticos

O processo de extração de pigmentos fotossintéticos foi baseado em Lichtenthaler (1987), onde foram utilizados acetona gelada e material vegetal (20 plantas) em triplicatas previamente armazenadas a -20 °C. Foram macerados 0,3 g de massa fresca foliar com 3 mL de acetona gelada. A amostra foi filtrada em funis previamente forrados com papel de filtro umedecido com acetona gelada. Após todo o líquido ter sido filtrado, o papel de filtro foi

lavado com acetona até o material depositado perder a coloração verde, sendo coletado em balões volumétricos de 10 mL, onde foi aferido com acetona pura até completar. As amostras foram armazenadas em tubos de ensaio envolvidos com papel alumínio e filme de PVC transparente sob refrigeração, até o momento da leitura. As amostras foram submetidas à leitura em espectrofotômetro. A absorbância (A) da clorofila a foi lida em 661,6 nm, clorofila b em 644,8 nm e dos carotenóides em 470 nm. As concentrações da clorofila a (Ca), da clorofila b (Cb) e dos carotenóides (C) foram obtidas pelas equações apresentadas a seguir: $Ca = 11,24 A_{661,6} - 2,04 A_{644,8}$; $Cb = 20,13 A_{644,8} - 4,19 A_{661,6}$; e $C = (1000 A_{470} - 1,90 Ca - 63,14 Cb)/214$.

Os conteúdos de clorofilas e de carotenóides dos tecidos foram expressos em mg do pigmento por grama de massa fresca.

IV.5) Atividades enzimáticas da redutase do nitrato (RN), sintetase da glutamina (GS) e desidrogenase do glutamato (GDH-NADH)

Para cada tratamento foram utilizadas aproximadamente 2500 plantas por tratamento, sendo as coletas realizadas em 24 horas no primeiro dia e aos 90 dias. E aos seis meses, foi realizada apenas uma coleta. Foram analisadas, em cada coleta, as atividades enzimáticas da RN, GS e GDH-NADH, quantificações de amônio e nitrato endógeno, análises das proteínas totais solúveis e análises dos aminoácidos todas com início às 10 horas.

Ensaio enzimático da redutase do nitrato (RN)

A atividade da redutase do nitrato (RN) *in vivo* foi determinada de acordo com o método descrito por Jaworski (1971). As porções das folhas coletadas (38 plantas/tratamento por coleta) foram picadas em pequenos fragmentos de 1 a 2 mm de espessura, formando uma mistura composta de material fresco. Para cada porção, foi pesado 0,25 g de fragmentos de folha em triplicatas que foram depositados em tubos de ensaio adicionados de 6mL de uma solução de incubação. Essa foi constituída por tampão fosfato 0,1 M (pH 6,5), contendo 1 % de propanol e 25 mM de KNO_3 .

O tecido vegetal foi mantido submerso na solução de incubação e os tubos foram submetidos a vácuo para facilitar a infiltração da solução tampão nos tecidos; após esse procedimento, foi utilizado 1mL de cada tubo, que foi incubado na ausência de luz, o tempo zero foi obtido antes da incubação (quantidade de nitrito já existente na solução de incubação). Decorrido o período de incubação (90 minutos), a quantidade de íons nitrito, liberada no meio de infiltração, foi determinada em alíquotas de 1mL acrescidas de 0,3mL de

sulfanilamida 1% em HCl 3M e 0,3 mL de N-naftil-etileno-diamino a 0,2%. A determinação do nitrito produzido ocorreu 30 minutos (tempo de reação) após a adição desses reagentes às alíquotas. Findo esse período, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro a 540nm. A curva padrão foi feita utilizando-se o nitrito de sódio (NaNO_2). A atividade de RN foi expressa em $\text{nmol NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{MF}$.

Extração enzimática

A determinação da atividade da sintetase da glutamina (GS) foi determinada de acordo com o método *in vitro* descrito por Farnden & Robertson (1980) e Pérez-Soba *et al.* (1994), enquanto para a desidrogenase do glutamato dependente de NADH (GDH-NADH) a determinação foi realizada com base no método descrito por Cammaerts & Jacobs (1985).

Para cada um dos tratamentos, foram utilizadas 1,0 g de massa fresca foliar proveniente de uma amostra composta em triplicata de pequenos pedaços de várias plantas (155 plantas/tratamento por coleta). As amostras foram maceradas em almofariz com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Esse foi, então, transferido para tubos de centrifugação, previamente resfriados, aos quais foram acrescentados 5 mL de uma solução composta por tampão imidazol 0,05 M (pH 7,5) e ditioneitol (DTT) 5 mM. Essas amostras foram submetidas a uma centrifugação de 11.000 rpm a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi mantido a 4°C e utilizado para a determinação das atividades de GS e GDH, além da quantificação de proteínas solúveis.

Ensaio enzimático da sintetase da glutamina (GS)

O volume total da reação enzimática foi de 0,5 mL e era composta por: 0,1 mM de tampão imidazol pH 7,5, 49 mM de hidroxilamina, 40 mM de MgCl_2 , 192 mM de glutamato e 50 mM de ATP. A reação foi iniciada com a adição de 150 μL do extrato enzimático, e incubada por 90 minutos a 30°C e foi interrompida com a adição de 1 mL da solução de parada de reação, contendo: 0,37 M de cloreto férrico, 0,67 M de HCl e 0,20 M de ácido tricloroacético. Foram também preparados tubos correspondentes ao tempo zero da reação (T0), ou seja, nesses a adição da solução de parada de reação ocorreu em seguida à deposição do extrato, interrompendo, assim, a reação. O valor de absorbância do T0 foi descontado do valor da absorbância obtido para aqueles tubos que permaneceram sob incubação. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 540 nm. A curva padrão foi feita utilizando-se o γ -glutamil-hidroximato. A atividade de GS foi expressa em $\mu\text{mol de } \gamma\text{-glutamil-hidroximato} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{MF}$.

Ensaio enzimático da desidrogenase do glutamato (GDH-NADH)

A atividade da GDH-NADH foi quantificada por meio do consumo de NADH gasto na reação. O volume total da reação foi de 3 mL, sendo este constituído de tampão TRIS 0,1 M pH 8,2, 20 mM de 2-oxoglutarato, 150 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 mM de CaCl_2 e 0,14 mM NADH. Todos os tubos, contendo os reagentes, foram submetidos à agitação e, posteriormente, mantidos em banho-maria por 30 minutos a 30°C para que a reação se processe. A reação foi iniciada com adição de 500 μL do extrato enzimático aos tubos experimentais, sendo em seguida, agitados e lidos em espectrofotômetro a 340nm. Eles foram mantidos em banho-maria a 30°C e após 60 minutos do início da reação, foi realizada uma segunda leitura. A atividade de GDH foi expressa em nmol de $\text{NADH} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$.

IV.6) Quantificação de amônio e nitrato endógeno

Preparação do extrato vegetal

As folhas foram cortadas em pequenos fragmentos formando uma mistura heterogênea (76 plantas por coleta). Amostras de 0,5 g de massa fresca foram maceradas com nitrogênio líquido e, posteriormente, foram transferidos para tubos, aos quais foram acrescentados 2 mL de água ultra-purificada. Essas amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e utilizado nas quantificações de amônio e nitrato endógeno.

Quantificação de amônio endógeno

A quantificação do amônio foi determinada de acordo com a reação conhecida como fenol-hipoclorito (Weatherburn, 1967; Mccullough, 1967). Segundo metodologia do fenol-hipoclorito, dois reagentes foram utilizados: o reagente A e o reagente B. O primeiro foi constituído de fenol (10 g/L) e nitroprusside de sódio (50 mg/L), sendo que o segundo possui $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (53,7 g/L), hipoclorito de sódio (10-14% Cl_2) (10 ml/L) e NaOH (5 g/L). Em tubos de ensaio, foi aliquoteado 100 μL do extrato vegetal e foi adicionado 0,5 mL do reagente A e 0,5 mL do reagente B. Após uma vigorosa agitação, a mistura permanecerá em banho-maria a 37 °C por 35 minutos. Cada amostra foi lida no espectrofotômetro a 625 nm. A curva padrão foi feita utilizando-se o sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A quantificação de amônio foi expressa em $\mu\text{grama de } \text{NH}_4^+ \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$.

Quantificação de nitrato endógeno

A quantificação de nitrato foi realizada de acordo com o método descrito por Cataldo *et al.* (1975). Uma alíquota de 0,02 mL do extrato foi pipetada em um tubo de ensaio, ao qual foi adicionado 0,08 mL da solução de ácido salicílico 5% (p/v) diluído em H₂SO₄ concentrado. Após vigorosa agitação, os tubos permaneceram a temperatura ambiente por 20 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado lentamente 1,9 mL de NaOH 2N para elevar o pH a 12. Após atingir a temperatura ambiente, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 410 nm. A curva padrão foi feita utilizando-se o nitrato de potássio (KNO₃). A quantificação de nitrato foi expressa em µgrama de NO₃⁻.g⁻¹MF.

IV.7) Análises das proteínas totais solúveis

A concentração de proteínas solúveis foi determinada segundo o método de Bradford (1976), empregando a albumina bovina como padrão.

O sobrenadante foi utilizado nesta análise foi o mesmo nas análises da GS e GDH. Adicionaram-se às alíquotas de 0,1 mL de cada extrato, 5 mL de reagente Coomassie Blue (0,01 % de Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,7 % etanol e 8,5 % de ácido fosfórico). Após 5 minutos de reação, a absorbância da solução foi avaliada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. A curva padrão foi feita utilizando-se a albumina. A quantidade de proteínas solúveis foi expressa em µgrama de albumina.g⁻¹ MF.

IV.8) Análise dos aminoácidos totais

Extração dos aminoácidos totais

Os aminoácidos totais foram extraídos com a mistura de MCA (metanol: clorofórmio: água, 12:5:3, v/v/v) (Horta & Sodek, 1997). Amostras compostas contendo 1 g de folhaS (155 plantas/tratamento por coleta) foram maceradas em almofariz com nitrogênio líquido, adicionando 10 mL de MCA, durante 3 horas, quando os tubos foram agitados entre 3 a 4 vezes. Após esse tempo os tubos foram centrifugados (4600 rpm) por 20 minutos e em seguida 8 mL desse extrato foram retirados (e adicionados 3 mL de água e 2 mL de clorofórmio. Os tubos foram agitados e deixados em repouso. Uma hora depois, os tubos foram centrifugados (4600 rpm) durante 30 minutos. Aproximadamente 8 mL foram coletados da porção aquosa (superior) e a porção clorofórmica foi descartada. Para concentrar o extrato e remover resíduo de clorofórmio o extrato foi mantido em banho-maria a 40°C por 18 horas perdendo cerca de 20 a 25% do volume inicial. Posteriormente as amostras foram

retiradas do banho, e os tubos em que estavam contidas foram vedados e armazenados em freezer -20°C até as análises.

Determinação dos aminoácidos totais

Os AA foram determinados conforme método de Yemm & Cocking (1955). Extratos devidamente diluídos em água, padrão de leucina (30-150 nmol) e água (branco) em volume de 750 μL , em tubo de ensaio, foram acrescidos de 375 μL de tampão citrato 0,2 M pH 5,0; 150 μL do reativo de ninhidrina 5% em metil-celulose (éter monometílico de etilenoglicol) e 750 μL de KCN 0,01 M a 2% (v/v) também em metil-celulose.

Os tubos de ensaio foram agitados e transferidos para banho-maria a 100°C por 20 minutos. Em seguida, foram colocados no escuro até atingir a temperatura ambiente.

Posteriormente foi acrescentado etanol 60% (v/v), com volume suficiente para completar o volume para 3 mL e feita a agitação dos tubos. A densidade ótica dos padrões e amostras contra o branco, foi medida a 570 nm. . A curva padrão foi feita utilizando-se a leucina. A quantidade de aminoácidos foi expressa em nmol de leucina. g^{-1} MF.

IV.9) Experimento final (TF)

As plantas *A. imperialis* (aproximadamente 300 plantas) foram cultivadas no meio em que multiplicaram, para a propagação *in vitro* desta bromélia. Os brotos foram isolados e em seguida transferidos para frascos de 250 mL, contendo 40 mL de meio MS modificado que se mostrou o melhor para o crescimento das plantas (resultados T1, T2, T3) visando acelerar o crescimento desta espécie ameaçada de extinção. O momento da transferência foi quando os brotos estavam visíveis. Após um mês, os brotos foram analisados quanto: ao número de folhas; ao comprimento foliar e radicular; as massas fresca e seca das partes aérea e radicular e os pigmentos fotossintéticos.

IV.10) Microscopia de luz

As análises anatômicas foram realizadas no Núcleo de Pesquisa em Anatomia do Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo.

A escolha da concentração e da fonte nitrogenada do meio indutor e do controle foi baseada nos resultados obtidos após as análises bioquímicas.

As coletas foram realizadas aos 3,6,9, 12,15, 20, 25 e 30 dias após a transferência para os meios de cultura, foram coletados três indivíduos do tratamento de 30 mM de NH_4NO_3 (meio indutor – tratamento no qual as plantas apresentaram a maior taxa de multiplicação e sobrevivência) e, aos 3 dias de cultivo, três indivíduos do tratamento de 15 mM de NO_3^-

(controle – tratamento no qual as plantas se desenvolveram satisfatoriamente sem a formação de brotos) para o acompanhamento da ontogênese das gemas.

Também foram coletadas amostras das raízes dos indivíduos dos mesmos tratamentos citados anteriormente, ou seja, 15 mM de NO_3^- e 30 mM de NH_4NO_3 . Cada amostra foi dividida em região apical, mediana e basal para observação de possíveis diferenças estruturais.

Estas amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965), levadas a uma bomba de vácuo para retirada do ar contido nos tecidos e armazenadas em álcool etílico 70%. Em seguida, foram desidratadas em série etílica, infiltradas e incluídas em resina plástica (Leica Historesin). Os blocos obtidos foram seccionados ou transversalmente com 7 μm de espessura em micrótomo rotatório (Leica RM 2245). Posteriormente, os cortes foram corados com azul de toluidina 0,05% (Sakai, 1973) em tampão fosfato e citrato (McIlvaine, 1921) pH 4,5 e as lâminas permanentes foram montadas com resina sintética.

A captura de imagens digitais dos materiais preparados em lâminas foi realizada ao microscópio Olympus BX53 equipado com câmera de vídeo Olympus Q-Color 5, software Image-Pro Express 6.3 (Media Cybernetics). As escalas micrométricas foram obtidas nas mesmas condições ópticas utilizadas.

IV.11) Cultivo em ambiente controlado

Estabelecimento do cultivo em ambiente controlado a partir de sementes

Foram utilizadas trinta placas de Petri forradas com papel de filtro umedecido com água destilada, recebendo cada uma delas 50 sementes, que passaram pelo mesmo processo de desinfestação descrito no item “**III.2) Obtenção de plântulas *in vitro***”, e permaneceram em sala de cultura nas mesmas condições descritas no item citado anteriormente sendo regadas com água destilada semanalmente, até a obtenção de plântulas (45 dias).

Cultivo em ambiente controlado com diferentes fontes nitrogenadas

As plântulas germinadas nas placas de Petri foram transferidas para bandejas de isopor (40 plantas/ bandeja), sendo duas bandejas por concentração, contendo casca de *Pinus* sp. compostada como substrato. As bandejas foram adubadas semanalmente com as soluções das Tabelas 1,2 e 3, acrescidos de micronutrientes e tiamina do meio de cultura MS, porém não foi acrescentada as soluções o ágar e a sacarose

As plantas permaneceram em sala de cultura com fotoperíodo de 12 horas (das 5h00 às 17h00), radiação fotossinteticamente ativa de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$.

Foram analisadas no início da montagem experimental (tempo 0) e após três e seis meses, os seguintes parâmetros: número e comprimento das folhas, número e comprimento das raízes, massa fresca e seca da parte aérea e radicular e pigmentos fotossintéticos.

IV.12) Análise estatística

Para a análise dos dados foi utilizada a estatística descritiva, calculando-se o desvio padrão entre as médias obtidas. Os dados de biometria (número de folhas, comprimento das folhas e comprimento das raízes) e de massa, tanto fresca quanto seca, de pigmentos fotossintéticos, além das atividades enzimáticas da RN, GS e GDH, e das concentrações endógenas de amônio, nitrato, proteínas solúveis e aminoácidos totais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey a 5% de probabilidade.

V) RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.1) Crescimento *in vitro* e metabolismo do nitrogênio das plantas no tempo zero (T0)

Observou-se que as plantas crescidas *in vitro* no meio de germinação (água e sacarose 3%), apresentaram 1,85 cm, com cinco folhas, com a raiz medindo 1,68 cm e uma média de número de raízes de 3,30. A massa fresca (MF) e seca (MD) da parte aérea das plantas são em média 0,015 g/planta e 0,0013 g/planta, respectivamente, as raízes apresentaram 0,0096 g/planta de MF e 0,0004 g/planta de MD, por terem uma massa muito baixa de raízes, não foi possível realizar as coletas para os ensaios bioquímicos para este órgão da planta no T0. Em relação aos pigmentos fotossintéticos, as plantas apresentaram 0,579 mg.g⁻¹ MF de clorofila *a*, 0,264 mg.g⁻¹ MF de clorofila *b* e 0,140 mg.g⁻¹ MF de carotenóides, mostrando que mesmo sendo germinadas em meio de cultura sem adição de nutrientes, não apresentaram clorose, nem folhas senescentes (Figura 2) e não apresentaram mortalidade.



Figura 2: Aspecto da planta de *Alcantarea imperialis* após 45 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura contendo apenas água e sacarose 3%. Barra= 1 cm

Um fato interessante verificado nas plantas crescidas em T0 foram as altas atividades de GS e GDH, pois foram cultivadas na ausência de nutrientes, podendo inferir que mesmo não sendo visível, as plantas poderiam estar iniciando um processo de senescência, visto que germinaram em meio sem nenhuma fonte nutricional.

Este processo é caracterizado por grande catabolismo de proteínas, aminoácidos e de outros compostos inorgânicos para os tecidos mais jovens das plantas (Marschner, 2012).

As elevadas atividades de GS e GDH podem estar relacionadas com o fato de remobilização de nitrogênio, e a síntese de aminoácidos, como a glutamina, sendo transportados para as regiões mais jovens das plantas. De acordo com Masclaux *et al.*, (2001), que estudaram o metabolismo de nitrogênio em folhas de tabaco, observaram que com o envelhecimento das folhas, as atividades de GS-1 (citossólica) e da GDH aumentavam, além

de alta atividade proteolítica. Estes mesmos autores também sugerem que a GDH poderia estar atuando no sentido aminante, produzindo glutamato para toda a planta ou assimilando o amônio proveniente do catabolismo das proteínas.

Há outros trabalhos, como de Teixeira *et al.*, (2005) e Pageau *et al.*, (2006), que concluíram que as plantas em senescência apresentam o mesmo comportamento de *A.imperialis*, a diminuição de NR e aumento das atividades de GS e GDH.

Estes resultados foram importantes ao mostrar que as reservas das sementes já deviam estar, praticamente, esgotadas o que garantiria a não interferência de fontes nitrogenadas nos tratamentos utilizados no presente trabalho.

V.2) Metabolismo do nitrogênio com diferentes concentrações de amônio (NH_4^+) – 1 dia (24 horas)

As atividades da RN medidas nas folhas de *A. imperialis* cultivadas nas concentrações de 30 e 60 mM de NH_4^+ , apresentaram os maiores valores apenas nas primeiras 4 horas (Figura 3a), nas plantas recém transferidas para os tratamentos com diferentes concentrações de NH_4^+ , este aumento inicial da RN, pode estar relacionada a presença de uma RN constitutiva, que de acordo com Donato *et al.*, (2004), é expressada na ausência de nitrato, como ocorreu em *A.imperialis*, porém de acordo com Ferrario-Méry *et al.*, (2001), constatarem forte inibição na transcrição do gene para RN em altas concentrações de aminoácidos livres, sugerindo que como em 5 e 15 mM de amônio houve um incremento dos aminoácidos solúveis, isto pode ter inibido a atividade da RN, diminuindo sua atividade.

As atividades da GS medidas nas folhas crescidas na concentração de 30 mM de NH_4^+ apresentaram as maiores médias, durante quase toda a coleta de 24 horas, como se observa na Figura 3. Além disso, observou-se uma maior atividade da GS no final do período do escuro (na 16ª hora).

As atividades da GDH medidas nas folhas crescidas na concentração de 60 mM de NH_4^+ apresentaram as menores médias, durante toda a coleta de 24 horas em relação às demais concentrações utilizadas como se observa na Figura 3c. As plantas crescidas em 30 mM de NH_4^+ apresentaram os maiores valores durante quase todo o período de coleta de 24 horas, apenas com uma queda na 12ª hora após o início da transferência para os tratamentos, como se observa na Figura 3c.

Esta alta atividade de GS e GDH na 16ª hora, talvez esteja relacionada a concentração endógena de amônio nos tecidos foliares, pois quando há diminuição dos níveis endógenos,

há retomada da absorção deste íon, o que explicaria a alta atividade das enzimas, isto foi observado por Takahashi (2013), para a bromélia *Vriesea gigantea* Gaud.

Nas plantas cultivadas em 60 mM de NH_4^+ , foram observadas as menores médias nas atividades das duas enzimas analisadas (Figura 3b e 3c), sugerindo um grau de toxidez para a planta quando submetidas a esta concentração. Segundo Taiz & Zeiger (2013), quando os minerais estão presentes em excesso no solo, este se torna salino e o crescimento das plantas, de um modo geral, é reduzido. No estresse salino a água é osmoticamente retida na solução salina, de forma que quanto maior a concentração dos sais a água se torna cada vez menos disponível, tendo os mesmos efeitos que o estresse hídrico por déficit, entre os efeitos está a redução no crescimento e na fotossíntese, devido ao fechamento dos estômatos (Taiz & Zeiger, 2013).

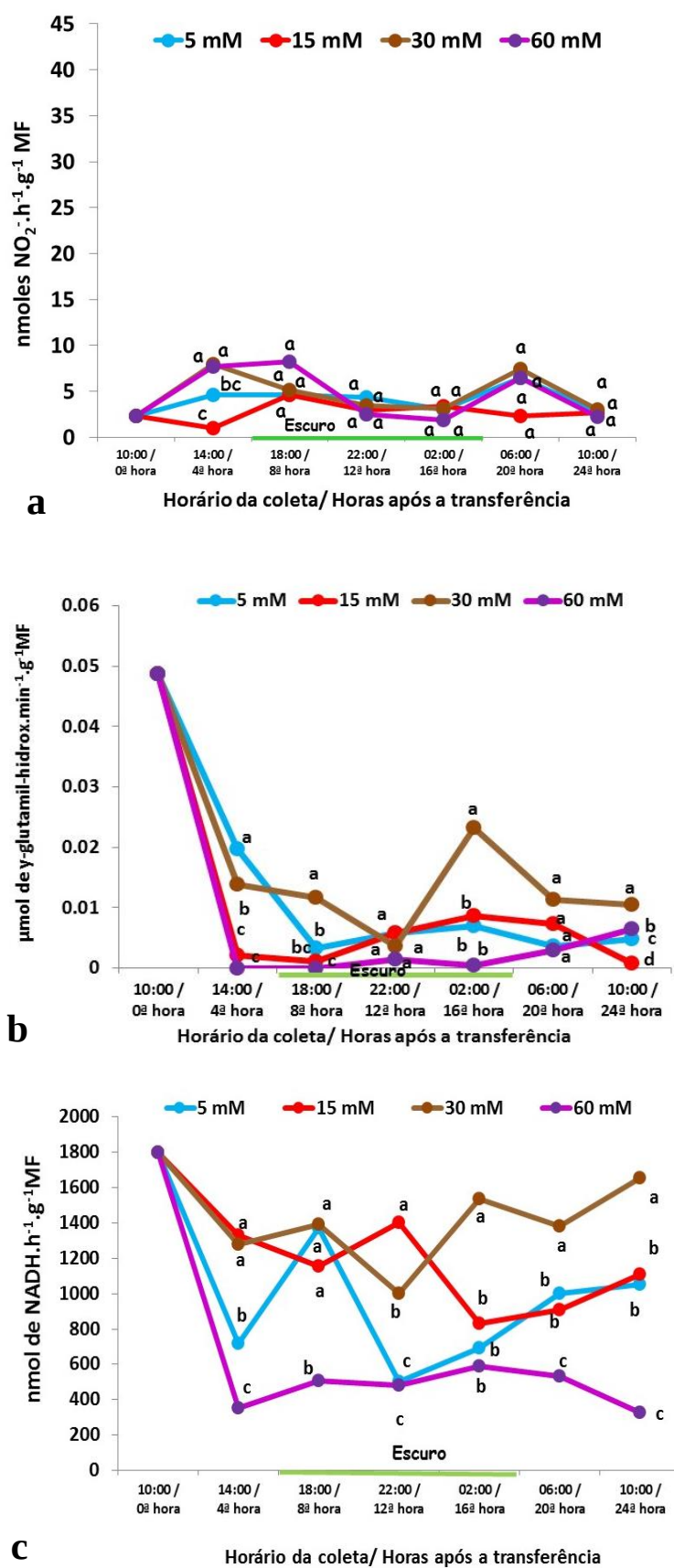


Figura 3: Atividade *in vivo* da redutase do nitrato (RN) (a), atividade *in vitro* da sintetase da glutamina (GS) (b) e da desidrogenase do glutamato (GDH-NADH) (c) durante o ciclo diurno e noturno (24 horas) nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms no tempo zero de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de amônio (NH_4^+). A barra verde indica o período noturno de coleta. A atividade enzimática da RN foi expressa em $\text{nmol NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$, da GS foi expressa em $\mu\text{mol de } \gamma\text{-glutamyl-hidrox} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$ e da GDH-NADH foi expressa em $\text{nmol de NADH} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas em 5% de probabilidade pelo teste Tukey dentro de um mesmo tempo de coleta.

Adicionalmente, as análises em 24 horas permitiram observar oscilações nas atividades das enzimas, não prejudicando as análises se as coletas tivessem sido realizadas apenas em um determinado horário. De acordo com Nievola & Mercier (2001), entender a variação do ciclo diurno das enzimas, para se determinar o melhor horário de coleta, fazendo coincidir com o período de máxima atividade das enzimas é necessário nas análises enzimáticas.

A quantidade endógena de amônio nas folhas cultivadas na concentração de 15 mM de NH_4^+ foi maior durante, praticamente, todo o período de coleta, como se observa na Figura 4, e em 60 mM de NH_4^+ foi menor (Figura 4a), ou seja, quando é fornecido apenas NH_4^+ há um limite que a planta absorve.

A quantidade endógena de nitrato nas folhas cultivadas nas concentrações de 15 e 60 mM de amônio foi maior na 4ª hora, seguida das plantas crescidas em 60 e 5 mM de NH_4^+ (Figura 4b). Na 8ª hora e 16ª hora após o início da transferência para os tratamentos, não observou diferenças entre os tratamentos. Porém na 12ª hora as plantas em 60 mM de NH_4^+ apresentaram as maiores quantidades de nitrato (Figura 4b). Já na 20ª e 24ª hora, as plantas crescidas em 15 e 30 mM de amônio apresentaram a maior quantidade do composto analisado. Apesar destas pequenas oscilações nas quantidades endógenas de nitrato, vale ressaltar que elas ficaram abaixo da quantidade no tempo zero, sugerindo serem resquícios dos teores endógenos das sementes.

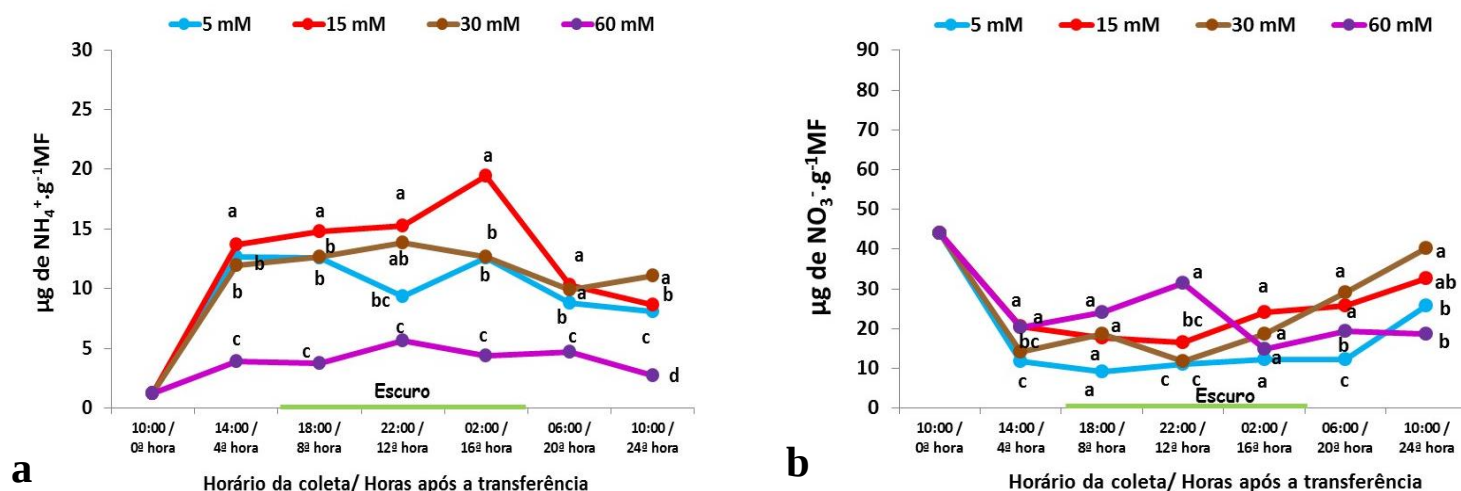


Figura 4: Quantidade de amônio (a) e nitrato (b) endógeno durante o ciclo diurno e noturno (24 horas) nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms no tempo zero de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de amônio (NH_4^+). A barra verde indica o período noturno de coleta. A quantidade de amônio foi expressa em $\mu\text{grama de } \text{NH}_4^+ \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$ e de nitrato foi expressa em $\mu\text{grama de } \text{NO}_3^- \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas em 5% de probabilidade pelo teste Tukey dentro de um mesmo tempo de coleta.

As quantidades de proteínas solúveis medidas nas folhas de *A. imperialis* foram menores nas plantas cultivadas na concentração de 60 mM de NH_4^+ , durante toda a coleta de 24 horas (Figura 5a).

Em geral, a quantidade de proteínas medidas nas folhas crescidas na concentração de 5 mM de NH_4^+ apresentaram as maiores médias, durante quase toda a coleta de 24 horas, como se observa na figura 5a, sugerindo certa remobilização do N frente ao baixo fornecimento de N às plantas.

As análises de aminoácidos totais nas folhas de *A. imperialis* mostraram que na 4ª hora após a transferência, não se observou diferenças significativas, porém na 8ª hora as plantas cultivadas em 15 e 60 mM de amônio apresentaram as maiores quantidades de aminoácidos. Porém na 12ª hora, em 15 e 30 mM de amônio as plantas apresentaram as maiores quantidades do composto analisado, tendo uma queda brusca na 16ª hora após o início da transferência (Figura 5b). Na 20ª e 24ª horas as plantas cultivadas nos tratamentos de 5 e 15 mM de amônio apresentaram as maiores quantidades (Figura 5b). Apesar das oscilações observadas ao longo de 24h na quantidade de aminoácidos endógenos, de modo geral, os teores ficaram abaixo da quantidade no tempo zero.

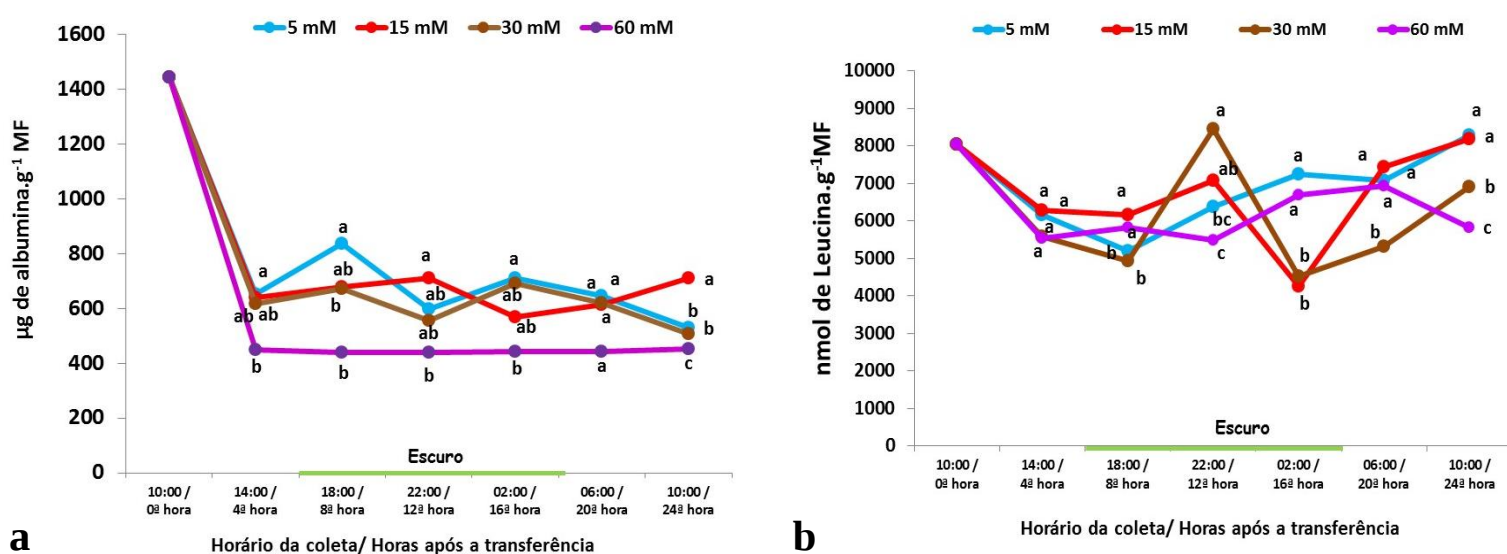


Figura 5: Proteínas solúveis (a) e aminoácidos totais (b) durante o ciclo diurno e noturno (24 horas) nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms no tempo zero de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de amônio (NH_4^+). A barra verde indica o período noturno de coleta. A quantidade de proteínas foi expressa em $\mu\text{grama de albumina.g}^{-1}\text{ MF}$ e de aminoácidos foi expressa em $\text{nmol de leucina.g}^{-1}\text{ MF}$. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas em 5% de probabilidade pelo teste Tukey dentro de um mesmo tempo de coleta.

V.3) Metabolismo do nitrogênio com diferentes concentrações de nitrato (NO_3^-) – 1 dia (24 horas)

As atividades da RN medidas nas plantas de *A. imperialis* cultivadas em diferentes concentrações de NO_3^- são mostradas na figura 5a onde se vê que as plantas cultivadas em 30 e 60 mM de NO_3^- apresentaram, de modo geral, menores atividades da RN do que nas plantas crescidas nas concentrações de 5 e 15 mM de NO_3^- (Figura 6a), sugerindo que concentrações altas podem estar sendo tóxicas às plantas (Li *et al.*, 2013).

Já a atividade da RN com 15 mM de NO_3^- na 4ª hora foi cerca de 14,6 vezes maior do que a atividade no tempo zero, pois de acordo com Carvalho *et al.* (2006), ao cultivarem *Vernonia herbacea* em diferentes fontes de nitrogênio, observaram que na presença de nitrato houve um aumento na atividade RN, mostrando que de com Stewart and Schmidt (1998), quando há uma aumento da disponibilidade de nitrato há um incremento da atividade de RN.

As atividades da GS medidas nas folhas de crescidas na concentração de 15 mM de NO_3^- apresentaram as maiores médias, após a 12ª hora, como se observa na figura 6b, mas ainda foram menores do que no tempo zero.

Em relação às atividades da GDH medidas nas folhas crescidas na concentração de 15 mM de NO_3^- as plantas apresentaram as maiores médias, durante quase toda a coleta de 24 horas em relação às demais concentrações utilizadas como se observa na figura 6c, mas tal como para GS, as atividades da GDH, na presença de apenas nitrato, foram baixas em comparação ao tempo zero, mesmo com 15 mM de NO_3^- .

Comparando-se com o tratamento com amônio (Figura 3c), apesar da atividade da GDH ser maior em 15mM de N na forma de nitrato, esta ficou quase 50% menor do que a atividade em 15mM de N na forma de amônio.

De acordo com os resultados, a maior atividade de RN foi na 16ª hora, de forma interessante, houve um aumento da atividade de GS, na 20ª hora, isto deve estar relacionado com a alta produção de amônio pela RN, o qual deve ter sido, rapidamente, assimilado pela GS, uma vez que em altas concentrações podem causar toxicidade aos tecidos vegetais (Kerbaudy, 2008), o qual pode causar clorose foliar, diminuição no crescimento da planta, acidificação do pH citossólico, alteração na absorção de outros nutrientes e no metabolismo de carboidratos e desequilíbrio hormonal (Setién *et al.*, 2014).

Após este período, observa-se que as atividades de RN têm uma queda, isto pode estar relacionado a grande produção de glutamina pela GS, que segundo Glass *et al.* (2002), altas concentrações de glutamina atuam como sinais de inibição para o transporte de nitrato.

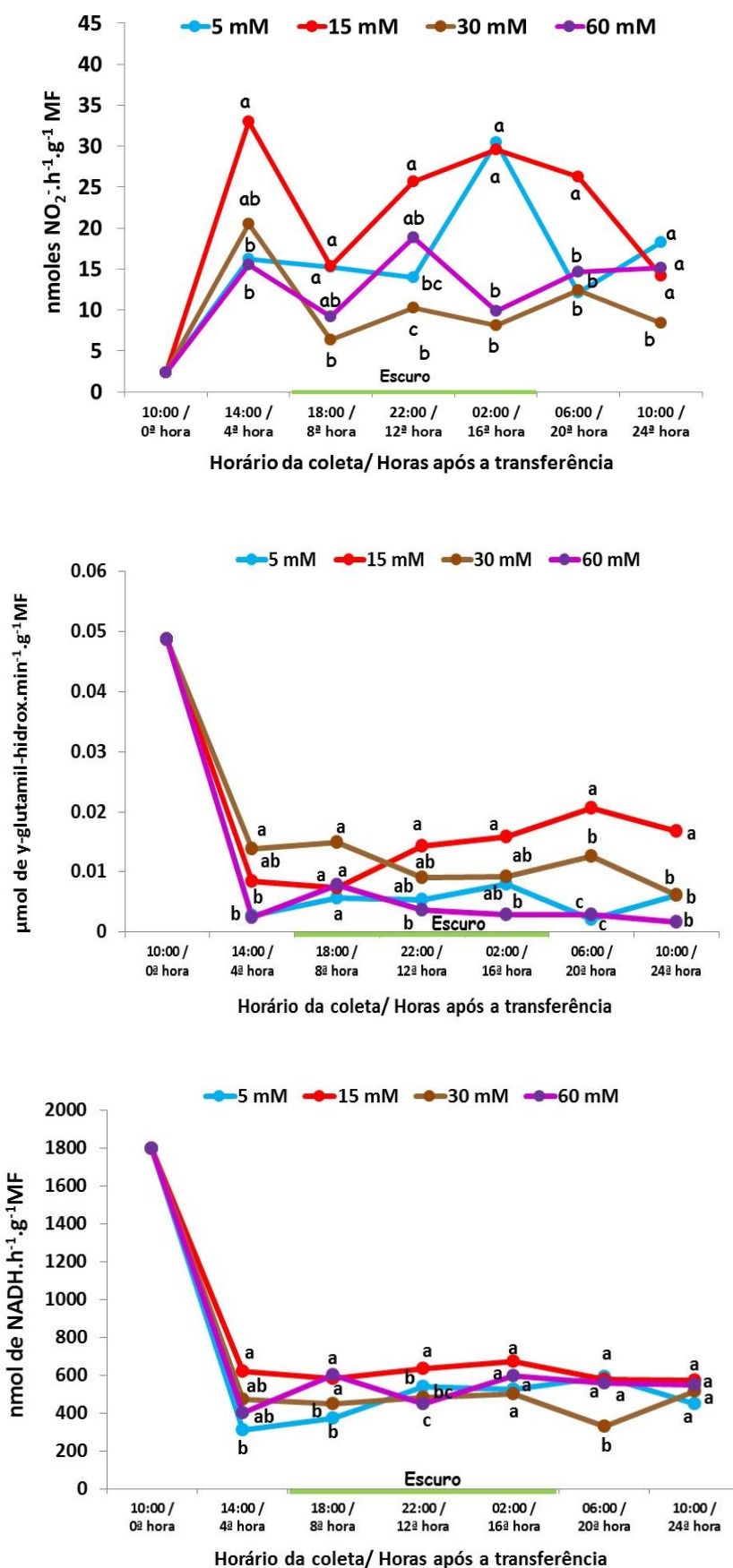


Figura 6: Atividade *in vivo* da redutase do nitrato (RN) (a), atividade *in vitro* da sintetase da glutamina (GS) (b) e da desidrogenase do glutamato (GDH-NADH) (c) durante o ciclo diurno e noturno (24 horas) nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms no tempo zero de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de nitrato (NO_3^-). A barra verde indica o período noturno de coleta. A atividade enzimática da RN foi expressa em $\text{nmoles NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$, da GS foi expressa em $\mu\text{mol de } \gamma\text{-glutamyl-hidrox} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$ e da GDH-NADH foi expressa em $\text{nmol de NADH} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas em 5% de probabilidade pelo teste Tukey dentro de um mesmo tempo de coleta.

As plantas crescidas em diferentes concentrações de NO_3^- apresentaram, de modo geral, quantidades de amônio constantes entre os tratamentos (Figura 7a), porém maiores que as quantidades observadas no T0, isto pode estar relacionada com a maior atividade da RN, que de acordo com Shan *et al.* (2012), o produto final da redução do nitrato pelas enzimas RN e redutase do nitrito é o NH_4^+ .

As plantas cultivadas na concentração de 15 mM de NO_3^- , tinham as maiores quantidades de nitrato endógeno (Figura 7b) na 4ª hora.

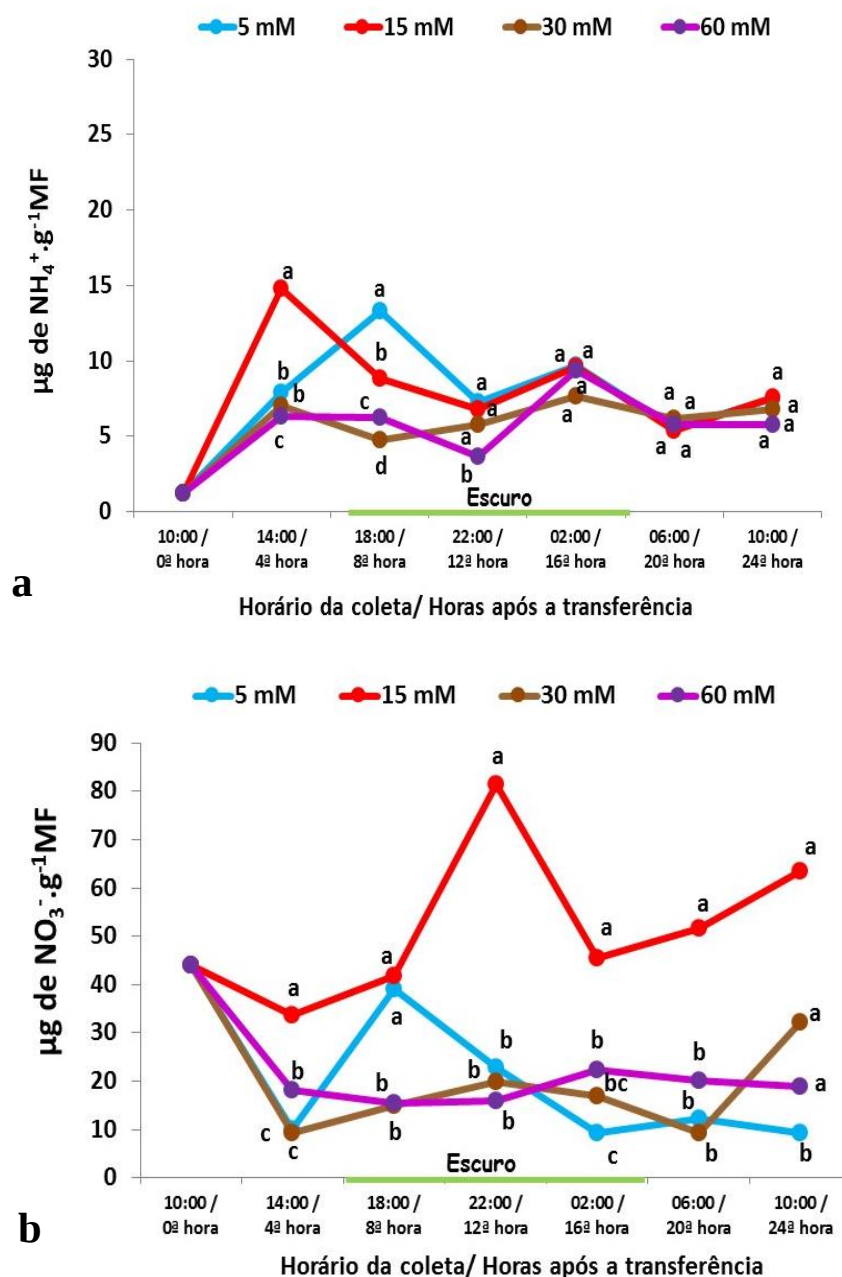


Figura 7: Quantidade de amônio (a) e nitrato (b) endógeno durante o ciclo diurno e noturno (24 horas) nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms no tempo zero de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de nitrato (NO_3^-). A barra verde indica o período noturno de coleta. A quantidade de amônio foi expressa em µgrama de NH_4^+ ·g $^{-1}$ MF e de nitrato foi expressa em µgrama de NO_3^- ·g $^{-1}$ MF. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas em 5% de probabilidade pelo teste Tukey dentro de um mesmo tempo de coleta.

Observa-se também que quando há queda de nitrato endógeno, há um aumento na atividade de GS, isto pode estar relacionado com a inibição do influxo de nitrato nas raízes, o que pode levar a alta produção de glutamina pela GS, que atuam como sinais de inibição para a transcrição dos genes de transportadores de nitrato (Glass *et al.*, 2002)

As quantidades de proteínas solúveis nas folhas crescidas nas concentrações de 15 e 30 mM de NO_3^- apresentaram as maiores médias, durante quase toda a coleta de 24 horas, como se observa na figura 8a. Além disso, observou-se uma menor quantidade no tratamento de 5 mM de NO_3^- durante todo o período de coleta.

As análises de aminoácidos totais nas folhas apresentados na Figura 8b mostram que as folhas no tratamento de 15 mM de NO_3^- apresentaram as maiores médias, exceto na 16^a hora. Além disso, observou-se uma menor quantidade no tratamento de 30 mM de NO_3^- durante, praticamente, todo o período de coleta.

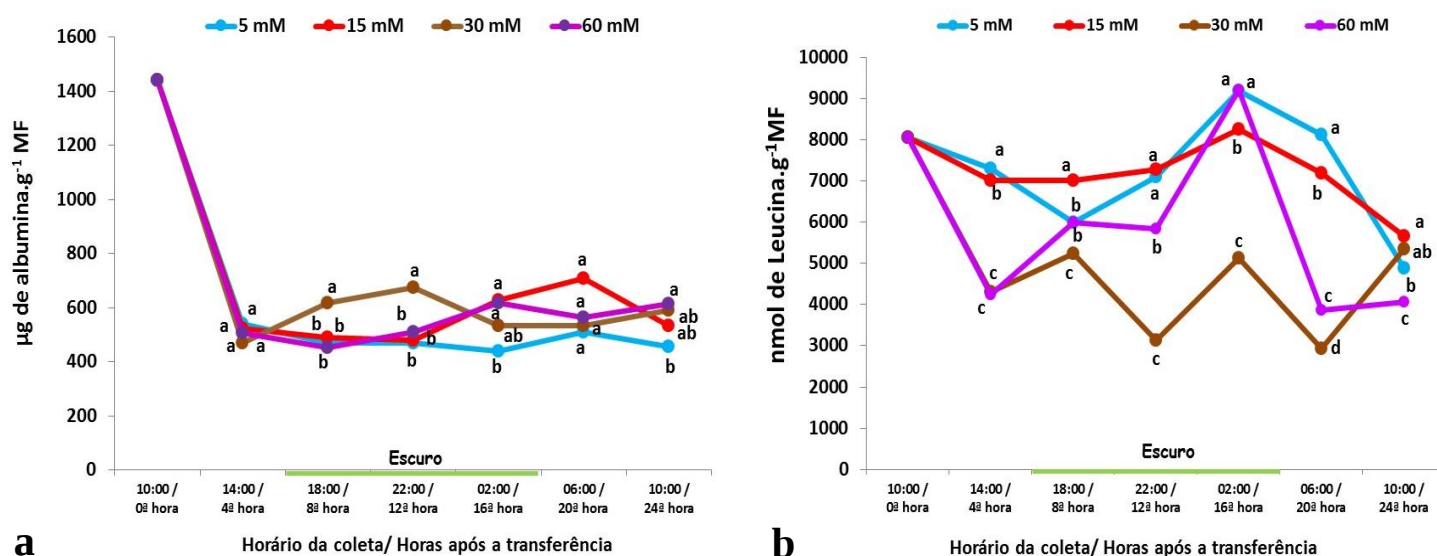


Figura 8: Proteínas solúveis (a) e aminoácidos totais (b) durante o ciclo diurno e noturno (24 horas) nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms no tempo zero de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de nitrato (NO_3^-). A barra verde indica o período noturno de coleta. A quantidade de proteínas foi expressa em $\mu\text{grama de albumina.g}^{-1}\text{MF}$ e de aminoácidos foi expressa em $\text{nmol de leucina.g}^{-1}\text{MF}$. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas em 5% de probabilidade pelo teste Tukey dentro de um mesmo tempo de coleta.

V.4) Metabolismo do nitrogênio com diferentes concentrações de nitrato de amônio (NH_4NO_3) – 1 dia (24 horas)

As atividades da RN medidas nas folhas de *A. imperialis* crescidas na concentração de 60 mM de NH_4NO_3 apresentaram as maiores médias e as plantas crescidas em 5 mM de NH_4NO_3 , apresentaram as menores atividades, durante quase toda a coleta de 24 horas, como se observa na figura 9a.

Isto pode estar relacionado com a alta disponibilidade de nitrato que pode interferir positivamente no aumento da atividade da RN, pois trata-se do substrato da enzima (Nievola & Mercier, 2001). Além disto, observa-se um aumento da atividade da RN no período noturno, que de acordo com Freschi *et al*, (2010) esta inversão pode ser uma estratégia para compensar o alto gasto energético para se reduzir o nitrato durante o dia, pois este pode ser insuficiente.

As atividades da GS medidas nas folhas cultivadas na concentração de 15 mM de NH_4NO_3 apresentaram as maiores médias durante quase toda a coleta de 24 horas (Figura 9b).

As atividades da GDH medidas nas folhas cultivadas nas concentrações de 5 e 30 mM de NH_4NO_3 foram maiores na 4ª hora, seguida das plantas crescidas em 15 e 60 mM de N (Figura 9b). Na 8ª hora após o início das coletas, observou-se de acordo com a figura 9c, que a menor atividade da enzima ocorreu em 60 mM de NH_4NO_3 quando comparada às demais concentrações. Na 12ª hora e na 16ª hora, as plantas em 30 mM de NH_4NO_3 apresentaram as menores atividades de GDH (Figura 9c). Já na 20ª hora, as plantas crescidas em 60 mM de NH_4NO_3 apresentaram a maior atividade da enzima estudada (Figura 9c).

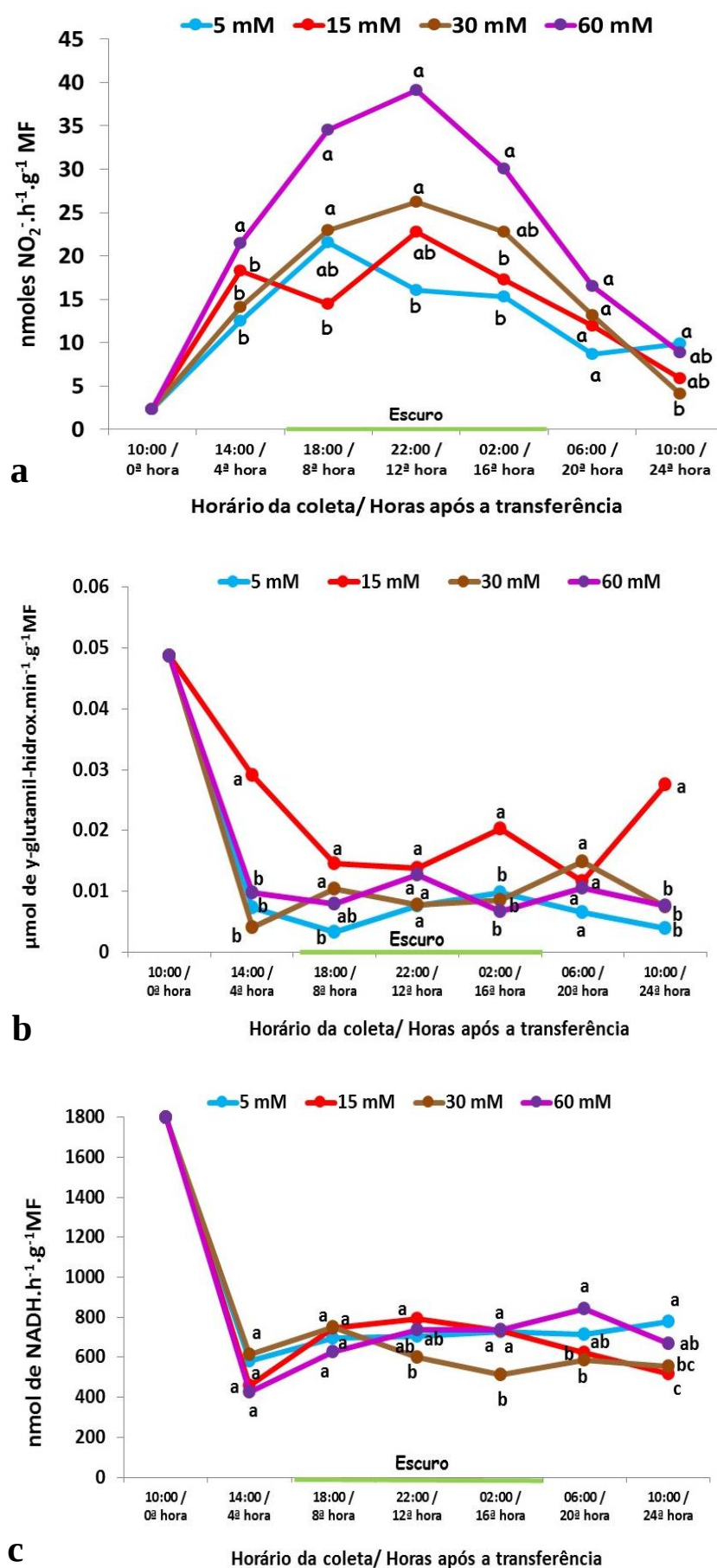


Figura 9: Atividade *in vivo* da redutase do nitrato (RN) (a), atividade *in vitro* da sintetase da glutamina (GS) (b) e da desidrogenase do glutamato (GDH-NADH) (c) durante o ciclo diurno e noturno (24 horas) nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms no tempo zero de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de nitrato de amônio (NH_4NO_3). A atividade enzimática da RN foi expressa em $\text{nmol NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$, da GS foi expressa em $\mu\text{mol de } \gamma\text{-glutamyl-hidrox} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$ e da GDH-NADH foi expressa em $\text{nmol de NADH} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas em 5% de probabilidade pelo teste Tukey dentro de um mesmo tempo de coleta.

As quantidades endógenas de amônio nas folhas cultivadas na concentração de 60 mM de NH_4NO_3 foram maiores durante todo o período de coleta (Figura 10a).

Em relação a quantidade endógena de nitrato, observa-se na Figura 10b, que as plantas cultivadas em 30 e 60 mM de NH_4NO_3 apresentaram as maiores quantidades do composto analisado.

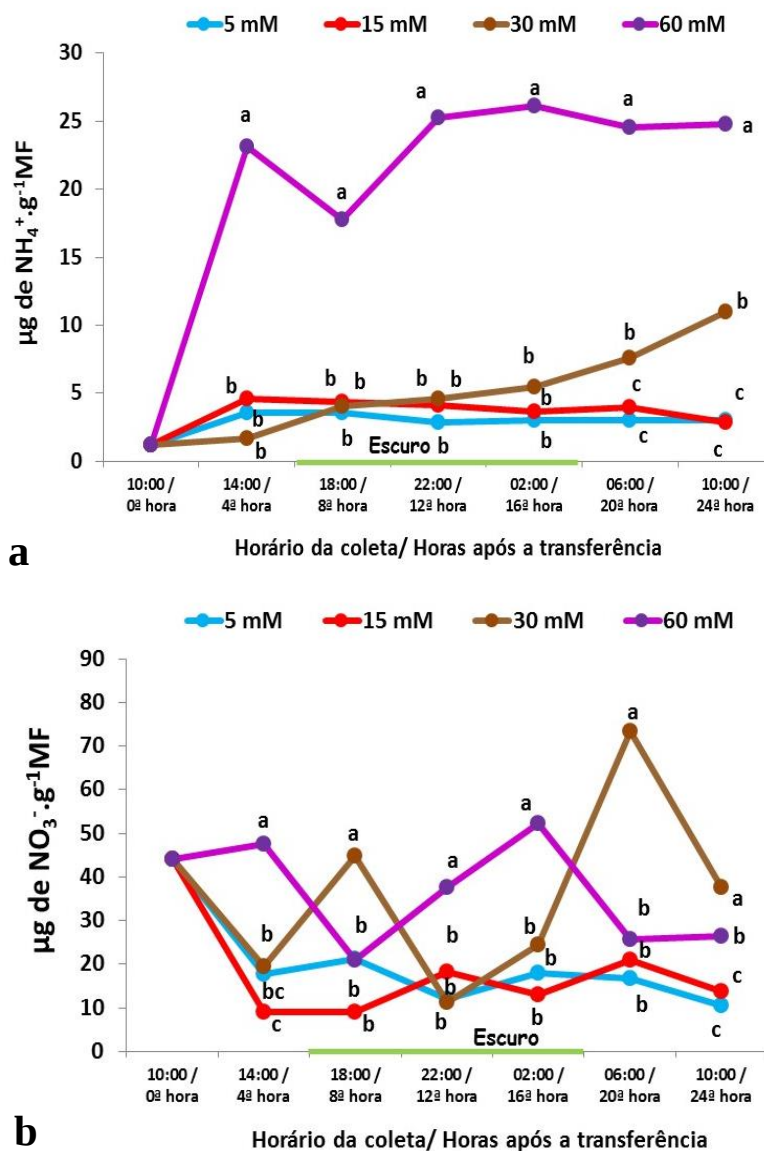


Figura 10: Quantidade de amônio (a) e nitrato (b) endógeno durante o ciclo diurno e noturno (24 horas) nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms no tempo zero de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de nitrato de amônio (NH_4NO_3). A barra verde indica o período noturno de coleta. A quantidade de amônio foi expressa em µgrama de NH_4^+ ·g $^{-1}$ MF e de nitrato foi expressa em µgrama de NO_3^- ·g $^{-1}$ MF. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas em 5% de probabilidade pelo teste Tukey dentro de um mesmo tempo de coleta.

As análises de proteínas solúveis nas folhas mostraram que durante toda coleta de 24 horas na concentração de 60 mM de NH_4NO_3 foram observados os maiores valores de proteínas solúveis (Figura 11a), exceto na 20ª hora, quando as plantas cultivadas em 30 mM de NH_4NO_3 apresentaram maior quantidade de proteínas solúveis (Figura 11a).

As análises de aminoácidos totais nas folhas não mostraram grandes diferenças entre as plantas cultivadas nas quatro concentrações de nitrato de amônio (Figura 11b).

Ao se observar os resultados, as plantas crescidas em 60 mM de NH_4NO_3 , mostraram uma grande atividade de RN, e consequentemente gerando uma maior quantidade de amônio endógeno em comparação às demais fontes nitrogenadas, que pode estar causando um estresse osmótico nas células. De acordo com Kalamaki *et al.*, (2009), em situação de estresse osmótico, as plantas produzem compostos que funcionam como protetores, como alguns aminoácidos, poliaminas e açúcares, que auxiliam na manutenção do turgor celular.

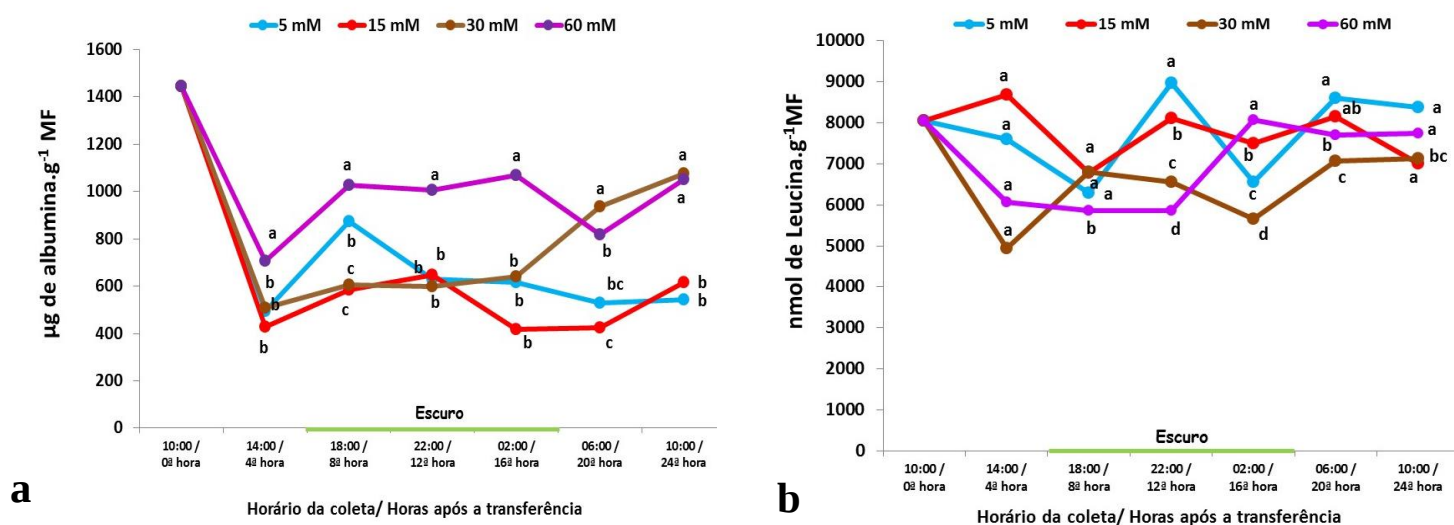


Figura 11: Proteínas solúveis (a) e aminoácidos totais (b) durante o ciclo diurno e noturno (24 horas) nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms no tempo zero de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de nitrato de amônio (NH_4NO_3). A barra verde indica o período noturno de coleta. A quantidade de proteínas foi expressa em μg de albumina.g⁻¹ MF e de aminoácidos foi expressa em nmol de leucina.g⁻¹ MF. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas em 5% de probabilidade pelo teste Tukey dentro de um mesmo tempo de coleta.

Ao comparar as três fontes nitrogenadas, em relação as atividades enzimáticas (Figuras 3, 6 e 9), as plantas crescidas em 60 e 15 mM de nitrato de amônio apresentaram a maior atividade da RN e GS, respectivamente, e estas atividades foram maiores do que nas plantas cultivadas somente com amônio ou somente com nitrato, sugerindo que as duas fontes de nitrogênio juntas aumentam o metabolismo nitrogenado das plantas, como foi observado para mandioca por Cruz *et al.* (2006) e para algodão (Kaneko *et al.*, 2013).

Em relação à atividade da GDH as maiores atividades foram observadas nas plantas cultivadas apenas com amônio em comparação com as demais fontes nitrogenadas utilizadas, sugerindo que, neste momento (plantas recém transferidas para o meio com amônio), a principal enzima assimiladora de nitrogênio é a GDH, pois sugere-se que há um excesso de amônio neste tratamento, pois de acordo com Takahashi (2013), a GDH assimila amônio, quando há altas concentrações deste ion.

Já em relação a análise de amônio e nitrato endógeno, observa-se que as plantas crescidas em 60 mM de nitrato de amônio e 15 mM de nitrato apresentaram os maiores valores de amônio e nitrato endógeno, respectivamente (Figuras 4,7 e 10). A maior quantidade de amônio endógeno encontrada nas plantas cultivadas na presença de nitrato de amônio em comparação ao tratamento com apenas amônio, deve-se, provavelmente, à assimilação do nitrato pela RN que gera amônio de acordo com Guimarães *et al.* (2014).

As plantas crescidas em 60 mM de nitrato de amônio apresentaram os maiores valores de proteínas solúveis em comparação às três fontes nitrogenadas utilizadas e as plantas cultivadas no tratamento de 5 mM de nitrato de amônio apresentaram os maiores valores de aminoácidos livres (Figuras 5, 8 e 11), também, em comparação às três fontes nitrogenadas utilizadas.

De modo geral, assim que as plantas foram transferidas para o meio nutritivo com nitrato de amônio, tiveram um aumento no metabolismo e um incremento em, praticamente, todos os compostos endógenos analisados.

V.5) Crescimento *in vitro* e metabolismo do nitrogênio das plantas com diferentes concentrações de amônio (NH_4^+) – 3 meses (90 dias)

Os resultados mostraram que nas concentrações de 15 e 30 mM de NH_4^+ as plantas cresceram mais e apresentaram-se com aspecto mais vigoroso (Figura 12). Apenas as plantas crescidas nas concentrações de 5 e 60 mM de NH_4^+ apresentaram mortalidade (44 % e 36 %, respectivamente). Não foi possível determinar o número de raízes nas plantas cultivadas em todos os tratamentos, pois estavam muito emaranhadas ou enoveladas.

O pH do meio de cultura foi de 5,8 para 2,0, esta acidificação do meio está relacionada com a absorção do íon amônio, pois quando isto ocorre há a liberação do H^+ para o meio a fim de manter o equilíbrio eletroestático entre os meios intra e extracelular (Ribeiro *et al.*, 2012) e esta acidificação do meio de cultura prejudica o crescimento das plantas, que de acordo com Epstein & Bloom (2006), esta diminuição do pH pode acarretar a diminuição de absorção de íons para as plantas, pois o pH influi nas membranas transportadores de íons das células epidérmicas e corticais das raízes.

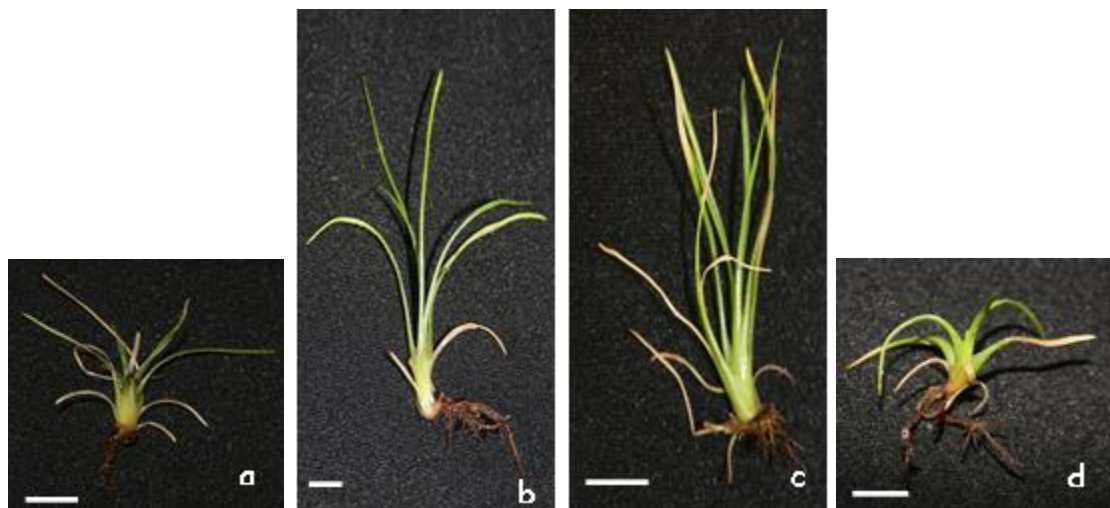


Figura 12: Aspectos das plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após três meses de crescimento *in vitro* nos diferentes tratamentos de amônio (NH_4^+). (a) Plantas cultivadas em 5 mM de NH_4^+ . (b) Plantas cultivadas em 15 mM de NH_4^+ . (c) Plantas cultivadas em 30 mM de NH_4^+ . (d) Plantas cultivadas em 60 mM de NH_4^+ . Barra = 1 cm.

Não se observou diferenças estatísticas no parâmetro número de folhas entre os tratamentos, porém no tratamento 5 mM de NH_4^+ ocorreu um maior número de folhas mortas ($6,75 \pm 1,94$) quando comparado aos demais tratamentos que em média apresentaram 5 folhas senescentes (Tabela 4).

Com relação ao comprimento da parte aérea (Tabela 4), as menores folhas ocorreram nas plantas cultivadas na concentração de 5 mM de NH_4^+ ($2,64 \pm 0,94$ cm) e as maiores folhas em 15 mM de NH_4^+ ($5,25 \pm 0,25$ cm). Em relação às massas fresca e seca observaram-se nas plantas crescidas em 60 mM de NH_4^+ tiveram os menores valores de médias (46 ± 13 mg/planta de MF e 5 ± 1 mg /planta de MD) (Tabela 4).

Tabela 4

Número de folhas, número de folhas mortas, comprimento da parte aérea (cm) e quantidades de massa fresca (MF) (mg), massa seca (MD) (mg) da parte aérea de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, após três meses de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de amônio (NH_4^+).

Parâmetros analisados	Tratamentos (mM de NH_4^+)			
	5	15	30	60
Número de folhas	6 a	6 a	5 a	5 a
Número de folhas mortas	7 a	5 b	5 b	5 b
Comprimento da parte aérea (cm)	2,64 d	5,25 a	4,12 b	3,04 c
Massa fresca (MF) da parte aérea por planta (mg)	78 b	97 a	80 b	46 b
Massa seca (MD) da parte aérea por planta (mg)	9 a	9 a	8 ab	5 b

Letras comparam os valores na horizontal e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nas análises dos pigmentos fotossintéticos (Figura 13), o menor valor de média de clorofila *a* foi observado na concentração de 60 mM de NH_4^+ , porém para a clorofila *b* e carotenóides não se observaram diferenças estatística.

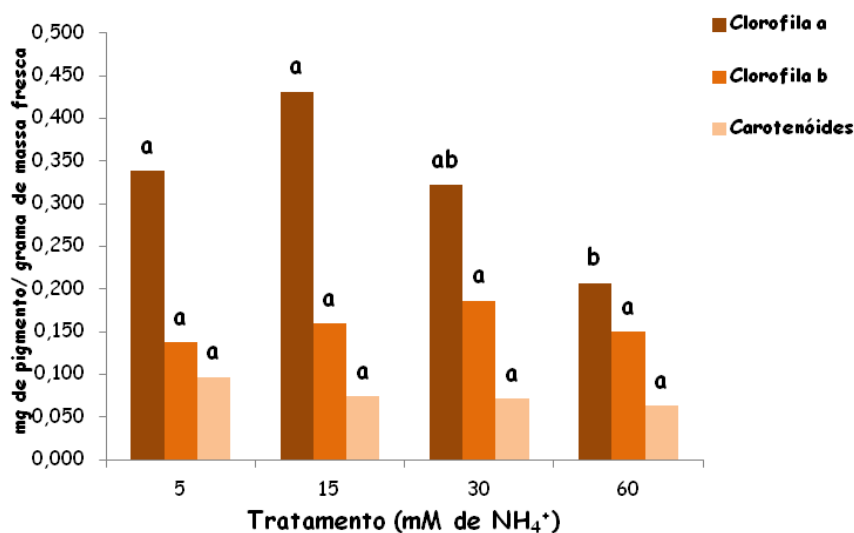


Figura 13: Quantidade de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b* e carotenóides) nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após três meses de cultivo *in vitro* nas concentrações 5,15,30 e 60 mM de amônio (NH_4^+). A quantidade de pigmento foi expressa em mg do pigmento por grama de massa fresca. Letras diferentes indicam que os dados são significativamente diferentes de acordo com o teste Tukey a 5 % de probabilidade para um mesmo pigmento.

De acordo com Prado (2008), em deficiência de N, há uma redução no crescimento das plantas, como foi observado em 5 mM de NH_4^+ , porém isto não afetou as quantidades de

pigmentos fotossintéticos, o que sugere que as plantas neste tratamento realocaram nitrogênio para as partes mais jovens das plantas, isto pode ser confirmado, pois foi neste tratamento que as plantas apresentaram as maiores quantidades de folhas mortas.

Quanto ao parâmetro comprimento da raiz (Tabela 5), na concentração de 5 mM de NH_4^+ (1,61±0,47 cm) as plantas tiveram os menores valores de médias.

Em relação às massas fresca e seca da parte radicular (Tabela 5), na concentração de 5 mM de NH_4^+ as plantas apresentaram as menores médias (7±2mg de massa fresca/planta e 0,7±0,1 mg de massa seca de raiz/planta).

Tabela 5

Comprimento da raiz (cm), quantidades de massa fresca (MF) (mg) e massa seca (MD) (mg) da raiz de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, após três meses de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de amônio (NH_4^+).

Parâmetros analisados	Tratamentos (mM de NH_4^+)			
	5	15	30	60
Comprimento da raiz (cm)	1,61 b	2,27 a	1,73 ab	1,90 ab
Massa fresca (MF) da raiz por planta (mg)	7 b	15 a	10 ab	12 ab
Massa seca (MD) da raiz por planta (mg)	0,7 b	1,7 ab	1,3 ab	1,8 a

Letras comparam os valores na horizontal e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resumindo, 15 mM de NH_4^+ do meio MS modificado promoveram um aumento no crescimento *in vitro* de plantas de *A. imperialis* cultivadas por 3 meses. Lembrando-se do objetivo do presente trabalho, em relação a multiplicação, nenhum tratamento com amônio induziu a brotação da espécie em estudo.

As análises aos três meses, foram importantes, pois foi neste periodo que se fez a transferência das plantas para novos meios de cultura, pois de acordo com Aoyama (2010), quando ocorre a transferência de plantas cultivadas *in vitro* para novos meios de cultura, há um aumento no crescimento das plantas, o que sugere uma mudança no metabolismo nitrogenado das mesmas.

As atividades da RN medidas nas folhas de *A. imperialis* cultivadas na concentração de 5 mM de NH_4^+ apresentaram o maior valor na 4ª hora, seguida das plantas crescidas em 15 mM de NH_4^+ (Figura 14a), sendo, relativamente, semelhantes às atividades da RN no primeiro dia de transferência na presença de apenas amônio, ou seja, menores do que nos tratamentos com nitrato e nitrato de amônio com 1 dia.

Uma possível hipótese para que as plantas crescidas nas diferentes fontes terem alta atividade da RN, na 4ª hora, pode ter sido o efeito da luz, pois nestes pontos, havia luz.

Experimentos realizados por Teixeira *et al.* (2013), mencionaram que em condições normais de ativação e na presença de luz, a ação da enzima redutase do nitrato (RN) seria da ordem de 70% a 90%, reduzindo-se para 10% a 30%, no escuro, isto pode estar relacionada com a diminuição das transcrições das famílias de genes NRT1 e NRT2, que codificam os transportadores de nitrato de baixa e alta afinidade, respectivamente (Okamoto *et al.*, 2003).

As atividades da GS medidas nas folhas de *A. imperialis* cultivadas na concentração de 60 mM de NH_4^+ apresentaram, praticamente, as maiores médias durante toda a coleta de 24 horas no terceiro mês de cultivo (Figura 14b).

Em relação à atividade de GDH observa-se que as plantas cultivadas em 60 mM de NH_4^+ , também, apresentaram as maiores médias durante toda a coleta de 24 horas (Figura 14c).

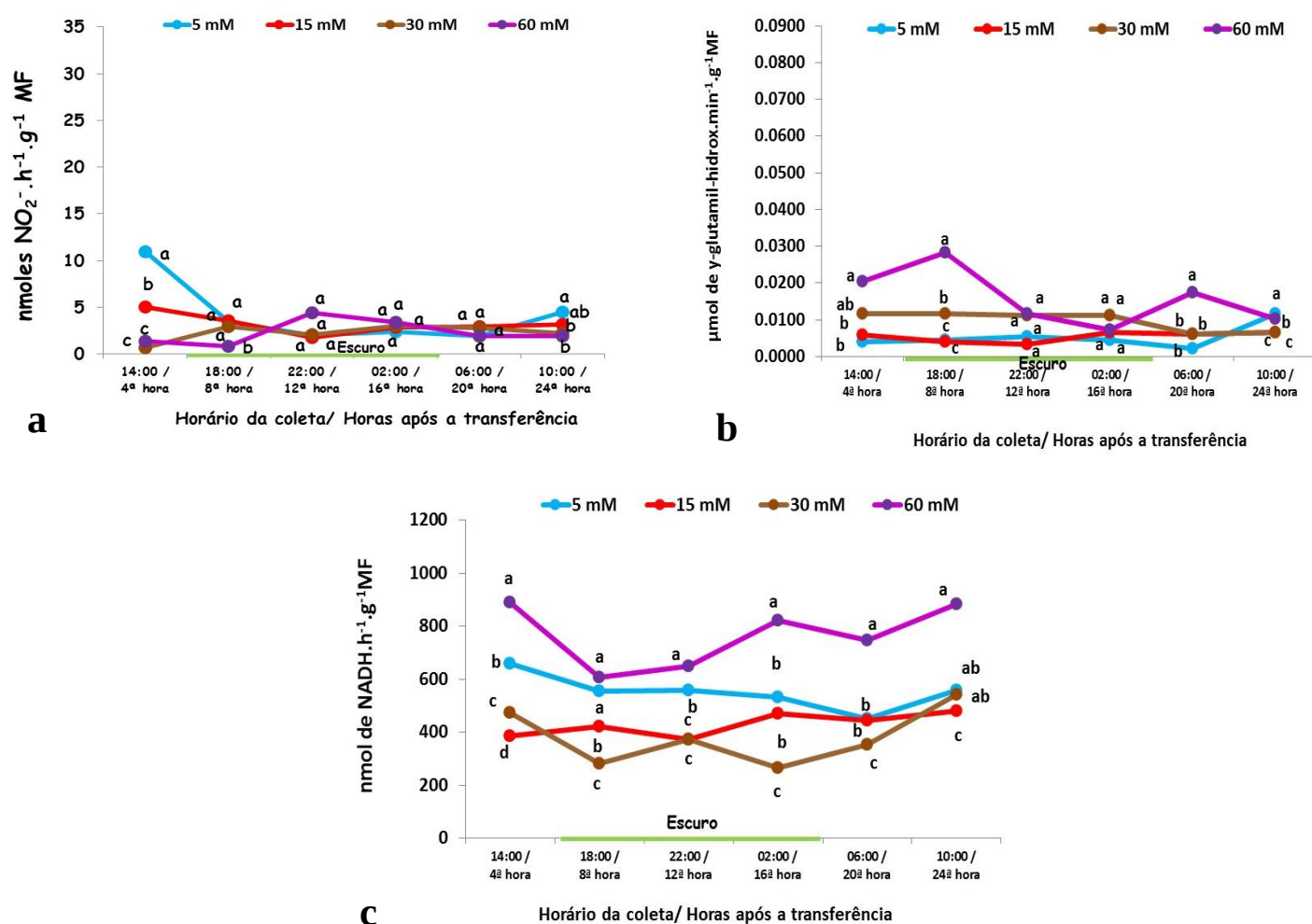


Figura 14: Atividade *in vivo* da redutase do nitrato (RN) (a), atividade *in vitro* da sintetase da glutamina (GS) (b) e da desidrogenase do glutamato (GDH-NADH) (c) durante o ciclo diurno e noturno (24 horas) nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms no terceiro mês de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de amônio (NH_4^+). A barra verde indica o período noturno de coleta. A atividade enzimática da RN foi expressa em nmoles $\text{NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$, da GS foi expressa em $\mu\text{mol de } \gamma\text{-glutamyl-hidrox} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$ e da GDH-NADH foi expressa em nmol de $\text{NADH} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas em 5% de probabilidade pelo teste Tukey dentro de um mesmo tempo de coleta.

A quantidade endógena de amônio nas folhas cultivadas na concentração de 60 mM de NH_4^+ foram maiores na durante todo o período de coleta (Figura 15a).

Em relação a quantidade endógena de nitrato, observa-se na Figura 15b, que as plantas cultivadas em diferentes concentrações de NH_4^+ não apresentaram grandes oscilações durante o período de 24 horas.

As plantas, cultivadas nos tratamentos que continham apenas amônio, foram capazes de absorver rapidamente esta fonte nitrogenada, como foi observado no tratamento de 60 mM de NH_4^+ , e mesmo com altas atividades de GS e GDH observou-se altas concentrações de amônio endógeno, neste caso as atividades destas duas enzimas pode ter se tornado insuficiente para manter as concentrações desse íon em níveis adequados para os tecidos foliares, corroborando com os altos níveis endógenos de amônio. E esta quantidade alta de amônio endógeno pode ter prejudicado o crescimento da planta.

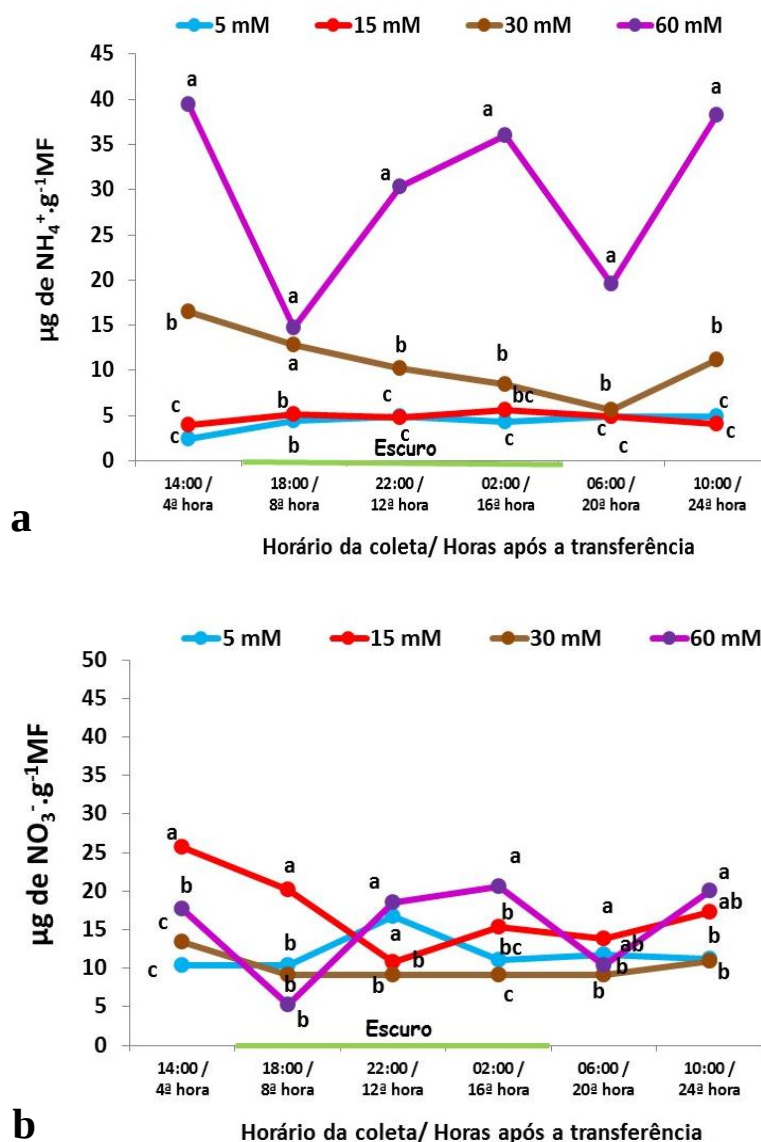


Figura 15: Quantidade de amônio (a) e nitrato (b) endógeno durante o ciclo diurno e noturno (24 horas) nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms no terceiro mês de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de amônio (NH₄⁺). A barra verde indica o período noturno de coleta. A quantidade de amônio foi expressa em µgrama de NH₄⁺·g⁻¹MF e de nitrato foi expressa em µgrama de NO₃⁻·g⁻¹MF. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas em 5% de probabilidade pelo teste Tukey dentro de um mesmo tempo de coleta.

As análises de proteínas solúveis medidas nas folhas foram maiores nas plantas cultivadas na concentração de 30 mM de NH₄⁺, durante toda a coleta de 24 horas no terceiro mês de cultivo (Figura 16a).

As análises de aminoácidos totais nas folhas mostraram que os tratamentos de 30 e 60 mM de amônio apresentaram as maiores médias, durante quase toda a coleta de 24 horas (Figura 16b).

Este aumento da quantidade de aminoácidos, pode ser um indicativo que as plantas cultivadas em 30 e 60 mM de amônio estão entrando em senescência, pois de acordo com Viégas *et al.* (2004), que estudaram a redução de nitrato em cajueiros cultivados em meio salinizado, observaram que os sintomas de senescência, estavam associados a reduções nos teores de clorofila totais e com aumentos nas concentrações de amônio, proteínas solúveis e aminoácidos livres totais.

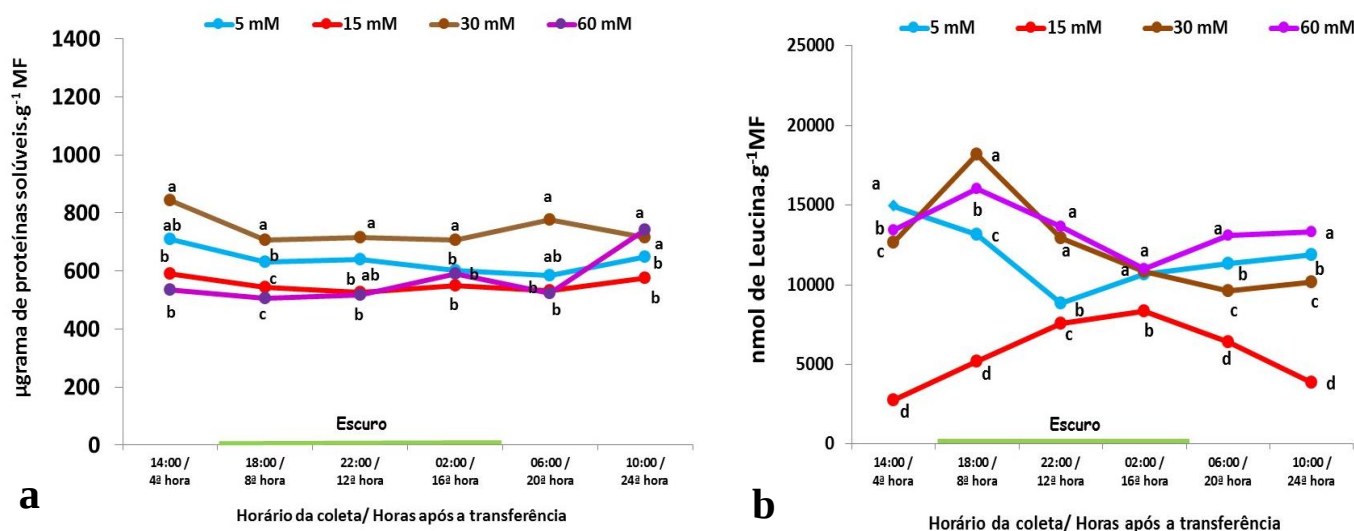


Figura 16: Proteínas solúveis (a) e aminoácidos totais (b) durante o ciclo diurno e noturno (24 horas) nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms no terceiro mês de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de amônio (NH_4^+). A barra verde indica o período noturno de coleta. A quantidade de proteínas foi expressa em μgrama de albumina. g^{-1} MF e de aminoácidos foi expressa em nmol de leucina. g^{-1} MF. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas em 5% de probabilidade pelo teste Tukey dentro de um mesmo tempo de coleta.

V.6) Crescimento *in vitro* e metabolismo do nitrogênio das plantas com diferentes concentrações de nitrato (NO_3^-) – 3 meses (90 dias)

Os resultados mostraram que nas concentrações de 15 e 30 mM de NO_3^- as plantas cresceram mais e apresentaram-se com aspecto mais vigoroso. Em nenhuma das concentrações se observou mortalidade das plantas (Figura 17). Não foi possível determinar o número de raízes, pois estavam muito emaranhadas ou enoveladas em todas as plantas cultivadas em todos os tratamentos. Neste meio de cultura não houve muita acidificação ao final de 3 meses de cultivo, pois o pH dos meios de cultura ficaram com 5,0.

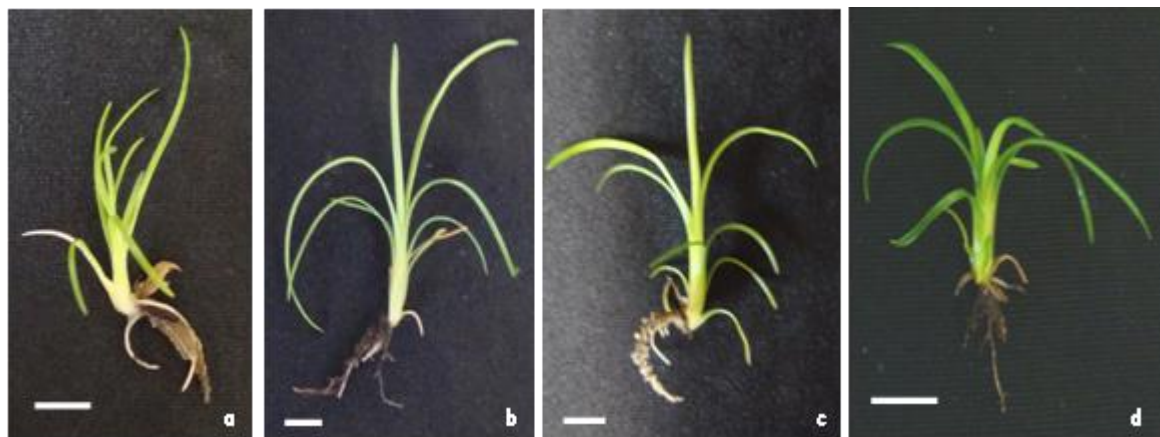


Figura 17: Aspectos das plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após três meses de crescimento *in vitro* nos diferentes tratamentos de nitrato (NO_3^-). (a) Plantas cultivadas em 5 mM de NO_3^- . (b) Plantas cultivadas em 15 mM de NO_3^- . (c) Plantas cultivadas em 30 mM de NO_3^- . (d) Plantas cultivadas em 60 mM de NO_3^- . Barra = 1 cm.

A quantidade de folhas foi menor nas plantas cultivadas na concentração de 5mM de NO_3^- . Com relação ao comprimento da parte aérea (Tabela 6), as menores folhas ocorreram nas plantas cultivadas na concentração de 5 e 60 mM de NO_3^- ($4,19 \pm 1,02$ cm e $3,78 \pm 0,48$ cm, respectivamente) e as maiores folhas em 15 e 30 mM de NO_3^- ($5,96 \pm 1,13$ cm e $5,50 \pm 0,40$ cm, respectivamente). Em relação às massas fresca e seca da parte aérea não se observou diferenças estatísticas entre as plantas cultivadas nos tratamentos utilizados.

Tabela 6

Número de folhas, comprimento da parte aérea (cm) e quantidades de massa fresca (MF) (mg) e massa seca (MD) (mg) da parte aérea de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, após três meses de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de nitrato (NO_3^-).

Parâmetros analisados	Tratamentos (mM de NO_3^-)			
	5	15	30	60
Número de folhas	7 b	9 a	9 a	8 ab
Comprimento da parte aérea (cm)	4,19 b	5,96 a	5,50 a	3,78 b
Massa fresca (MF) da parte aérea por planta (mg)	98 a	129 a	151 a	117 a
Massa seca (MD) da parte aérea por planta (mg)	8 a	11 a	13 a	11 a

Letras comparam os valores na horizontal e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nas análises dos pigmentos fotossintéticos (Figura 18), todos os tratamentos foram estatisticamente iguais, para clorofila *a* e carotenoides, porém para clorofila *b*, os maiores valores foram nas concentrações de 30 e 60 mM de NO_3^- .

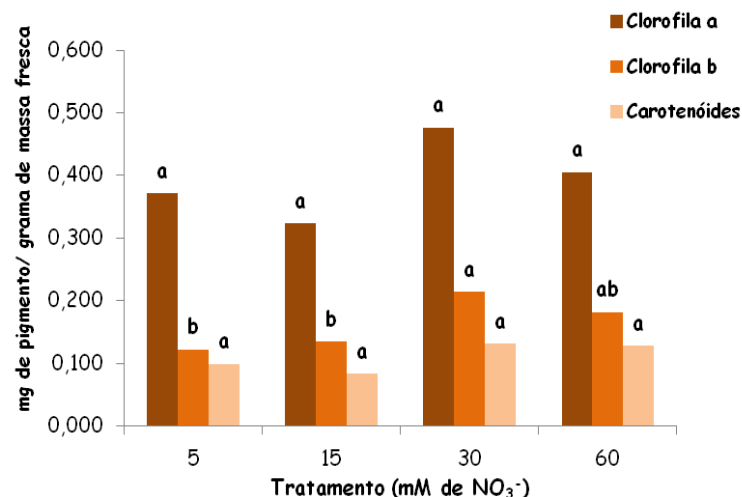


Figura 18: Quantidade de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b* e carotenóides) nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após três meses de cultivo *in vitro* nas concentrações 5,15,30 e 60 mM de nitrato (NO₃⁻). A quantidade de pigmento foi expressa em mg do pigmento por grama de massa fresca. Letras diferentes indicam que os dados são significativamente diferentes de acordo com o teste Tukey a 5 % de probabilidade para um mesmo pigmento.

Quanto ao parâmetro comprimento da raiz (Tabela 7), nas concentrações de 5 e 15 mM de NO₃⁻ (2,21±1,09 cm e 2,39±1,12 cm, respectivamente) as plantas tiveram as maiores raízes.

Em baixas concentrações de N (5 mM de NO₃⁻) houve um aumento no comprimento da raiz, que é comum em uma situação de baixa disponibilidade de N, como mostram Bonifas & Lindquist (2009) ao estudarem o efeito do fornecimento de N na morfologia de raízes de abútua (*Chondodendron platyphyllum* (Saint-Hilaire) Miers). Estes autores observaram que a diminuição da oferta de N altera a morfologia radicular das plantas de abútua, investindo uma parcela maior de sua biomassa na produção de raízes.

Além disto, Tamaki & Mercier (2007), ao estudarem a sinalização entre parte aérea e radicular em plantas de *A. comosus* cultivadas *in vitro* sem o N, observaram nas raízes um acúmulo de auxina (IAA), sugerindo que este hormônio pode estar sinalizando das folhas para as raízes a falta de N, e a auxina induz aumento radicular. Marschner (2012) e Davies (2010) mostraram que a auxina é uma das responsáveis pelo alongamento celular, e que as raízes são mais sensíveis a este hormônio, assim podendo induzir o alongamento das raízes em baixas concentrações de N. Assim, sob limitação de nitrogênio, o IAA pode fornecer o sinal que pode levar ao crescimento das raízes, o que provavelmente deve ter ocorrido com *A. imperialis* em baixas concentrações de N no presente trabalho.

Em relação às massas fresca e seca da parte radicular (Tabela 7), as menores médias foram encontradas na concentração de 60 mM de NO₃⁻ (7,9±0,2 mg/planta de MF e 1,0±0,4 mg/planta de MD).

TABELA 7

Comprimento da raiz (cm), quantidades de massa fresca (MF) (mg) e massa seca (MD) (mg) da raiz de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, após três meses de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de nitrato (NO_3^-).

Parâmetros analisados	Tratamentos (mM de NO_3^-)			
	5	15	30	60
Comprimento da raiz (cm)	2,21 a	2,39 a	1,29 b	1,01 b
Massa fresca (MF) da raiz por planta (mg)	33,7 a	32,5 a	18,8 ab	7,9 b
Massa seca (MD) da raiz por planta (mg)	3,7 a	2,7 a	2,5 ab	1,0 b

Letras comparam os valores na horizontal e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resumindo, observou-se que 15 e 30 mM de NO_3^- do meio MS modificado promoveram um aumento no crescimento *in vitro* de plantas de *A. imperialis* cultivadas por 3 meses, mas nenhum tratamento, utilizando apenas nitrato, induziu a brotação da espécie em estudo.

As atividades da RN medidas nas folhas crescidas na concentração de 30 e 60 mM de NO_3^- apresentaram os maiores valores, seguida das plantas crescidas em 15 mM de NO_3^- e 5 mM de NO_3^- (Figura 19a).

Na presença de altas concentrações de nitrato, a RN apresenta as maiores atividades, isto pode ser explicado por Solomonson & Barber (1990), que citaram que o aumento da atividade da RN em resposta ao incremento de substrato tem sido associado à síntese "de novo" da proteína, bem como à sua ativação. Este comportamento, também foi verificado por Santos *et al.* (2012), que estudaram a atividade da RN, em mudas de açaizeiro, com diferentes concentrações de nitrogênio, e verificam que o incremento deste nutriente aumentava a atividade da enzima.

As atividades da GS medidas nas folhas cultivadas em diferentes concentrações de nitrato não apresentaram diferenças significativas até a 20ª hora, porém na 24ª hora, as plantas da concentração de 60 mM de NO_3^- apresentaram os maiores valores (Figura 19b).

Em relação à atividade de GDH observa-se que as plantas cultivadas em 30 mM de NO_3^- apresentaram as maiores médias durante toda a coleta de 24 horas (Figura 19c).

As atividades da GS e GDH foram, relativamente, menores nas plantas cultivadas apenas com nitrato em relação às plantas cultivadas só com amônio, e a RN foi maior, o que é esperado, visto que só ocorreu o fornecimento de nitrato como fonte nitrogenada.

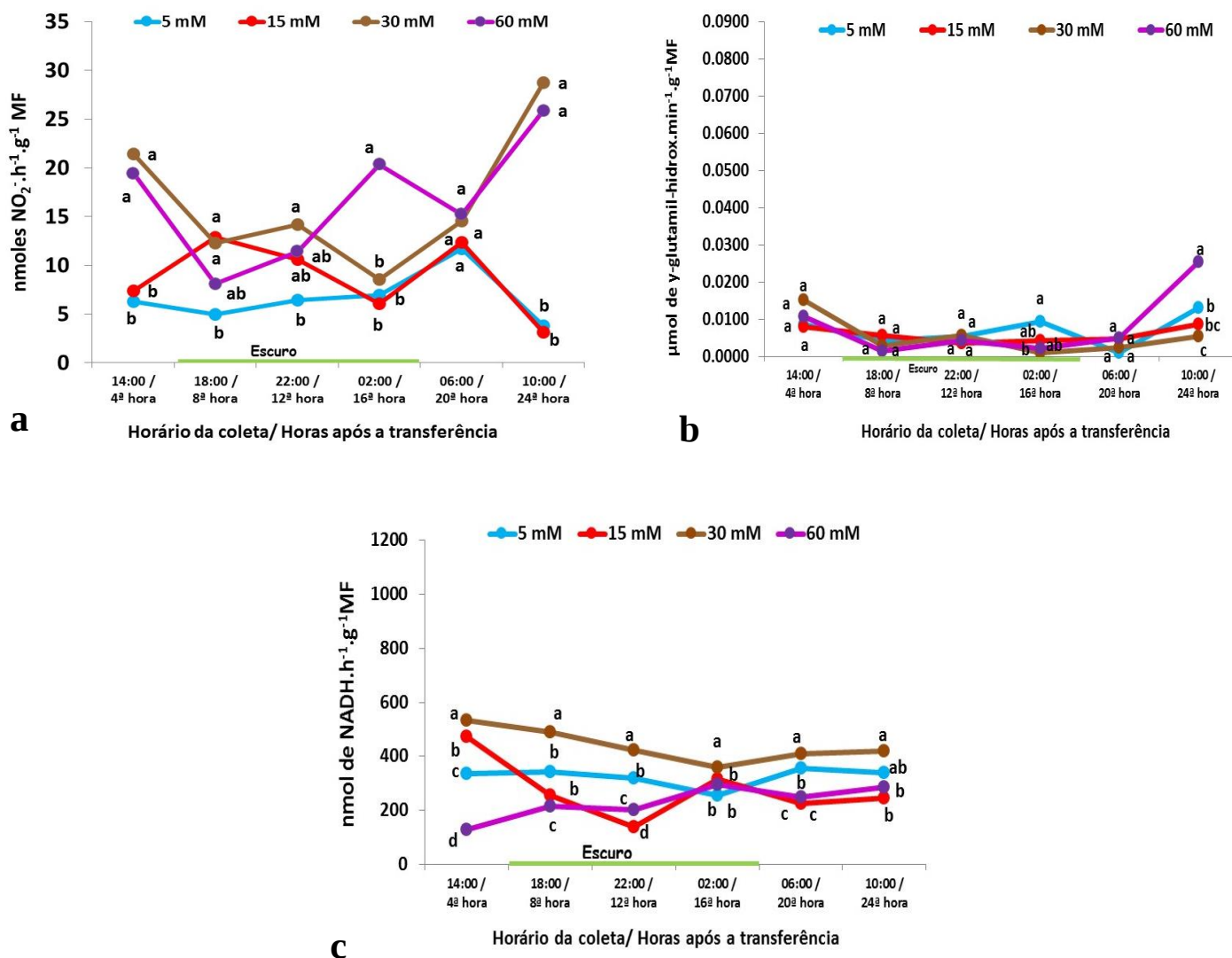


Figura 19: Atividade *in vivo* da redutase do nitrato (RN) (a), atividade *in vitro* da sintetase da glutamina (GS) (b) e da desidrogenase do glutamato (GDH-NADH) (c) durante o ciclo diurno e noturno (24 horas) nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms no terceiro mês de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de nitrato (NO_3^-). A barra verde indica o período noturno de coleta. A atividade enzimática da RN foi expressa em nmoles $\text{NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$, da GS foi expressa em $\mu\text{mol de } \gamma\text{-glutamyl-hidrox} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$ e da GDH-NADH foi expressa em nmol de NADH $\cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas em 5% de probabilidade pelo teste Tukey dentro de um mesmo tempo de coleta.

A quantidade endógena de amônio nas folhas cultivadas na concentração de 30 mM de NO_3^- foi menor na durante todo o período de coleta (Figura 20a), quase $\frac{1}{4}$ da quantidade máxima observada nas plantas cultivadas só com amônio (60 mM de amônio)

Em relação à quantidade endógena de nitrato, observa-se na Figura 20b, que as plantas cultivadas em 15 mM de NO_3^- apresentaram as maiores quantidades do composto analisado.

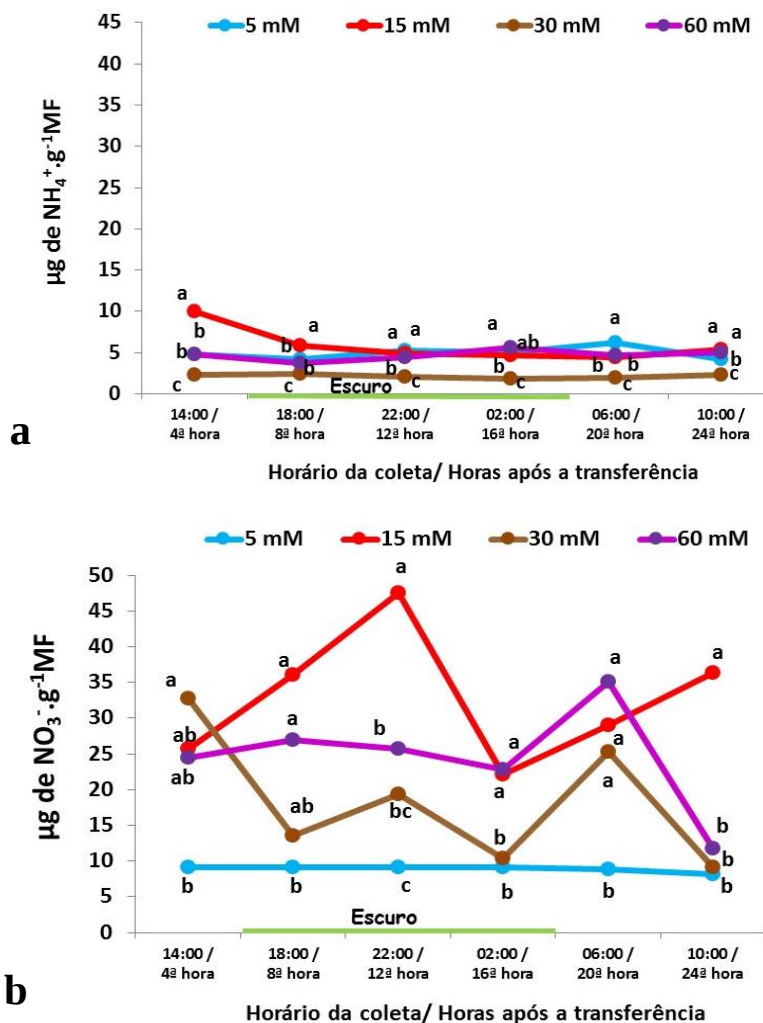


Figura 20: Quantidade de amônio (a) e nitrato (b) endógeno durante o ciclo diurno e noturno (24 horas) nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms no terceiro mês de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de nitrato (NO₃⁻). A barra verde indica o período noturno de coleta. A quantidade de amônio foi expressa em µgrama de NH₄⁺.g⁻¹MF e de nitrato foi expressa em µgrama de NO₃⁻.g⁻¹MF. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas em 5% de probabilidade pelo teste Tukey dentro de um mesmo tempo de coleta.

As análises de proteínas solúveis medidas nas folhas foram maiores nas plantas cultivadas na concentração de 30 mM de NO₃⁻, durante toda a coleta de 24 horas do terceiro mês de cultivo (Figura 21a). E esta quantidade de proteínas foi cerca de 1,7 vezes maior do que a observada nas plantas cultivadas apenas com nitrato por 24 horas, corroborando, novamente, com Solomonson & Barber (1990), que citaram que o aumento da atividade da RN em resposta ao incremento de substrato tem sido associado ao aumento na quantidade de proteínas.

As análises de aminoácidos totais nas folhas mostraram que as plantas crescidas no tratamento de 60 mM de nitrato apresentaram as maiores médias, durante quase toda a coleta de 24 horas (Figura 21b).

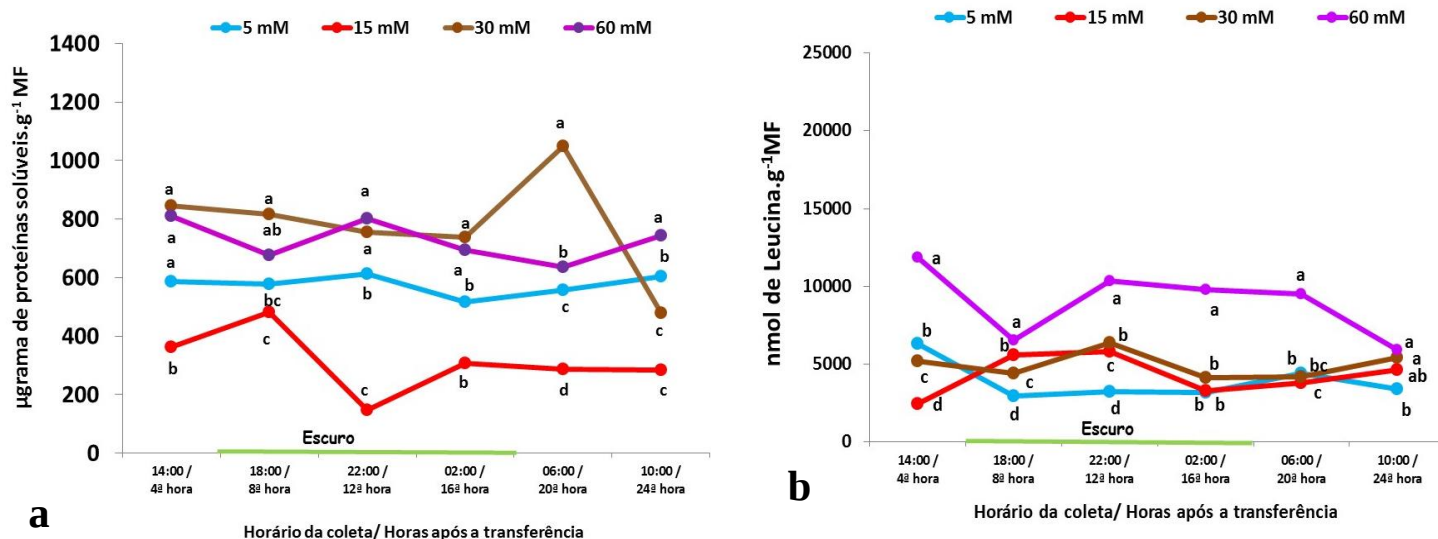


Figura 21: Proteínas solúveis (a) e aminoácidos totais (b) durante o ciclo diurno e noturno (24 horas) nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms no terceiro mês de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de nitrato (NO_3^-). A barra verde indica o período noturno de coleta. A quantidade de proteínas foi expressa em μg de albumina $\cdot \text{g}^{-1}$ MF e de aminoácidos foi expressa em nmol de leucina $\cdot \text{g}^{-1}$ MF. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas em 5% de probabilidade pelo teste Tukey dentro de um mesmo tempo de coleta.

V.7) Crescimento *in vitro* e metabolismo do nitrogênio das plantas com diferentes concentrações de nitrato de amônio (NH_4NO_3) – 3 meses (90 dias)

Os resultados mostraram que nas concentrações de 30 e 60 mM de NH_4NO_3 as plantas apresentaram um aspecto mais vigoroso quando comparadas as outras duas concentrações (Figura 21). Nestas duas concentrações, as plantas chegaram a apresentar quase o dobro do comprimento foliar do que as maiores plantas dos tratamentos só com amônio ou só com nitrato, sugerindo, novamente, que as duas fontes fornecidas juntas favorece o crescimento da bromélia em estudo. Em nenhuma das concentrações se observou mortalidade das plantas. As plantas crescidas em 30 mM de NH_4NO_3 multiplicaram, elas tiveram 25 % das plantas com a formação de um a dois brotos (Figura 22e). A visualização dos brotos ocorreu pouco antes dos 3 meses sob cultivo *in vitro*. Não foi possível determinar o número de raízes, pois estavam muito emaranhadas ou enoveladas em todas as plantas cultivadas em todos os tratamentos. Neste tratamento com nitrato de amônio não houve acidificação do meio de cultura, pois, o pH dos meios ficaram com 5,0.

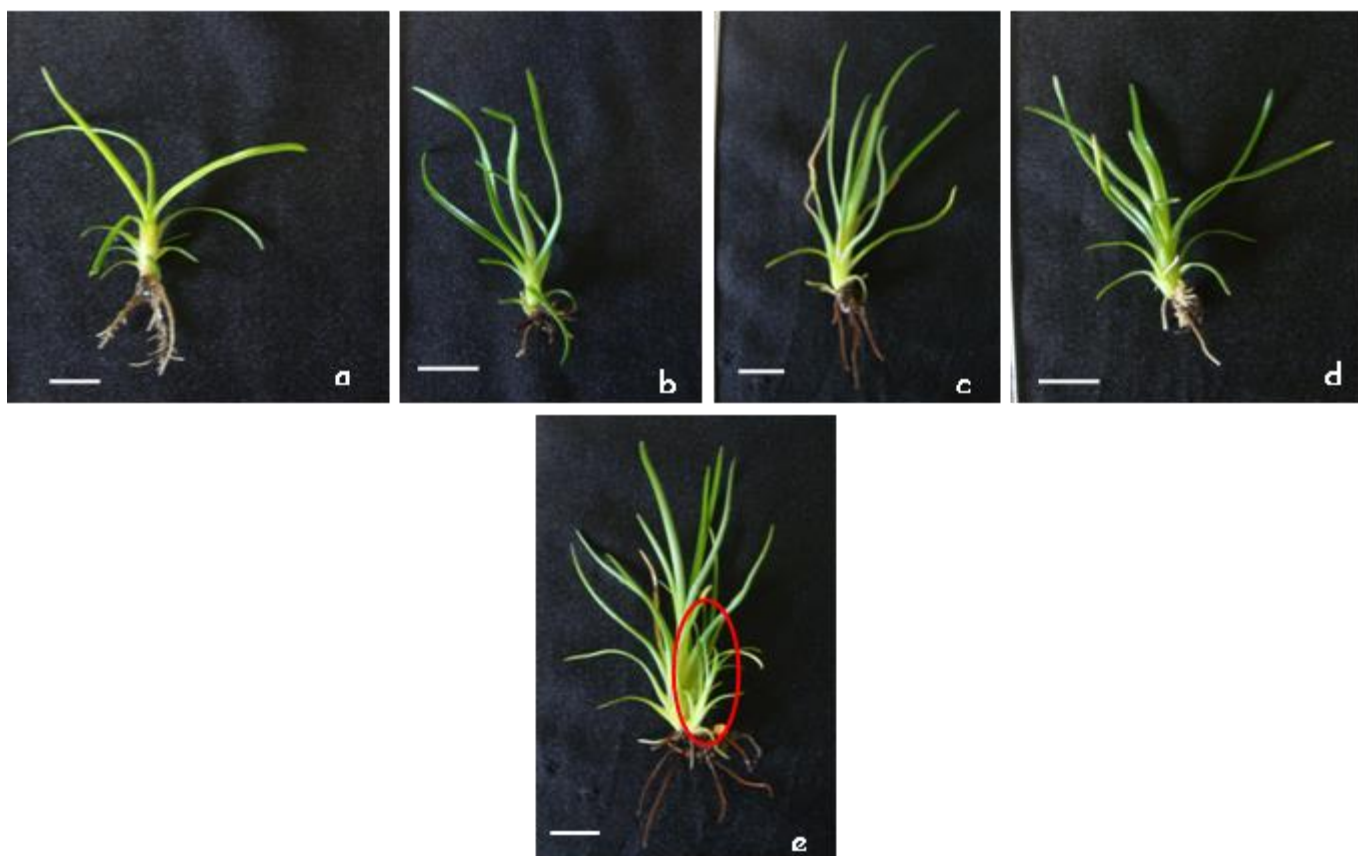


Figura 22: Aspectos das plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após três meses de crescimento *in vitro* nos diferentes tratamentos de nitrato de amônio (NH_4NO_3) (a) Plantas cultivadas em 5 mM de NH_4NO_3 . (b) Plantas cultivadas em 15 mM de NH_4NO_3 (c) Plantas cultivadas em 30 mM de NH_4NO_3 . (d) Plantas cultivadas em 60 mM de NH_4NO_3 . (e) Plantas cultivadas em 30 mM de NH_4NO_3 , em destaque o broto. Barra = 1 cm.

Nas concentrações de 30 e 60 mM de NH_4NO_3 , as plantas apresentaram as maiores médias de folhas, e no tratamento 5 mM de NH_4NO_3 ocorreu um maior número de folhas mortas por planta ($1,60 \pm 1,06$) quando comparado aos demais tratamentos (Tabela 8).

Com relação ao comprimento da parte aérea (Tabela 8), as menores folhas ocorreram nas plantas cultivadas na concentração de 15 mM de NH_4NO_3 , e as maiores folhas em 30 e 60 mM de NH_4NO_3 . Com 30 e 60 mM de NH_4NO_3 as plantas apresentaram as maiores quantidades de massa fresca, mas apenas em 30 mM de NH_4NO_3 as plantas tiveram o maior valor de massa seca (Tabela 8), sugerindo um bom rendimento para o crescimento de *A. imperialis* com o uso de 30 mM de NH_4NO_3 .

TABELA 8

Número de folhas, número de folhas mortas, comprimento da parte aérea (cm) e quantidades de massa fresca (MF) (mg) e massa seca (MD) (mg) da parte aérea de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, após três meses de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de nitrato de amônio (NH_4NO_3).

Parâmetros analisados	Tratamentos (mM de NH_4NO_3)			
	5	15	30	60
Número de folhas	4 b	4 b	6 a	6 a
Número de folhas mortas	2 a	0 b	1 b	0 b
Comprimento da parte aérea (cm)	9,67 b	6,33 c	11,20 a	10,40 a
Massa fresca (MF) da parte aérea por planta (mg)	119 b	92 b	247 a	257 a
Massa seca (MD) da parte aérea por planta (mg)	11 c	9 c	23 a	17 b

Letras comparam os valores na horizontal e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nas análises dos pigmentos fotossintéticos (Figura 23), os menores valores foram observados na concentração de 5 mM de NH_4NO_3 , isto pode ser corroborado com a Figura 22, pois as plantas neste tratamento apresentavam uma coloração mais clara comparadas aos outros tratamentos.

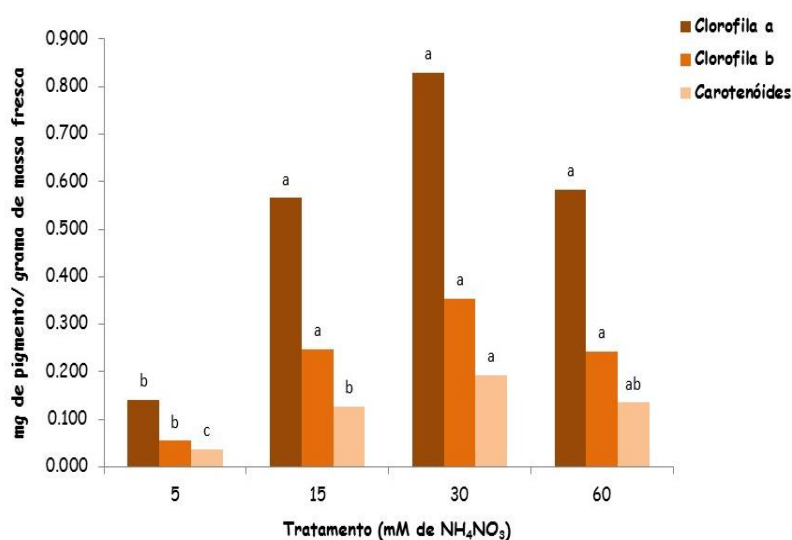


Figura 23: Quantidade de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b* e carotenóides) nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após três meses de cultivo *in vitro* nas concentrações 5,15,30 e 60 mM de nitrato de amônio (NH_4NO_3). A quantidade de pigmento foi expressa em mg do pigmento por grama de massa fresca. Letras diferentes indicam que os dados são significativamente diferentes de acordo com o teste Tukey a 5 % de probabilidade para um mesmo pigmento.

Quanto ao parâmetro comprimento da raiz (Tabela 9), assim como na parte aérea, as plantas dos tratamentos 30 e 60 mM de NH_4NO_3 apresentaram os maiores valores, essa tendência também foi observada na análise de massa seca da parte radicular, porém para massa fresca, apenas no tratamento de 30 mM de NH_4NO_3 observou-se a maior média.

TABELA 9

Comprimento da raiz (cm), quantidades de massa fresca (MF) (mg) e massa seca (MD) (mg) da raiz de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, após três meses de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de nitrato de amônio (NH_4NO_3).

Parâmetros analisados	Tratamentos (mM de NH_4NO_3)			
	5	15	30	60
Comprimento da raiz (cm)	1,29 b	1,21 b	2,01 a	1,83 a
Massa fresca (MF) da raiz por planta (mg)	27 b	18 c	41 a	29 b
Massa seca (MD) da raiz por planta (mg)	2 b	1 b	5 a	4 a

Letras comparam os valores na horizontal e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resumindo, observou-se que 30 e 60 mM de NH_4NO_3 do meio MS modificado promoveram um aumento no crescimento de plantas cultivadas *in vitro* de *A. imperialis* por 3 meses. E a importância deste tratamento está na formação de brotos, objetivo do presente trabalho, visto que o tratamento de 30 mM de NH_4NO_3 induziu a multiplicação da espécie em estudo.

As atividades da RN medidas nas folhas cultivadas na concentração de 30 e 60 mM de NH_4NO_3 apresentaram o maior valor na 4ª hora, porém na 8ª hora observou-se uma queda na atividade enzimática foliar em 30 mM de NH_4NO_3 , que se estendeu até a 24ª hora, e em 60 mM de NH_4NO_3 se estendeu até a 12ª hora (Figura 24a). Em relação as atividades das folhas de 5 mM de NH_4NO_3 foi no período do escuro que as plantas apresentaram os maiores valores como observa na figura 23a.

As atividades da GS medidas nas folhas de cultivadas na concentração de 15 mM de NH_4NO_3 apresentaram as menores médias durante toda a coleta de 24 horas (Figura 24b) e as maiores atividades foram observadas com 30 e 60 mM de NH_4NO_3 , sendo inclusive, as maiores observadas até o presente momento dentre todos os tratamentos analisados.

As atividades da GDH medidas nas folhas de plantas de *A. imperialis* cultivadas na concentração de 60 mM de NH_4NO_3 foram maiores durante quase toda as 24 horas de coleta (Figura 24c).

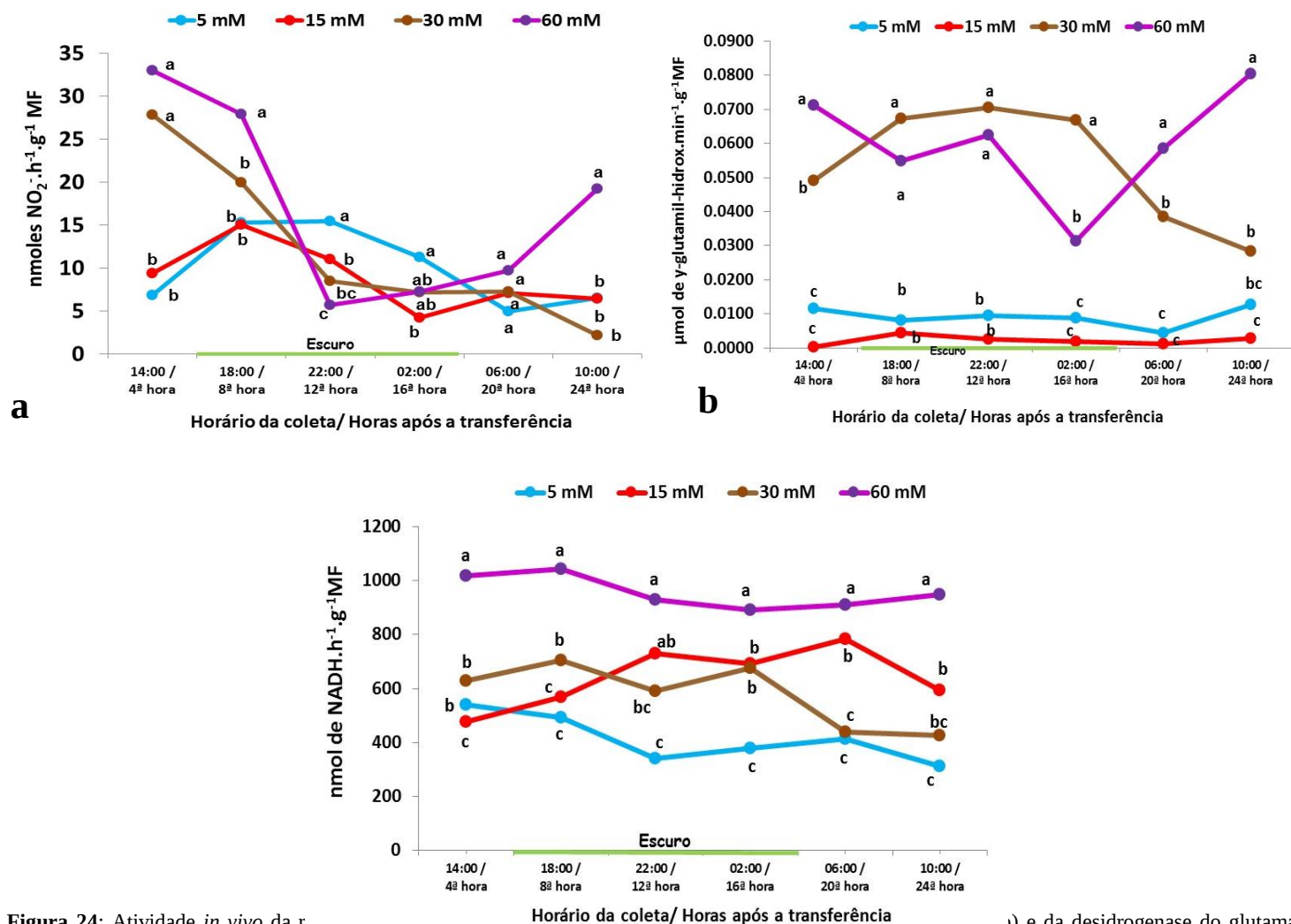


Figura 24: Atividade *in vivo* da reductase do nitrato (a), da glutamato sintase (b) e da desidrogenase do glutamato (GDH-NADH) (c) durante o ciclo diurno e noturno (24 horas) nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms no terceiro de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de nitrato de amônio (NH_4NO_3). A barra verde indica o período noturno de coleta. A atividade enzimática da RN foi expressa em $\text{nmoles NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$, da GS foi expressa em $\mu\text{mol de } \gamma\text{-glutamyl-hidrox} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$ e da GDH-NADH foi expressa em $\text{nmol de NADH} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas em 5% de probabilidade pelo teste Tukey dentro de um mesmo tempo de coleta.

A quantidade endógena de amônio nas folhas cultivadas nas concentrações de 30 e 60 mM de nitrato de amônio foram maiores na durante todo o período de coleta (Figura 25a).

Em relação a quantidade endógena de nitrato, observa-se na Figura 25b, que as plantas cultivadas em 60 mM de NH_4NO_3 apresentaram as maiores quantidades do composto analisado.

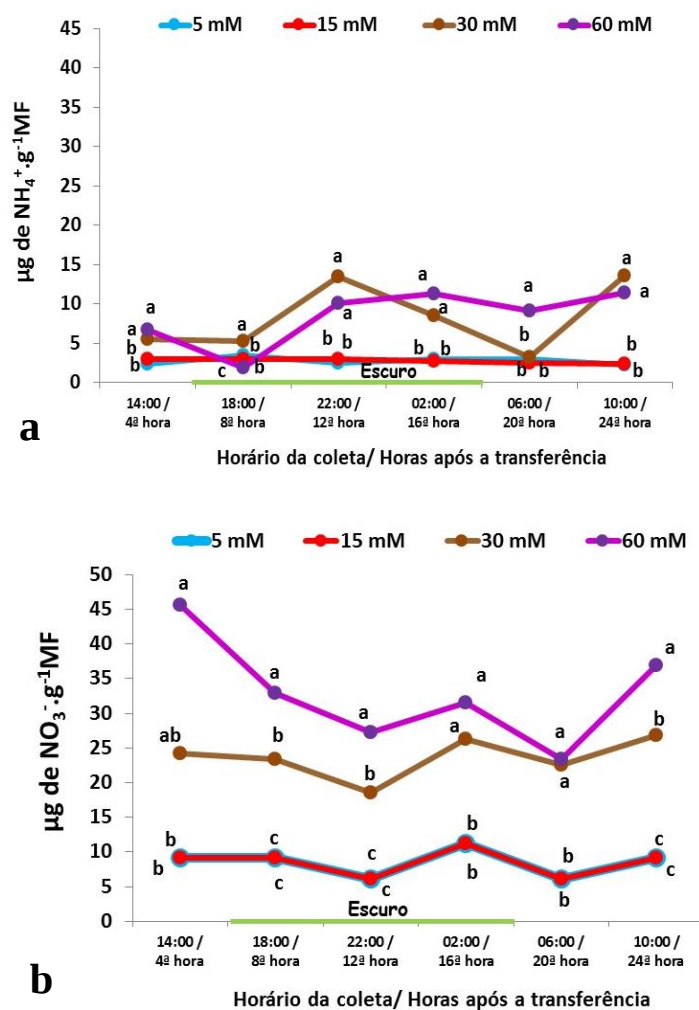


Figura 25: Quantidade de amônio (a) e nitrato (b) endógeno durante o ciclo diurno e noturno (24 horas) nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms no terceiro mês de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de nitrato de amônio (NH₄NO₃). A barra verde indica o período noturno de coleta. A quantidade de amônio foi expressa em µgrama de NH₄⁺·g⁻¹MF e de nitrato foi expressa em µgrama de NO₃⁻·g⁻¹MF. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas em 5% de probabilidade pelo teste Tukey dentro de um mesmo tempo de coleta.

As análises de proteínas solúveis nas folhas mostraram que durante quase toda coleta de 24 horas e no 2º dia do terceiro mês de coleta, na concentração de 30 mM de NH₄NO₃ observaram-se os maiores valores de proteínas solúveis (Figura 26a).

As análises de aminoácidos totais nas folhas mostraram que os tratamentos de 30 e 60 mM de nitrato de amônio apresentaram as maiores médias, durante quase toda a coleta de 24 horas (Figura 26b).

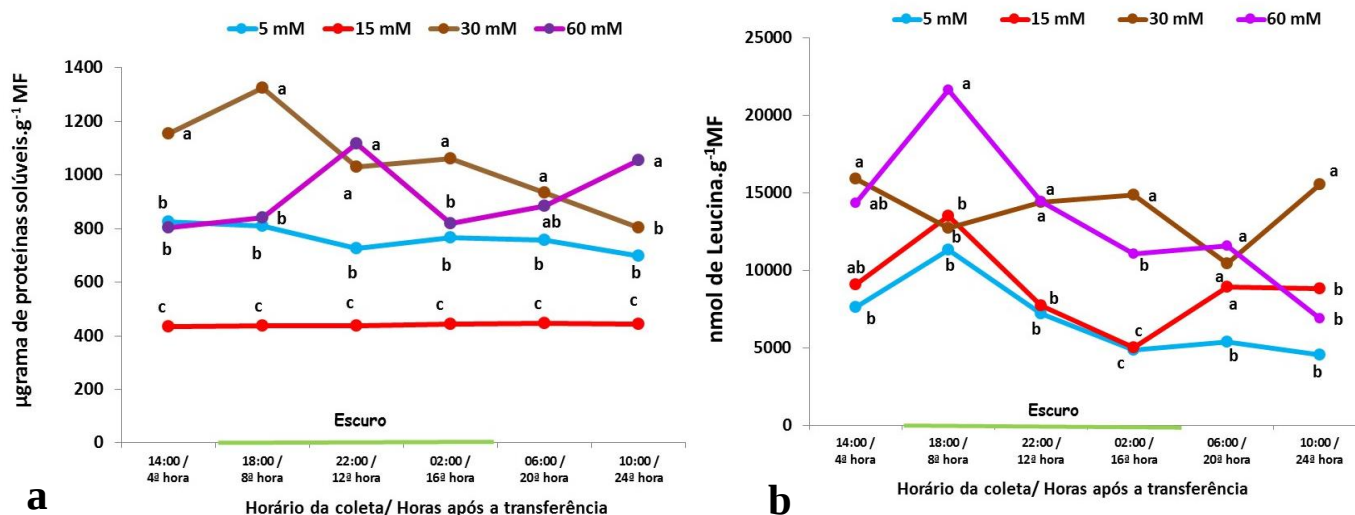


Figura 26: Proteínas solúveis (a) e aminoácidos totais (b) durante o ciclo diurno e noturno (24 horas) nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms no terceiro mês de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de nitrato de amônio (NH_4NO_3). A barra verde indica o período noturno de coleta. A quantidade de proteínas foi expressa em µgama de albumina.g⁻¹ MF e de aminoácidos foi expressa em nmol de leucina.g⁻¹ MF. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas em 5% de probabilidade pelo teste Tukey dentro de um mesmo tempo de coleta.

Ao comparar as três fontes nitrogenadas, em relação ao crescimento, as plantas crescidas em 30 e 60 mM de NH_4NO_3 apresentaram os maiores valores, porém no tratamento de 30 mM de NH_4NO_3 , houve a multiplicação das plantas.

Apenas na presença dos dois ions juntos, esta espécie apresentou brotações laterais, isto pode estar relacionado, com pesquisas conduzidas por Hachiya *et al.*, (2012) com *Arabidopsis thaliana* crescidas em meio com NO_3^- e NH_4^+ indicam que o NO_3^- , pode atuar como sinalizador capaz de minimizar a toxidez do NH_4^+ , sugerindo que a presença NO_3^- do pode contribuir para mais um mecanismo que atenua a toxicidade do excesso de NH_4^+ (Hachiya *et al.*, 2012), além disto pode induzir a síntese de enzimas para a produção de citocininas (Takei *et al.*, 2001). As citocininas são uma importante classe de hormônios, uma vez que regulam o crescimento e desenvolvimento das plantas, incluindo divisão celular, estimulando a expansão celular, e a formação de brotos, que não é comum na espécie em estudo.

No presente estudo só se observou multiplicação nos tratamentos com as duas fontes combinadas, que como esta espécie não multiplica em seu ambiente natural, sugere-se que a plantas está sob um certo fator de estresse, que pode estar relacionado com a presença do amônio, e como tem o nitrato, este sinaliza a síntese de citocininas, que leva a formação dos brotos.

Em relação às atividades enzimáticas, as plantas crescidas em 30 e 60 mM de NH_4NO_3 apresentaram a maior atividade de RN, já em relação à atividade de GS e GDH, as maiores atividades foram observadas no tratamento de 60 mM de NH_4NO_3 .

As plantas crescidas em 60 mM de amônio e 60 mM de nitrato de amônio apresentaram os maiores valores de amônio e nitrato endógeno, respectivamente.

As plantas crescidas em 30 mM de nitrato de amônio apresentaram a maior quantidade de proteínas solúveis e em relação aos aminoácidos livres, as plantas crescidas em 60 mM de nitrato de amônio apresentaram as maiores quantidades em relação à todos os tratamentos analisados até o momento, chegando a ser, praticamente, o dobro da observada no tratamento apenas com nitrato.

V.8) Crescimento *in vitro* e metabolismo do nitrogênio das plantas em diferentes concentrações de amônio (NH_4^+) – 6 meses (180 dias)

Os resultados mostraram que na concentração de 15 mM de NH_4^+ elas cresceram mais e apresentaram-se com aspecto mais vigoroso (Figura 27), assim como observado em três meses (Figura 12). Apenas as plantas crescidas na concentração de 60 mM de NH_4^+ apresentaram mortalidade (27%) e as plantas mantidas em 5 mM de NH_4^+ tiveram 52 % com formação de um a três brotos, cuja visualização só foi possível após o terceiro mês de cultivo (Figura 27). Não foi possível determinar o número de raízes, pois estavam muito emaranhadas ou enoveladas em todas as plantas cultivadas em todos os tratamentos.

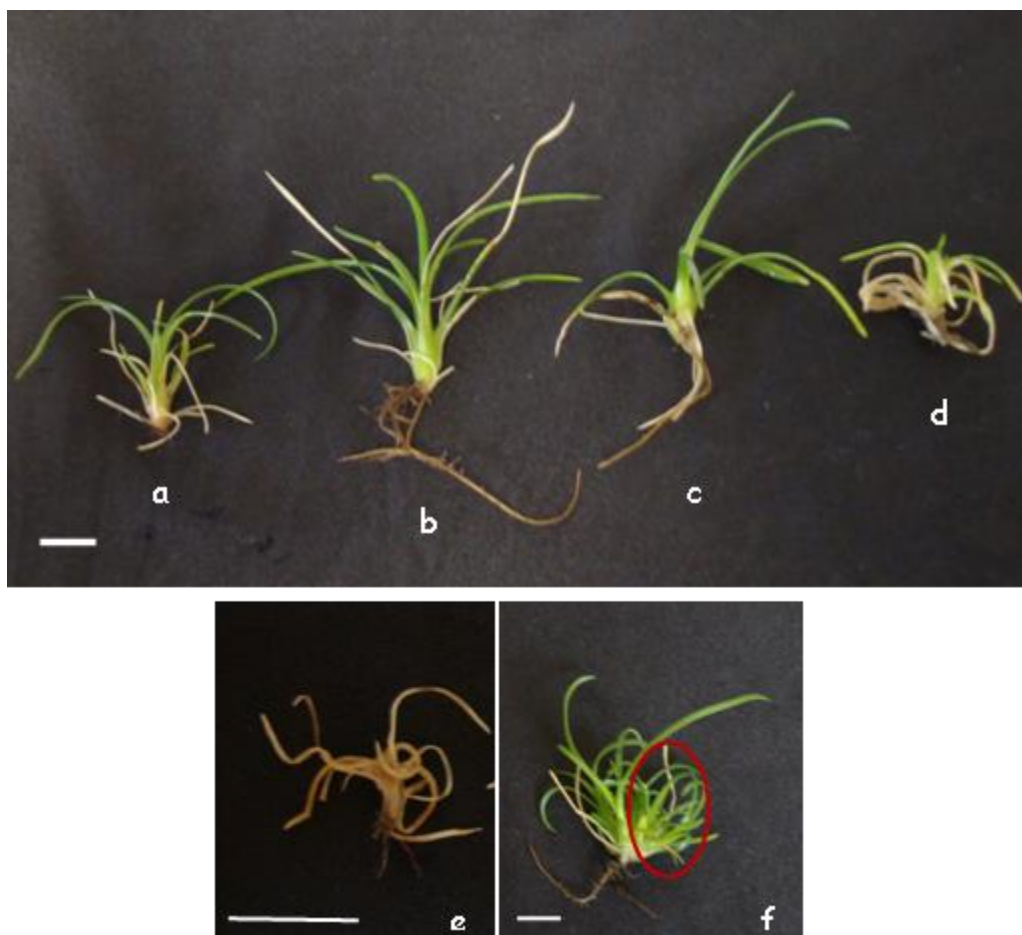


Figura 27: Aspectos das plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após seis meses de crescimento *in vitro* nos diferentes tratamentos de amônio (NH_4^+). (a) Plantas cultivadas em 5 mM de NH_4^+ . (b) Plantas cultivadas em 15 mM de NH_4^+ . (c) Plantas cultivadas em 30 mM de NH_4^+ . (d) Plantas cultivadas em 60 mM de NH_4^+ . (e) Plantas cultivadas em 60 mM de NH_4^+ mortas. (f) Plantas cultivadas em 5 mM de NH_4^+ , em destaque o broto. Barra = 1 cm.

Não se observou diferenças estatísticas no parâmetro número de folhas entre os tratamentos (Tabela 10).

Com relação ao comprimento da parte aérea (Tabela 10), as menores folhas ocorreram nas plantas cultivadas na concentração de 60 mM de NH_4^+ ($2,00 \pm 0,49$ cm) e as maiores folhas em 15 mM de NH_4^+ ($5,77 \pm 1,18$ cm). Em relação às massas fresca e seca as plantas crescidas em 60 mM de NH_4^+ tiveram as menores quantidades (63 ± 10 mg/planta de MF e 6 ± 1 mg/planta de MS) (Tabela 10), e as cultivadas em 15 mM de NH_4^+ apresentaram as maiores médias (154 ± 74 mg/planta de MF e 14 ± 6 mg/planta de MS).

Tabela 10

Número de folhas, comprimento da parte aérea (cm) e quantidades de massa fresca (MF) (mg) e massa seca (MD) (mg) da parte aérea de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, após seis meses de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de amônio (NH_4^+).

Parâmetros analisados	Tratamentos (mM de NH_4^+)			
	5	15	30	60
Número de folhas	8 a	8 a	8 a	7 a
Comprimento da parte aérea (cm)	4,82 b	5,77 a	4,21 b	2,00 c
Massa fresca (MF) da parte aérea por planta (mg)	98 b	154 a	98 b	63 c
Massa seca (MD) da parte aérea por planta (mg)	8 b	14 a	8 b	6 c

Letras comparam os valores na horizontal e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nas análises dos pigmentos fotossintéticos (Figura 28), observou-se menores quantidades na concentração de 60 mM de NH_4^+ , e os maiores valores, nas plantas crescidas nas concentrações de 5 e 15 mM de NH_4^+ . Com relação aos carotenoides não se observou diferenças estatísticas nas plantas cultivadas nos diferentes tratamentos.

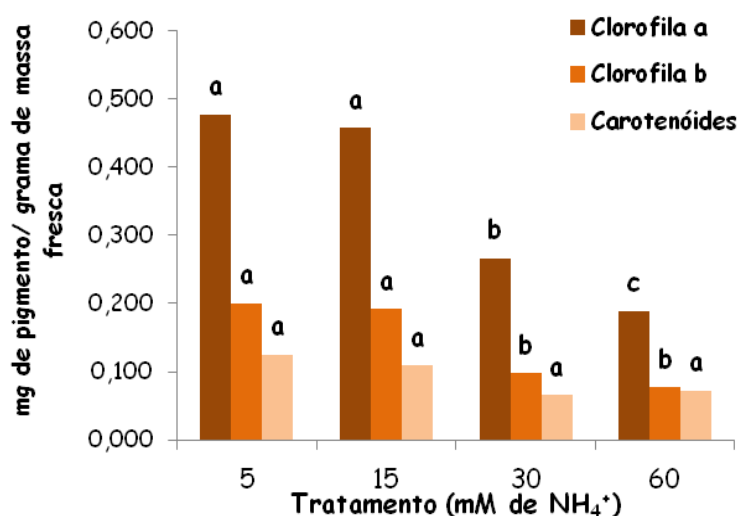


Figura 28: Quantidade de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b* e carotenóides) nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após seis meses de cultivo *in vitro* nas concentrações 5,15,30 e 60 mM de amônio (NH₄⁺). A quantidade de pigmento foi expressa em mg do pigmento por grama de massa fresca. Letras diferentes indicam que os dados são significativamente diferentes de acordo com o teste Tukey a 5 % de probabilidade para um mesmo pigmento.

Quanto ao parâmetro comprimento da raiz (Tabela 11), na concentração de 15 mM de NH₄⁺ as plantas tiveram as maiores raízes (3,17±1,31 cm).

Em relação à massa fresca da parte radicular (Tabela 11), na concentração de 15 mM de NH₄⁺ as plantas apresentaram os maiores valores (18±5 mg/planta), porém quanto à massa seca, as concentrações de 5 e 15 mM de NH₄⁺ tiveram os maiores valores (0,97±0,15 mg/planta e 0,94±0,44 mg/planta, respectivamente). As menores quantidades de massa, tanto fresca quanto seca, foram obtidas nas plantas crescidas na concentração de 60 mM de NH₄⁺ (5±3 mg de MF e 0,21±0,15 mg de MD).

Tabela 11

Comprimento da raiz (cm), quantidades de massa fresca (MF) (mg) e massa seca (MD) (mg) da raiz de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, após seis meses de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de amônio (NH₄⁺).

Parâmetros analisados	Tratamentos (mM de NH ₄ ⁺)			
	5	15	30	60
Comprimento da raiz (cm)	2,26 b	3,17 a	1,47 c	0,91 d
Massa fresca (MF) da raiz por planta (mg)	15 b	18 a	15 b	5 c
Massa seca (MD) da raiz por planta (mg)	0,97 a	0,94 a	0,88 b	0,21 c

Letras comparam os valores na horizontal e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De modo geral, após a análise dos resultados acima, observou-se que 15 mM de NH_4^+ do meio MS modificados promoveram um aumento no crescimento *in vitro* de plantas de *A. imperialis* após seis meses de cultivo, e 5 mM de NH_4^+ induziu a formação de brotos nesta espécie, porém pela alta taxa de mortalidade aos três meses, optou-se por não escolher como um dos meios indutores.

Com seis meses não houve as análises de 24 horas, pois foi o final do experimento, portanto optou-se por fazer apenas uma coleta às 10:00.

As atividades da RN medidas nas folhas cultivadas em diferentes concentrações de amônio, não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos (Figura 29a).

As atividades da GS medidas nas folhas cultivadas na concentração de 15 mM de amônio apresentaram a menor atividade (Figura 29b).

As atividades da GDH medidas nas folhas cultivadas na concentração de 15 mM de amônio apresentaram a maior atividade, seguida dos tratamentos de 30, 60 e 5 mM de amônio (Figura 29c).

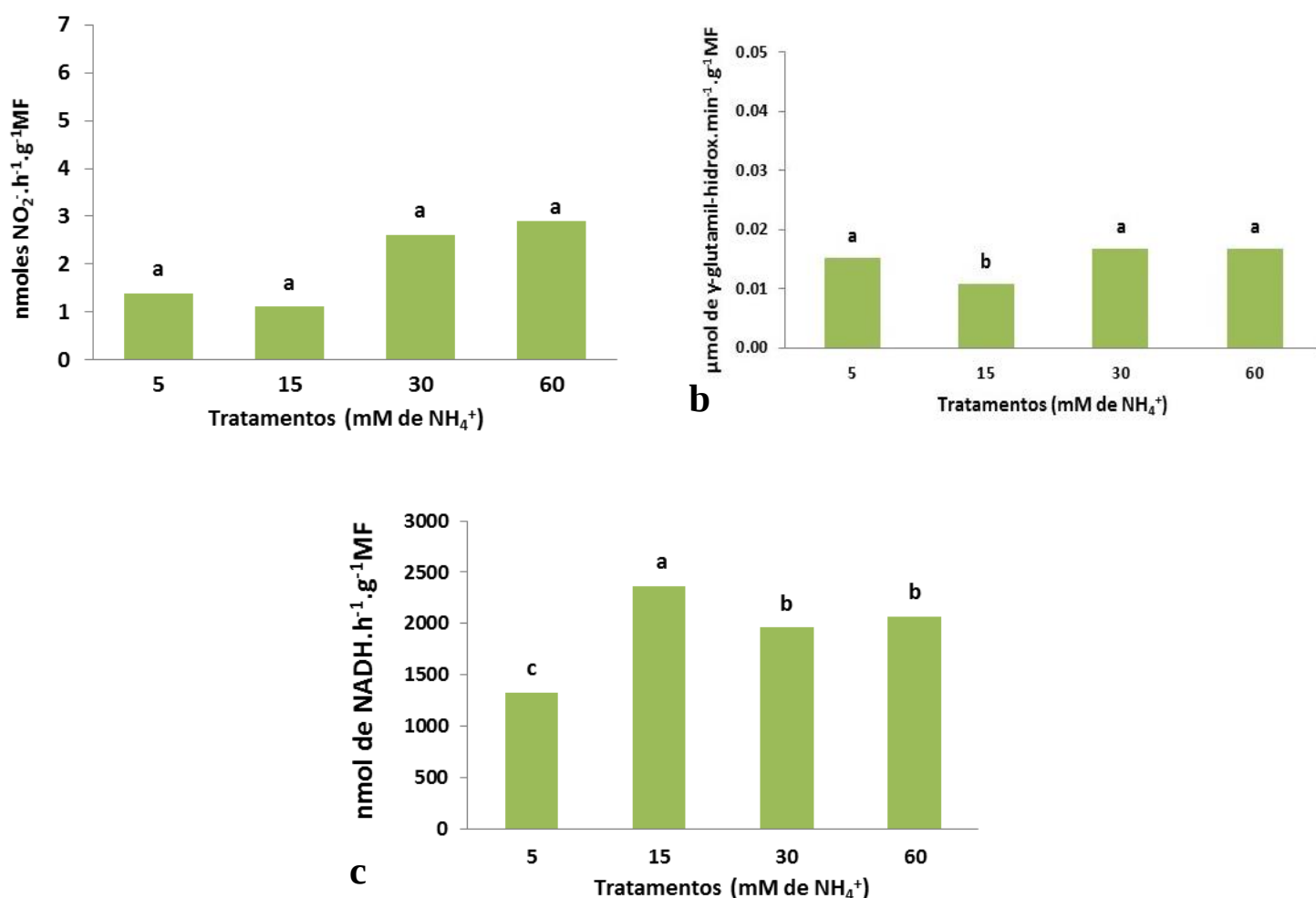


Figura 29: Atividade *in vivo* da redutase do nitrato (RN) (a), atividade *in vitro* da sintetase da glutamina (GS) (b) e da desidrogenase do glutamato (GDH-NADH) (c) nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms no sexto mês de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de amônio (NH_4^+). A atividade enzimática da RN foi expressa em $\text{nmol NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$, da GS foi expressa em $\mu\text{mol de } \gamma\text{-glutamyl-hidrox} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$ e da GDH-NADH foi expressa em $\text{nmol de NADH} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas em 5% de probabilidade pelo teste Tukey entre os tratamentos.

A quantidade endógena de amônio nas folhas cultivadas na concentração de 60 mM de NH_4^+ foi maior quando comparada aos demais tratamentos, como se observa na Figura 30a.

Não se observou diferenças estatísticas na quantidade endógena de nitrato nas folhas cultivadas em diferentes concentrações de amônio (Figura 30b).

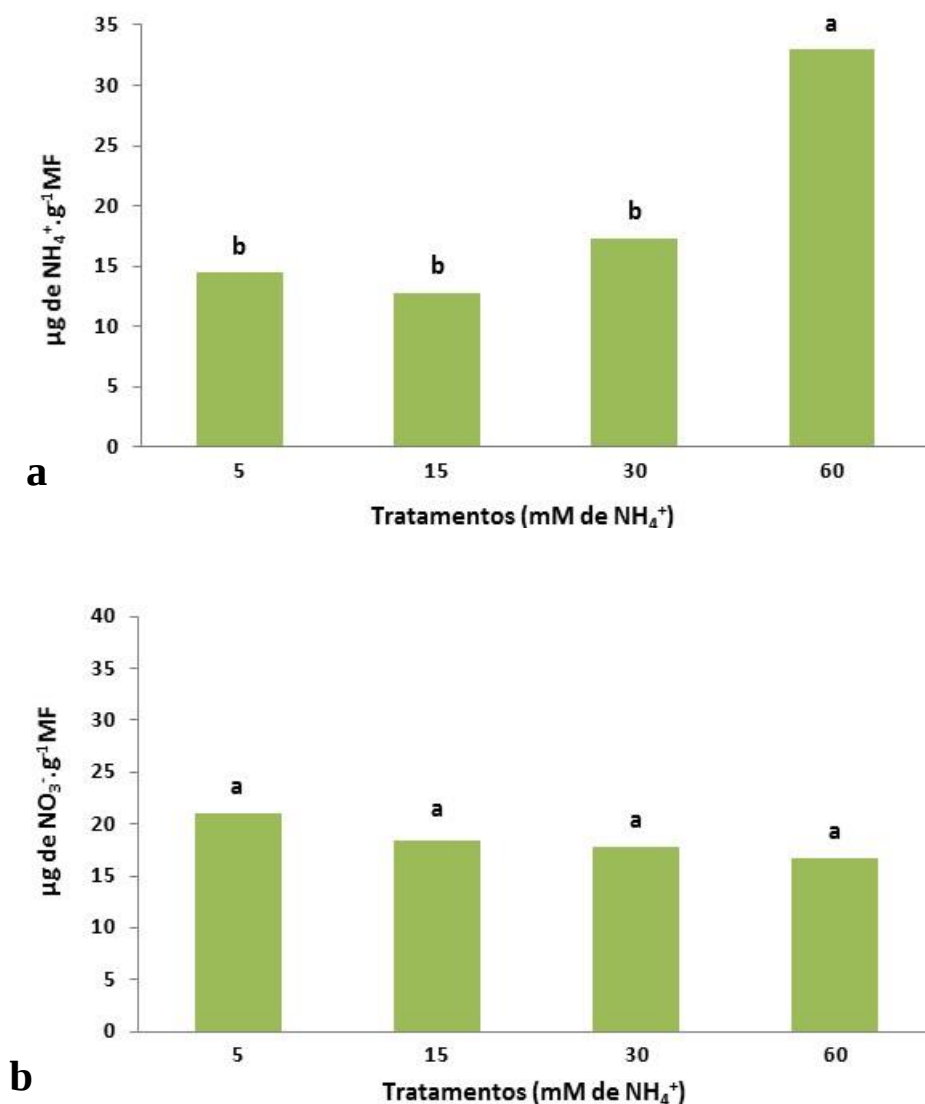


Figura 30: Quantidade de amônio (a) e nitrato (b) endógeno nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms no sexto mês de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de amônio (NH_4^+). A quantidade de amônio foi expressa em $\mu\text{grama de NH}_4^+ \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$ e de nitrato foi expressa em $\mu\text{grama de NO}_3^- \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas em 5% de probabilidade pelo teste Tukey entre os tratamentos.

As análises de proteínas solúveis medidas nas folhas foram maiores nos tratamentos de 15 e 60 mM de NH_4^+ (Figura 31a).

As análises de aminoácidos totais nas folhas mostraram que na concentração de 60 mM de amônio as plantas apresentaram a maior quantidade do composto analisado (Figura 31b), mas menos de 1/3 da observada aos 90 dias nas plantas cultivadas com amônio.

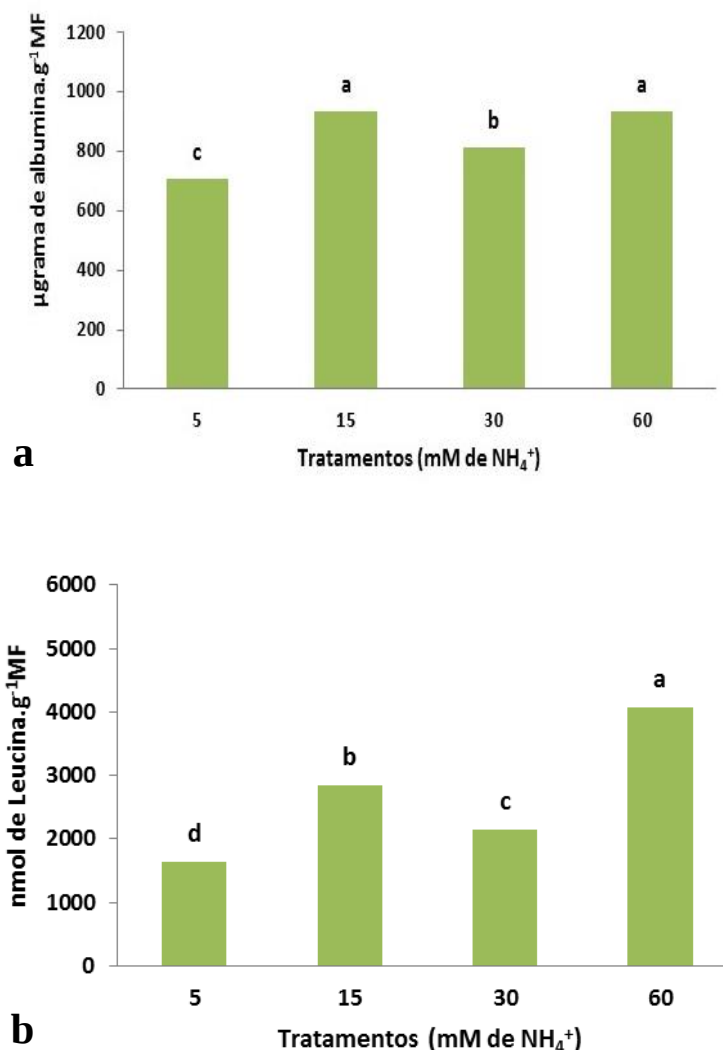


Figura 31: Proteínas solúveis (a) e aminoácidos totais (b) nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms no sexto mês de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de amônio (NH_4^+). A quantidade de proteínas foi expressa em $\mu\text{grama de albumina.g}^{-1}\text{MF}$ e de aminoácidos foi expressa em nmol de leucina.g⁻¹MF. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas em 5% de probabilidade pelo teste Tukey entre os tratamentos.

Estes resultados corroboram com os resultados do tempo zero e de três meses, os quais mostraram que as plantas crescidas em amônio não crescem muito bem, principalmente em altas concentrações, como 60 mM, pois neste tratamento a atividades das enzimas GS e GDH são prejudicadas, e conseqüentemente há acúmulo de amônio endógeno, que pode estar sendo tóxico às plantas (Britto & Kronzucker, 2002). E as altas concentrações de aminoácidos, sugerem que as plantas estão em estágio de senescência, o que explica a alta taxa de mortalidade neste tratamento.

V.9) Crescimento *in vitro* e metabolismo do nitrogênio das plantas em diferentes concentrações de nitrato (NO_3^-) – 6 meses (180 dias)

Os resultados mostraram que nas concentrações de 15 mM de NO_3^- as plantas cresceram mais e apresentaram-se com aspecto mais vigoroso. Em nenhuma das concentrações ocorreu mortalidade das plantas (Figura 32). Não foi possível determinar o número de raízes, pois estavam muito emaranhadas ou enoveladas em todas as plantas cultivadas em todos os tratamentos.



Figura 32: Aspectos das plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após seis meses de crescimento *in vitro* nos diferentes tratamentos de nitrato (NO_3^-). (a) Plantas cultivadas em 5 mM de NO_3^- . (b) Plantas cultivadas em 15 mM de NO_3^- . (c) Plantas cultivadas em 30 mM de NO_3^- . (d) Plantas cultivadas em 60 mM de NO_3^- . Barra = 1 cm.

Em relação ao parâmetro número de folhas, as plantas das concentrações de 15 e 30 mM de NO_3^- apresentaram o maior valor, e em 60 mM de NO_3^- , se observou o menor número de folhas, porém foi na em 5 mM de NO_3^- , que ocorreram o maior número de folhas mortas ($6,40 \pm 1,96$) (Tabela 12).

Com relação ao comprimento da parte aérea (Tabela 12), as menores folhas ocorreram nas plantas cultivadas na concentração de 60 mM de NO_3^- ($5,70 \pm 0,84$ cm) e as maiores folhas em 15 mM de NO_3^- ($11,94 \pm 2,34$ cm). Em relação às massas da parte aérea observou-se que em 15 mM de NO_3^- , as plantas acumularam mais massa fresca e o maior acúmulo de massa seca foi no tratamento de 5 mM de NO_3^- (Tabela 12).

Tabela 12

Número de folhas, número de folhas mortas, comprimento da parte aérea (cm) e quantidades de massa fresca (MF) (mg) e massa seca (MD) (mg) da parte aérea de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, após seis meses de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de nitrato (NO_3^-).

Parâmetros analisados	Tratamentos (mM de NO_3^-)			
	5	15	30	60
Número de folhas	8 b	10 a	10 a	7 c
Número de folhas mortas	6 a	3 b	3 b	4 b
Comprimento da parte aérea (cm)	10,10 b	11,94 a	9,58 b	5,70 c
Massa fresca (MF) da parte aérea por planta (mg)	763 b	875 a	511 c	211 d
Massa seca (MD) da parte aérea por planta (mg)	73 a	65 b	42 c	18 d

Letras comparam os valores na horizontal e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nas análises dos pigmentos fotossintéticos (Figura 33), observou-se que as plantas apresentaram uma maior quantidade de clorofila *a* na concentração de 15 mM de NO_3^- , decaindo em seguida.

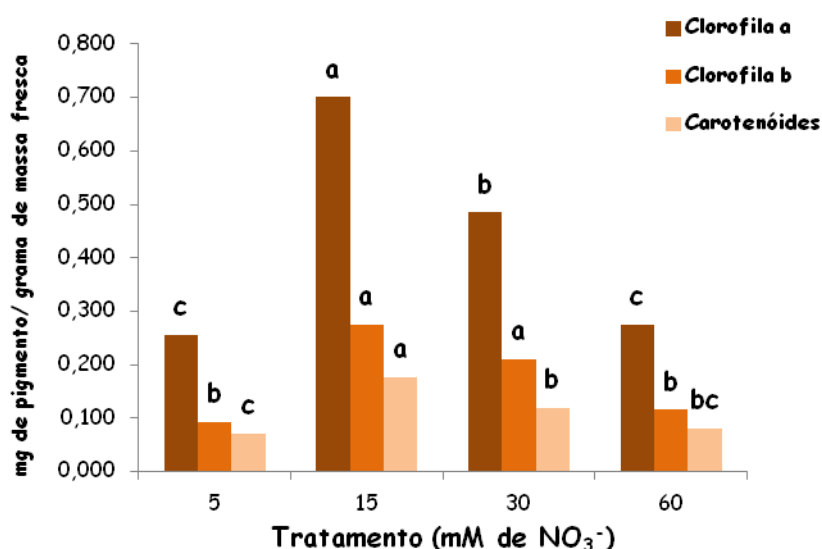


Figura 33: Quantidade de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b* e carotenóides) nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após seis meses de cultivo *in vitro* nas concentrações 5,15,30 e 60 mM de nitrato (NO_3^-). A quantidade de pigmento foi expressa em mg do pigmento por grama de massa fresca. Letras diferentes indicam que os dados são significativamente diferentes de acordo com o teste Tukey a 5 % de probabilidade para um mesmo pigmento.

Quando se observa os resultados de número de folhas mortas, os maiores valores foram na menor concentração, segundo Epstein & Bloom (2006), a deficiência de nitrogênio, leva a falta de pigmentos nas folhas mais velhas, fazendo com elas tenham a senescência antes das folhas mais novas, isto ocorre devido à redistribuição do N dentro da planta, e também explica a coloração mais clara nestas plantas, e conseqüentemente menor quantidade de pigmentos fotossintéticos.

Quanto ao parâmetro comprimento da raiz (Tabela 13), na concentração de 5 mM de NO_3^- ($5,96 \pm 1,68$ cm) as plantas tiveram as maiores raízes, e na concentração de 60 mM de NO_3^- ($0,81 \pm 0,29$ cm), as menores.

Em relação à massa fresca da parte radicular, os maiores valores foram nas concentrações de 5 e 15 mM de NO_3^- e a massa seca, apenas no tratamento de 5 mM (Tabela 13), e as menores quantidades de massas foram encontrados na concentração de 60 mM de NO_3^- (22 ± 6 mg/planta de MF e $1,2 \pm 0,5$ mg/planta de MD).

TABELA 13

Comprimento da raiz (cm), quantidades de massa fresca (MF) (mg) e massa seca (MD) (mg) da raiz de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, após seis meses de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de nitrato (NO_3^-).

Parâmetros analisados	Tratamentos (mM de NO_3^-)			
	5	15	30	60
Comprimento da raiz (cm)	5,96 a	4,72 b	2,09 c	0,81 d
Massa fresca (MF) da raiz por planta (mg)	213 a	225 a	72 b	22 c
Massa seca (MD) da raiz por planta (mg)	18 a	9 b	6 c	1 d

Letras comparam os valores na horizontal e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Com a análise de todos os resultados obtidos nas diferentes concentrações de NO_3^- , foi possível constatar que os tratamentos com 5 mM e 60 mM de NO_3^- comprometeram o crescimento da espécie.

Em relação à análise foliar de macronutrientes e micronutrientes apenas foram feitas as análises nas plantas crescidas em 5, 15, 30 e 60 mM de N na forma de NO_3^- com seis meses de cultivo (Tabela 14), pois nos demais tratamentos não foi possível a obtenção de massa seca suficiente.

Os resultados mostraram que com o incremento de nitrato houve um aumento endógeno de nitrogênio, sendo a maior quantidade observada em 60 mM de NO_3^- (Tabela 14).

Tamaki *et al.* (2007) cultivaram plantas de *Ananas comosus* (L.) Merr. em diferentes diluições de macronutrientes do meio MS (60 mM de N – MS, 30 mM de N – MS/2, 12 mM de N – MS/5, 6 mM de N – MS/10, 1 mM de N – MS/60 e 0,6 mM de N – MS/100) durante 90 dias e observaram que, conforme a diluição aumentava os teores de nitrato diminuía, não sendo mais detectáveis em MS/60, mostrando que o meio mais concentrado possuía mais nitrato (fonte nitrogenada). Assim, em *A. imperialis*, o aumento da concentração de N endógeno foliar acompanhou o aumento exógeno de nitrato.

A análise dos macronutrientes foliares sugeriu uma interferência do nitrato sobre a quantidade dos outros macronutrientes analisados, pois eles tiveram as suas concentrações endógenas modificadas conforme o incremento de nitrato (Tabela 14), visto que a quantidade fornecida destes macronutrientes no meio de cultura foi a mesma em todos os tratamentos (Tabela 2).

Em relação às concentrações endógenas foliares de fósforo (P) e enxofre (S), em 5 mM de NO_3^- , as concentrações destes dois elementos se mantiveram maiores quando comparadas às demais concentrações. As menores concentrações endógenas de P e S, nas folhas, em altas concentrações de nitrato (15 e 30 mM de NO_3^-), podem ser explicadas pela interação dos íons durante a absorção de fósforo e enxofre, pois de acordo com Malavolta *et al.* (1997), a absorção de um nutriente pode ser influenciada pela presença de outro nutriente, com isso sugere-se que o nitrato pode ter inibido a absorção de P e S refletindo nas concentrações endógenas destes.

Com relação ao potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) nas plantas crescidas nas concentrações de 30 mM de NO_3^- , seus teores endógenos foram maiores quando comparado aos outros tratamentos (Tabela 14).

Aranda-Peres *et al.* (2009) ao estudarem a importância do Ca no cultivo *in vitro* de três espécie de bromélias (*Vriesea friburgensis* Mez, *V. hieroglyphica* (Carrière) E. Morren e *V. unilateralis* (Baker) Mez), observaram que o incremento do Ca no meio de cultura levava a um aumento na concentração de N endógeno, porém há poucos trabalhos que relatam a influência do N na concentração endógena de Ca. Sarmiento *et al.* (1994) mostraram que o aumento de NH_4NO_3 ($0 \leq \text{N} \leq 20 \text{mM}$) em plantas de oliveira induzia um aumento no teor de cálcio, corroborando com o resultado deste estudo, visto que em *A. imperialis* houve um aumento na concentração de Ca quando a adubação nitrogenada foi aumentada.

Tabela 14

Concentrações de macronutrientes (μg de nutriente/ grama de massa seca) em plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, após seis meses de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de nitrato (NO_3^-).

Tratamentos (mM de NO_3^-)	Macronutrientes (μg de nutrientes por grama de massa seca)					
	N	P	K	Ca	Mg	S
5	16906,23 c	10667,92 a	35904,96 b	5280,14 b	1368,93 c	9196,65 a
15	26087,96 b	8796,44 b	43287,04 a	5787,038 b	1607,51 b	6244,67 b
30	35020,67 a	7565,81 c	42173,66 a	7383,34 a	2264,23 a	4124,43 *
60	55106,62 *	5295,58 *	73593,07*	4208,75*	1402,92*	3456,18 *

*não houve massa suficiente para fazer mais de uma amostra, portanto não foi possível fazer a análise estatística.

Letras comparam os valores na vertical e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nas análises dos micronutrientes foliares não foi possível fazer a análise estatística, pois não houve massa seca suficiente para fazer as amostras em triplicatas e o tratamento 60 mM de NO_3^- não foi incluído, pois não teve massa suficiente para as análises.

Esta análise sugeriu uma interferência do N sobre a quantidade de Cu, Fe, Mn e Zn (Tabela 15), visto que a quantidade fornecida destes micronutrientes no meio de cultura foi a mesma em todos os tratamentos.

Em relação às concentrações endógenas foliares de Cu e Fe, foram nas plantas crescidas em 5 mM de NO_3^- onde se observaram as maiores concentrações endógenas destes dois nutrientes (Tabela 15), porém com relação ao Mn, a concentração deste nutriente foi maior nas plantas cultivadas em 30 mM de NO_3^- .

E em relação ao Zn, a maior quantidade endógena deste elemento foi observada em 15 mM de NO_3^- . Com isso, observa-se que o nitrato pode influenciar nos teores endógenos tanto dos macronutrientes como dos micronutrientes.

Tabela 15

Concentrações de micronutrientes (μg de nutriente/ grama de massa seca) em plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, após seis meses de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de nitrato (NO_3^-).

Tratamentos (mM de NO_3^-)	Micronutrientes (μg de nutrientes por grama de massa seca)			
	Cobre (Cu)	Ferro (Fe)	Manganês (Mn)	Zinco (Zn)
5	6,84*	185,78*	522,15*	82,14*
15	4,82*	139,37*	565,68*	79,57*
30	4,92*	179,17*	466,63*	85,65*

*não houve massa suficiente para fazer mais de uma amostra, portanto não foi possível fazer a análise estatística.

Letras comparam os valores na vertical e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Analisando os resultados, juntamente com o aspecto geral das plantas utilizadas neste experimento, sugere-se que a concentração contendo 15 mM de NO_3^- (a mesma do presente no meio MS) seja a mais indicada para o cultivo *in vitro* da espécie por seis meses e não se observou multiplicação desta espécie na presença de apenas NO_3^- . Vale ressaltar que ao final de 180 dias de cultivo as plantas crescidas com 15 mM de NO_3^- tinham quase o dobro do tamanho das maiores plantas do tratamento com amônio.

As atividades da RN medidas nas plantas cultivadas em diferentes concentrações de NO_3^- são mostradas na figura 34a onde se vê que nos tratamentos de 30 e 60 mM de nitrato, as plantas apresentaram as maiores atividades, corroborando com os resultados de três meses.

As atividades da GS medidas nas folhas cultivadas na concentração de 30 mM de nitrato foram as menores (Figura 34b).

As atividades da GDH medidas nas folhas cultivadas na concentração de 60 mM de nitrato apresentaram as maiores atividades, quando comparada aos outros tratamentos (Figura 34c).

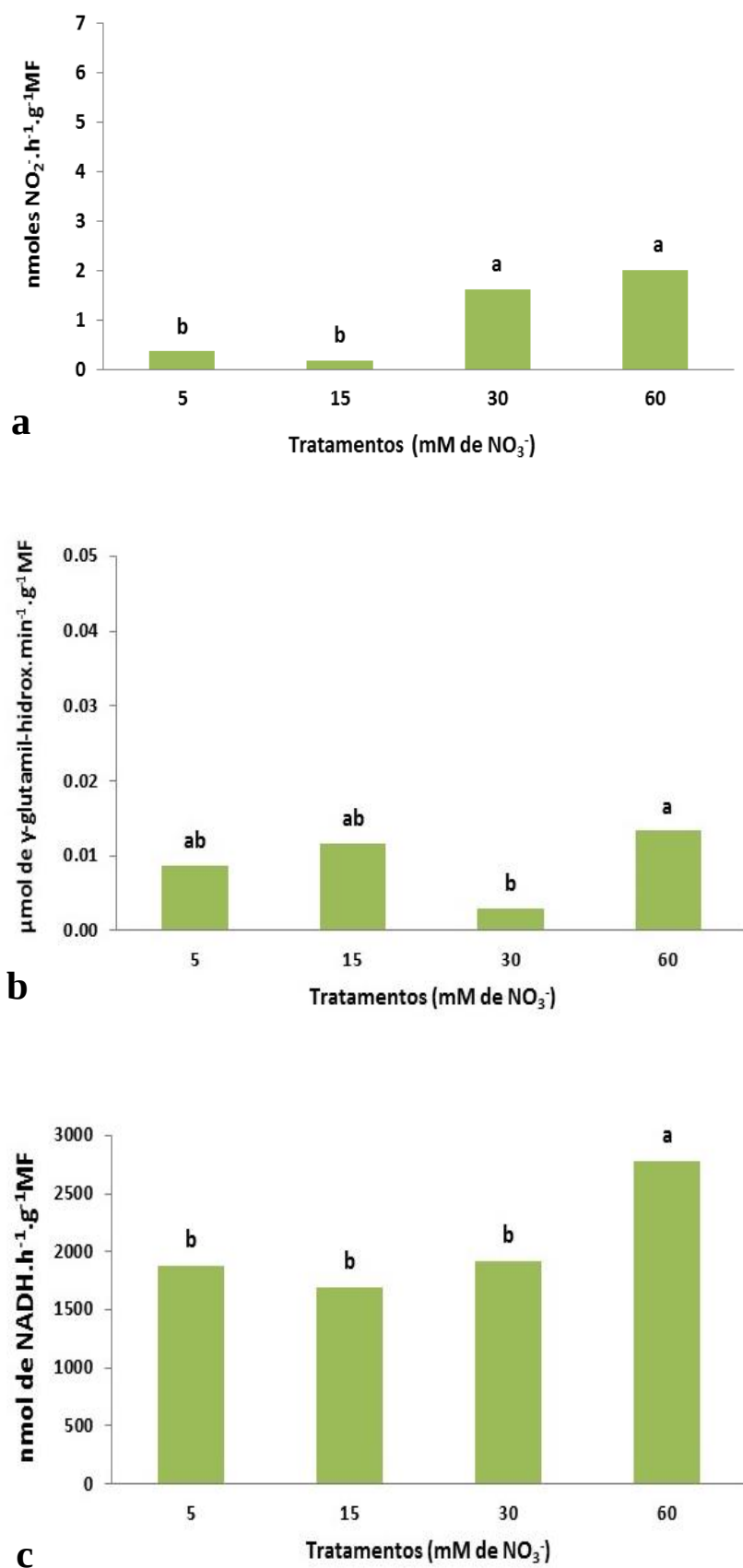


Figura 34: Atividade *in vivo* da redutase do nitrato (RN) (a), atividade *in vitro* da sintetase da glutamina (GS) (b) e da desidrogenase do glutamato (GDH-NADH) (c) nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms no sexto mês de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de nitrato (NO_3^-). A atividade enzimática da RN foi expressa em $\text{nmol NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$, da GS foi expressa em $\mu\text{mol de } \gamma\text{-glutamyl-hidrox. min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$ e da GDH-NADH foi expressa em $\text{nmol de NADH} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas em 5% de probabilidade pelo teste Tukey entre os tratamentos.

Não houve diferenças estatísticas na quantidade endógena de amônio nas folhas cultivadas em diferentes concentrações de nitrato (Figura 35a), porém nas plantas cultivadas na concentração de 30 mM de nitrato, as folhas apresentaram a menor quantidade de nitrato endógeno (Figura 35b).

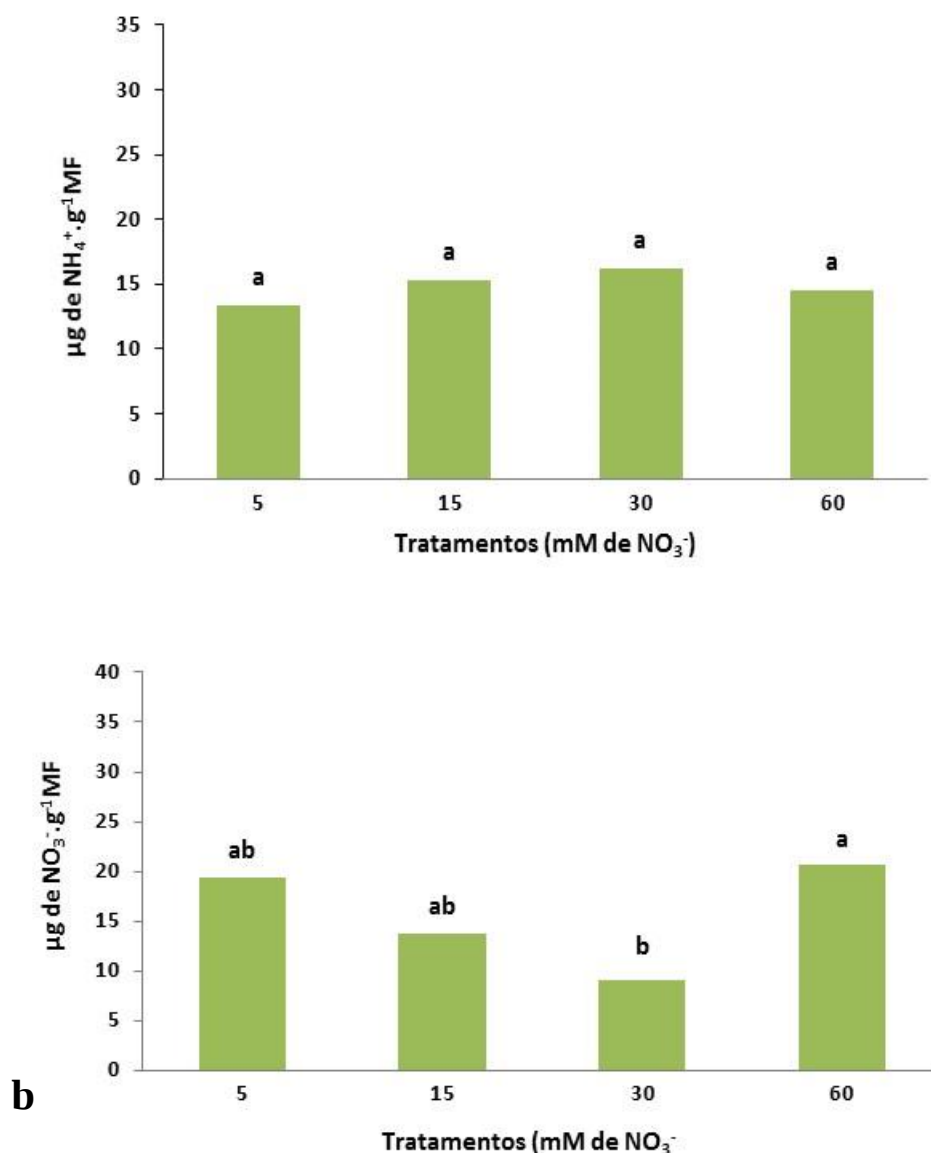


Figura 35: Quantidade de amônio (a) e nitrato (b) endógeno nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms no sexto mês de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de nitrato (NO_3^-). A quantidade de amônio foi expressa em $\mu\text{grama de } \text{NH}_4^+ \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$ e de nitrato foi expressa em $\mu\text{grama de } \text{NO}_3^- \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas em 5% de probabilidade pelo teste Tukey entre os tratamentos.

Não houve diferenças estatísticas na quantidade de proteínas solúveis nas folhas cultivadas em diferentes concentrações de nitrato (Figura 36a).

As análises de aminoácidos totais nas folhas mostraram na concentração de 60 mM de nitrato, as plantas apresentaram a maior quantidade do composto analisado (Figura 36b).

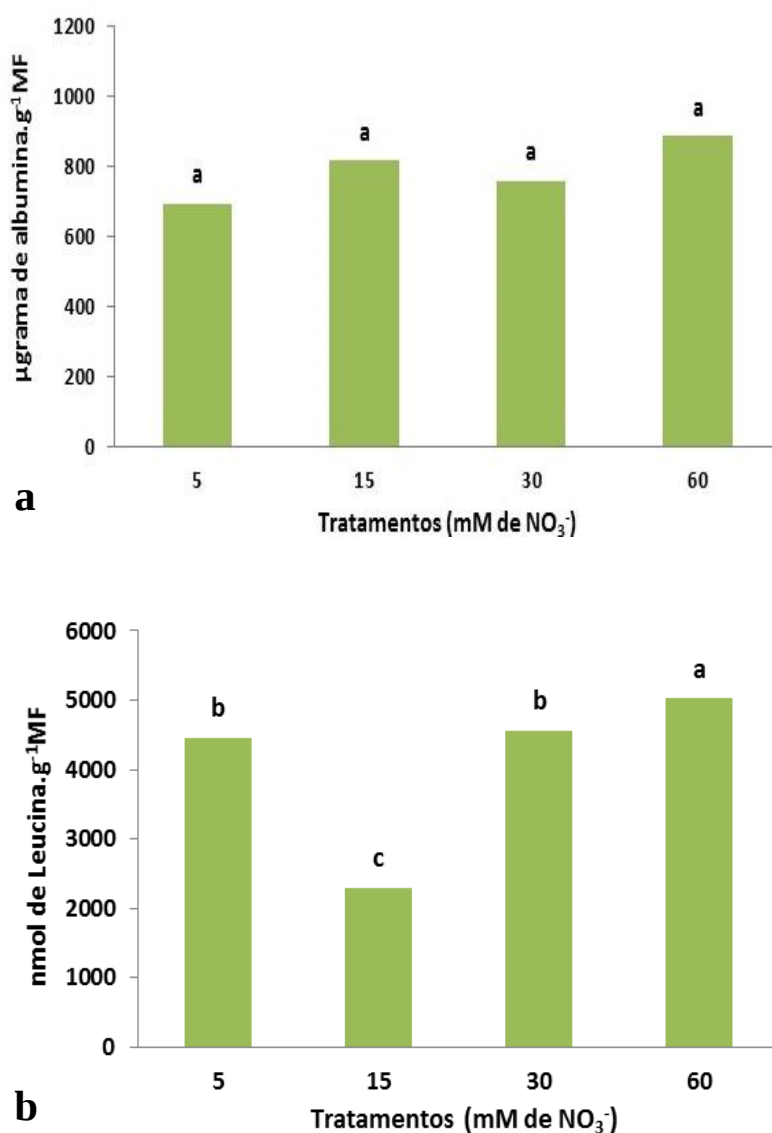


Figura 36: Proteínas solúveis (a) e aminoácidos totais (b) nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms no sexto mês de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de nitrato (NO_3^-). A quantidade de proteínas foi expressa em $\mu\text{grama de albumina.g}^{-1}\text{MF}$ e de aminoácidos foi expressa em nmol de leucina.g⁻¹MF. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas em 5% de probabilidade pelo teste Tukey entre os tratamentos.

V.10) Crescimento *in vitro* e metabolismo do nitrogênio das plantas em diferentes concentrações de nitrato de amônio (NH_4NO_3) – 6 meses (180 dias)

Os resultados mostraram que as plantas com seis meses cultivadas na presença de nitrato de amônio (Figura 37), apresentaram maior crescimento com 30 mM desta fonte nitrogenada. Em nenhuma das concentrações se observou mortalidade das plantas. Porém, apenas as plantas crescidas em 30 mM de N tiveram 28 % com formação de dois a cinco brotos (Figura 37). Não foi possível determinar o número de raízes, pois estavam muito emaranhadas ou enoveladas em todas as plantas cultivadas em todos os tratamentos.

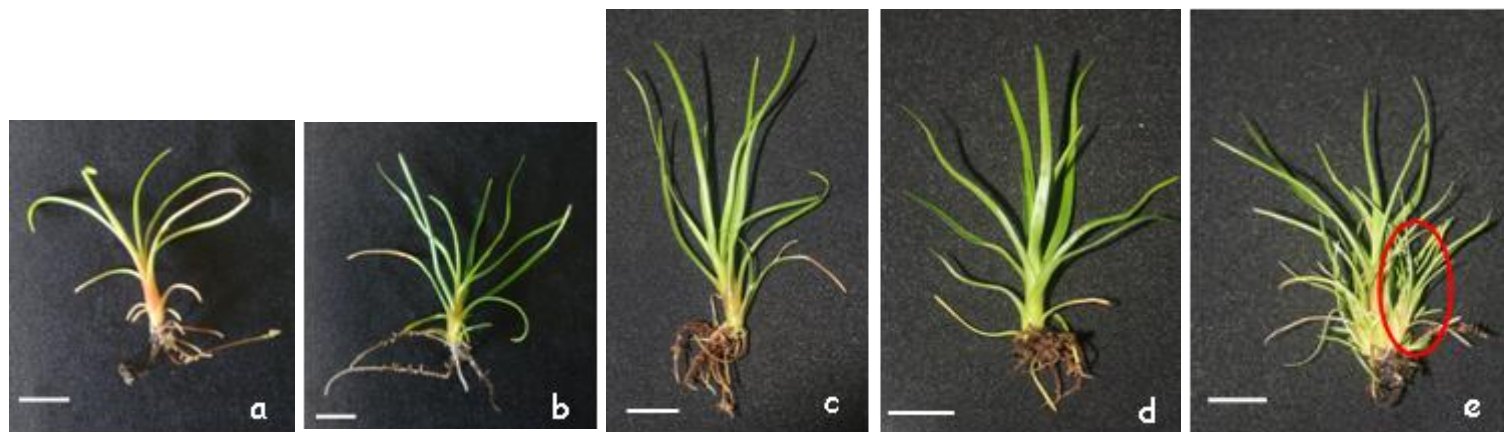


Figura 37: Aspectos das plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após seis meses de crescimento *in vitro* nos diferentes tratamentos de nitrato de amônio (NH_4NO_3) (a) Plantas cultivadas em 5 mM de NH_4NO_3 . (b) Plantas cultivadas em 15 mM de NH_4NO_3 . (c) Plantas cultivadas em 30 mM de NH_4NO_3 . (d) Plantas cultivadas em 60 mM de NH_4NO_3 . (e) Plantas cultivadas em 30 mM de NH_4NO_3 , em destaque o broto. Barra = 1 cm.

Nas concentrações de 30 e 60 mM de NH_4NO_3 , as plantas apresentaram as maiores médias de quantidade de folhas, porém no tratamento com 5 e 30 mM de NH_4NO_3 ocorreram as maiores médias de folhas mortas ($5,45 \pm 1,43$) quando comparado aos demais tratamentos (Tabela 16).

Com relação ao comprimento da parte aérea (Tabela 16), as maiores folhas ocorreram em 30 mM de NH_4NO_3 , esta mesma tendência se observa para a massa fresca e seca da parte aérea (Tabela 16).

Tabela 16

Número de folhas, número de folhas mortas, comprimento da parte aérea (cm) e quantidades de massa fresca (MF) (mg) e massa seca (MD) (mg) da parte aérea de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, após seis meses de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de nitrato de amônio (NH_4NO_3).

Parâmetros analisados	Tratamentos (mM de NH_4NO_3)			
	5	15	30	60
Número de folhas	6 c	6 c	10 a	9 a
Número de folhas mortas	5 a	2 b	4 a	2 b
Comprimento da parte aérea (cm)	8,25 d	10,33 c	13,53 a	12,47 b
Massa fresca (MF) da parte aérea por planta (mg)	297 c	236 c	683 a	520 b
Massa seca (MD) da parte aérea por planta (mg)	35 c	22 d	59 a	41 b

Letras comparam os valores na horizontal e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nas análises dos pigmentos fotossintéticos (Figura 38), nas concentrações de 30 e 60 mM de NH_4NO_3 , as plantas apresentaram as maiores quantidades dos três tipos de pigmentos analisados.

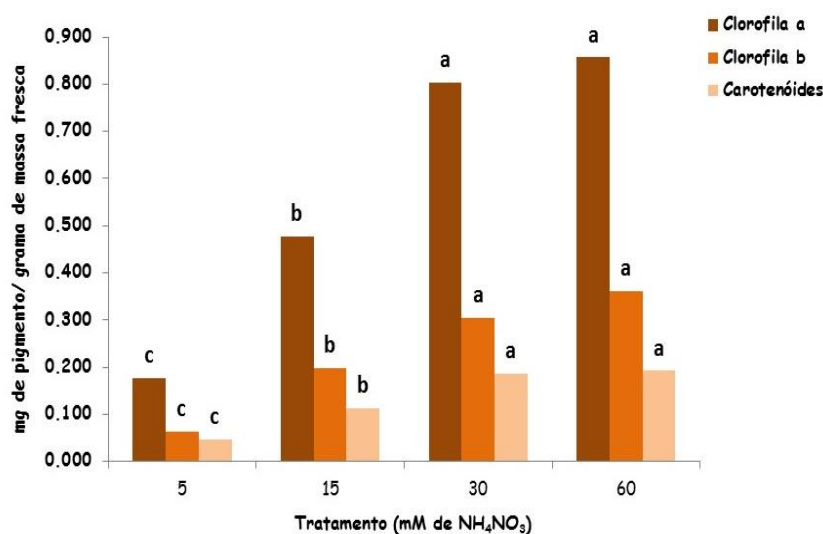


Figura 38: Quantidade de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b* e carotenóides) nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após seis meses de cultivo *in vitro* nas concentrações 5, 15, 30 e 60 mM de nitrato de amônio (NH_4NO_3). A quantidade de pigmento foi expressa em mg do pigmento por grama de massa fresca. Letras diferentes indicam que os dados são significativamente diferentes de acordo com o teste Tukey a 5 % de probabilidade para um mesmo pigmento.

Quanto ao parâmetro comprimento da raiz (Tabela 17), as plantas dos tratamentos 5 e 15 mM de NH_4NO_3 apresentaram os maiores valores, porém em relação a massa fresca e seca as plantas apresentaram os menores valores (Tabela 17).

Tabela 17

Comprimento da raiz (cm), quantidades de massa fresca (MF) (g) e massa seca (MD) (g) da raiz de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, após seis meses de cultivo em diferentes concentrações de nitrato de amônio (NH_4NO_3).

Parâmetros analisados	Tratamentos (mM de NH_4NO_3)			
	5	15	30	60
Comprimento da raiz (cm)	4,65 a	4,31 a	2,57 b	2,13 b
Massa fresca (MF) da raiz por planta (mg)	75 b	100 ab	116 a	125 a
Massa seca (MD) da raiz por planta (mg)	8 b	8 b	12 a	11 a

Letras comparam os valores na horizontal e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação à análise foliar de macronutrientes apenas foram feitas as análises nas plantas crescidas em 30 e 60 mM de NH_4NO_3 (Tabela 18), pois nos demais tratamentos não

foi possível a obtenção de massa seca suficiente. Além disto, não foi possível a análise de micronutrientes.

Os resultados mostraram que o incremento de N exógeno reflete no aumento endógeno deste elemento, sendo a maior quantidade observada em 60 mM de NH_4NO_3 (Tabela 18).

A análise dos macronutrientes foliares sugeriu uma interferência do N sobre a quantidade dos outros macronutrientes analisados, pois eles tiveram as suas concentrações endógenas modificadas conforme o incremento de N (Tabela 18), visto que a quantidade fornecida destes macronutrientes no meio de cultura foi a mesma em todos os tratamentos (Tabela 3).

Em relação às concentrações endógenas foliares de P, K, Mg e S, em 60 mM de NH_4NO_3 , as concentrações destes elementos se mantiveram maiores quando comparadas a 30 mM de NH_4NO_3 (Tabela 18).

Apenas com relação ao Ca nas plantas crescidas nas concentrações de 30 mM de NH_4NO_3 , seus teores endógenos foram maiores quando comparados aos outros tratamentos (Tabela 18).

Tabela 18

Concentrações de macronutrientes (μg de nutriente/ grama de massa seca) em plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, após seis meses de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de nitrato de amônio (NH_4NO_3).

Tratamentos (mM de NH_4NO_3)	Macronutrientes (μg de nutrientes por grama de massa seca)					
	N	P	K	Ca	Mg	S
30	47597,34*	7177,12*	26153,85*	6362,77*	1709,40*	6926,76*
60	85967,93*	10228,39*	31296,02*	6136,48*	1840,94*	7475,90*

*não houve massa suficiente para fazer mais de uma amostra, portanto não foi possível fazer a análise estatística.

Letras comparam os valores na vertical e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados mostram que as plantas crescidas em 60 mM de NH_4NO_3 tiveram um aumento no crescimento, sugerindo que houve um aumento na absorção dos macronutrientes, o que pode ter auxiliado no crescimento das plantas nesta concentração (Tabela 18).

Analisando os resultados, juntamente com o aspecto geral das plantas utilizadas neste experimento, sugere-se que a concentração contendo 30 mM de NH_4NO_3 seja a mais indicada para o cultivo *in vitro* da espécie após seis meses, porém neste mesmo tratamento, as plantas

multiplicaram com isso a concentração de 60 mM de NH_4NO_3 foi escolhida como a mais adequada para otimizar o crescimento.

As atividades da RN medidas nas folhas crescidas na concentração de 60 mM de NH_4NO_3 apresentaram a menor atividade, como se observa na figura 38a, porém as atividades da GS e GDH medidas nas folhas cultivadas nas concentrações de 30 e 60 mM de NH_4NO_3 apresentaram as maiores atividades (Figura 39b-c).

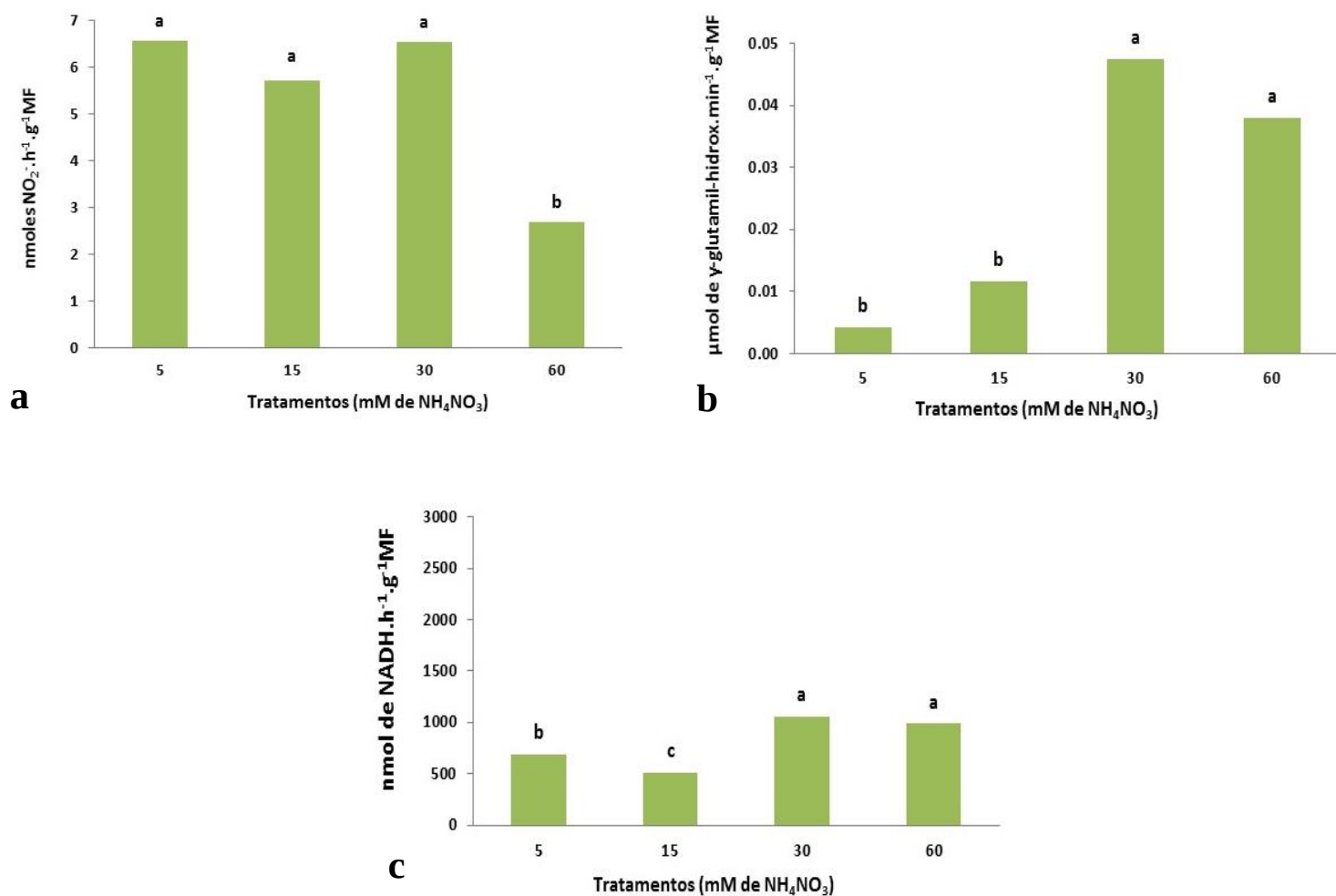


Figura 39: Atividade *in vivo* da redutase do nitrato (RN) (a), atividade *in vitro* da sintetase da glutamina (GS) (b) e da desidrogenase do glutamato (GDH-NADH) (c) nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms no sexto mês de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de nitrato de amônio (NH_4NO_3). A atividade enzimática da RN foi expressa em $\text{nmol NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$, da GS foi expressa em $\mu\text{mol de } \gamma\text{-glutamil-hidrox.} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$ e da GDH-NADH foi expressa em $\text{nmol de NADH} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas em 5% de probabilidade pelo teste Tukey entre os tratamentos.

Não houve diferenças estatísticas na quantidade endógena de amônio nas folhas cultivadas em diferentes concentrações de nitrato de amônio (Figura 40a).

Quando se observa a figura 40b, os tratamentos de 30 e 60 mM de NH_4NO_3 apresentaram os maiores valores de quantidade endógena de nitrato, nas folhas.

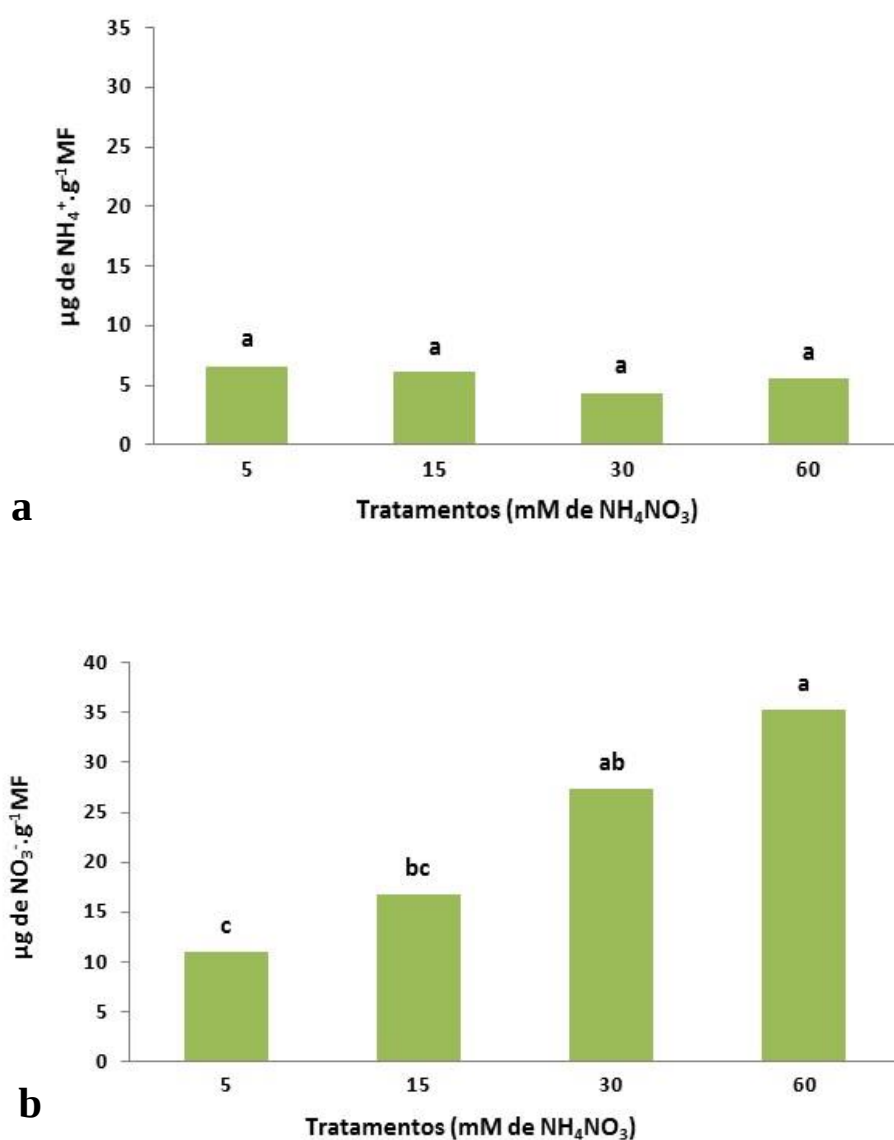


Figura 40: Quantidade de amônio (a) e nitrato (b) endógeno nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms no sexto mês de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de nitrato de amônio (NH_4NO_3). A quantidade de amônio foi expressa em $\mu\text{grama de } \text{NH}_4^+ \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$ e de nitrato foi expressa em $\mu\text{grama de } \text{NO}_3^- \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas em 5% de probabilidade pelo teste Tukey entre os tratamentos.

As plantas crescidas em 30 e 60 mM de NH_4NO_3 apresentaram as maiores quantidades de proteínas solúveis e de aminoácidos totais nas folhas de *A. imperialis* (Figura 41).

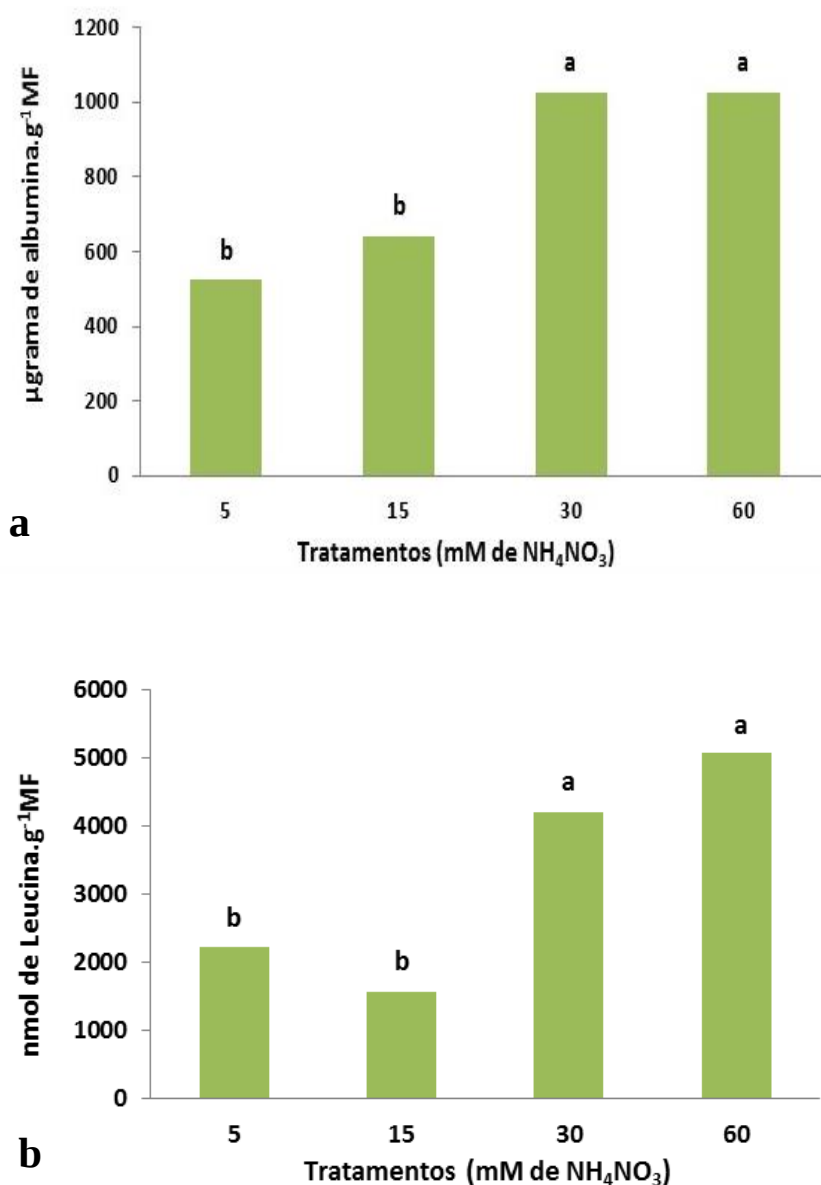


Figura 41: Proteínas solúveis (a) e aminoácidos totais (b) nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms no sexto mês de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações nitrato de amônio (NH_4NO_3). A quantidade de proteínas foi expressa em $\mu\text{grama de albumina.g}^{-1}\text{MF}$ e de aminoácidos foi expressa em nmol de leucina.g⁻¹MF. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas em 5% de probabilidade pelo teste Tukey entre os tratamentos.

A concentração de 30 mM de nitrato de amônio foi o meio indutor de multiplicação escolhido, mesmo não sendo o único em que as plantas multiplicaram, pois no tratamento de 5mM de NH_4^+ as plantas, também, multiplicaram, mas apresentaram alta taxa de mortalidade.

De modo geral, ao analisar todos os resultados das plantas cultivadas aos 180 dias, parece que o crescimento das plantas apenas com amônio ou nitrato começou a ser prejudicado, visto a alta atividade da GDH em relação aos demais tratamentos. E há fortes indícios de que as duas fontes nitrogenadas juntas favorecem o crescimento das plantas mesmo sob cultivo *in vitro* por 180 dias, como mostraram Guimarães *et al.*, (2014) e Ribeiro *et al.*, (2012), apesar de ter ocorrido multiplicação em 28% das plantas.

V.11) Crescimento das plantas no experimento final

Os resultados mostraram que as plantas crescidas em 15 mM de NO_3^- e 30 mM de NH_4NO_3 foram escolhidos como o tratamento controle e tratamento indutor, respectivamente.

Com isso as plântulas germinadas, foram transferidas para o meio indutor, e lá permaneceram até o aparecimento dos brotos (um mês), os quais foram separados e colocados no tratamento controle.

Os resultados mostraram houve uma taxa de multiplicação de 28% e cada planta apresentou cerca de 3 a 4 brotos (Figura 42), os quais foram isolados dando origem a novas plantas (97% de sobrevivência), aumentando cerca de três vezes o número de plantas.



Figura 42: Aspecto da planta de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após um mês de cultivo *in vitro* no meio de cultura indutor de multiplicação (30 mM de NH_4NO_3), em destaque o broto que foi isolado. Barra = 1 cm.

Um fato interessante que se observou é que algumas das plantas, das quais os brotos foram retirados, mesmo no meio de crescimento, deram origem a novos brotos (Figura 43), sugerindo que os processos fisiológicos que atuam na multiplicação ainda estavam ativos nestas plantas. Este fato sugere-se que a planta- mãe ainda tenha uma quantidade endógena de citonina que estimula o desenvolvimento dos brotos, como foi demonstrato por Villa *et al.*, (2005), que na presença de BAP, uma citocinina, houve um aumento no número de brotos.

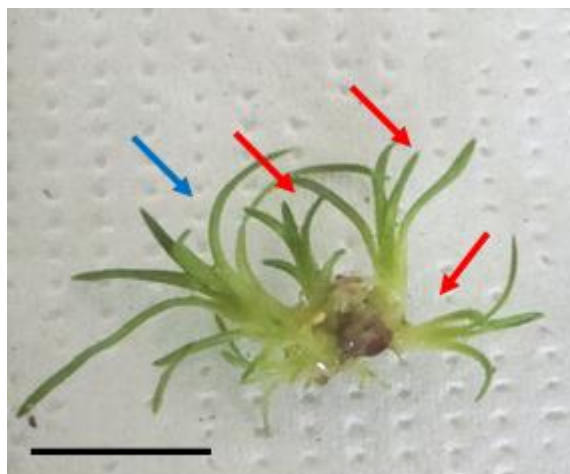


Figura 43: Aspecto da planta de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após um mês de cultivo *in vitro* no meio de cultura para crescimento (15 mM de NO_3^-) após a retirada dos brotos iniciais. A seta azul indica a planta mãe e as setas vermelhas indicam os novos brotos originados. Barra = 1 cm.

Observou-se que as plantas originárias dos brotos (Figura 44) apresentaram 2,80 cm de comprimento de folha, com oito folhas e com a raiz medindo 0,70 cm. As massas fresca (MF) e seca (MD) da parte aérea das plantas foram em média 0,030 g/planta e 0,002 g/planta, respectivamente, e as raízes apresentaram aproximadamente 0,005 g/planta de MF e 0,0005 g/planta de MD.

Em relação aos pigmentos fotossintéticos, as plantas apresentaram $418,18 \mu\text{g.g}^{-1}\text{MF}$ de clorofila *a*, $164,60 \mu\text{g.g}^{-1}\text{MF}$ de clorofila *b* e $116,99 \mu\text{g.g}^{-1}\text{MF}$ de carotenóides, não apresentaram clorose, nem folhas senescentes (Figura 44), mostrando que o meio utilizado para o crescimento dos brotos isolados (15 mM de NO_3^-) continha nitrogênio suficiente para a sobrevivência dos brotos, mesmo sem as reservas provenientes da planta mãe.



Figura 44: Aspecto da planta de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms originária de um broto após um mês de cultivo *in vitro* no meio de cultura para crescimento (15 mM de NO_3^-). Barra = 1 cm.

V.12) Análises anatômicas

As características anatômicas do caule de *Alcantarea imperialis* corroboram, em geral, com as informações apresentadas por diversos autores para espécies da família Bromeliaceae (Krauss, 1948; Lobo, 2007; Dettke *et al.*, 2008; Elbl, 2012).

Uma planta cultivada no meio de germinação contendo 3% de sacarose e água, antes da transferência para o meio controle (15 mM de NO_3^-) e meio indutor de multiplicação (30 mM de NH_4NO_3), pode ser observada na Figura 1. As análises anatômicas mostraram que o eixo caulinar apresenta entrenós extremamente curtos (Figura 45), como em outras espécies de bromélia relatadas na literatura (Krauss, 1948; Lobo, 2007; Dettke *et al.*, 2008). Além disto, as folhas são imbricadas, como observadas em *Ananas comosus* (L.) Merr. (Krauss, 1948) e em *Bromelia antiacantha* Bertol. (Dettke *et al.*, 2008), determinando o aspecto rosetado dos indivíduos (Figura 1).

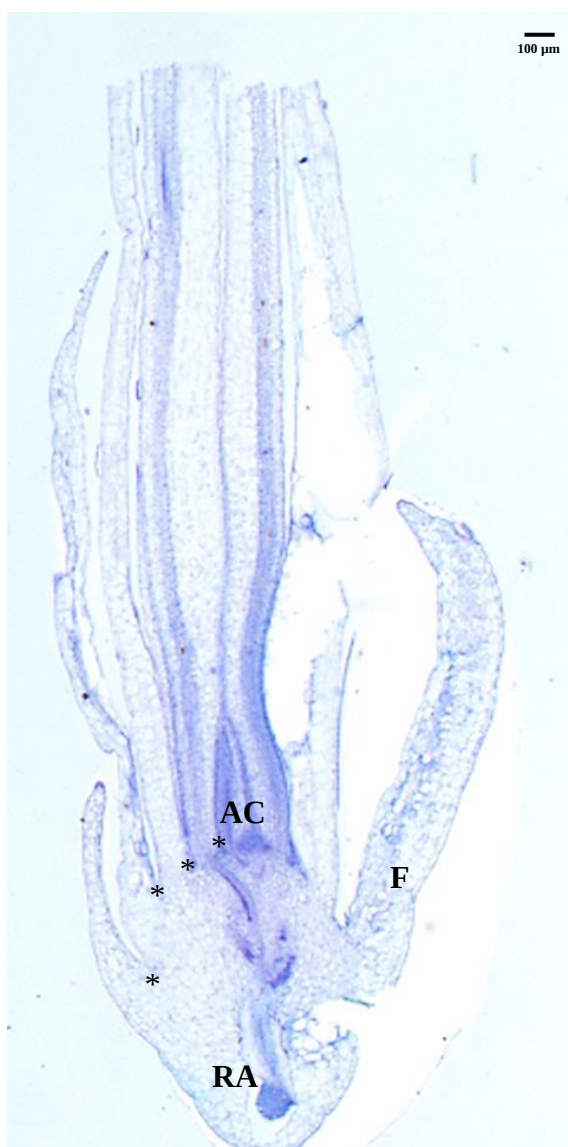


Figura 45: Seção longitudinal do caule de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms com 45 dias de cultivo *in vitro* no meio de germinação. AC = ápice caulinar, F = folha, RA = raiz adventícia. * nó.

O caule apresenta orientação vertical, é revestido pela epiderme uniestratificada e possui feixes vasculares distribuídos aleatoriamente no parênquima fundamental assim como idioblastos contendo ráfides (Figuras 46 e 47A-B), como observado por Dettke *et al.* (2008) em *B. antiacantha* Bertol. O ápice caulinar é plano com folhas compactadas que dá o aspecto bulboso ao órgão (Figura 47F), como Elbl (2012) observou em *Alcantarea forneyi*.

Gemas laterais podem ser observadas na axila das folhas (Figura 46B), como descrito também para *A. comosus* L. Merr (Krauss, 1948). Plantas com 3 dias de cultivo *in vitro* no tratamento de 15 mM de NO_3^- (controle) não apresentaram a formação de gemas na região basal do caule (Figura 47A), local em que normalmente são encontradas, assim como em todo o período de coleta (30 dias). No tratamento de 30 mM de NH_4NO_3 também não foi possível observar a formação de gemas na região basal de plantas com 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25 e 30 dias de cultivo *in vitro*, somente o broto já desenvolvido aos 30 dias (Figura 47I), corroborando com os resultados do Experimento Final, no qual após 30 dias houve a formação de brotos somente em 28% das plantas cultivadas, dificultando as análises anatômicas. Em *Tillandsia coronata* e *Guzmania monostachya* (L.) Rusby ex. Mez cultivadas *in vitro* sob a influência de reguladores de crescimento, Galeck & Kukczanka (1996) verificaram que a citocinina promoveu o desenvolvimento de centros meristemáticos e de caules adventícios.

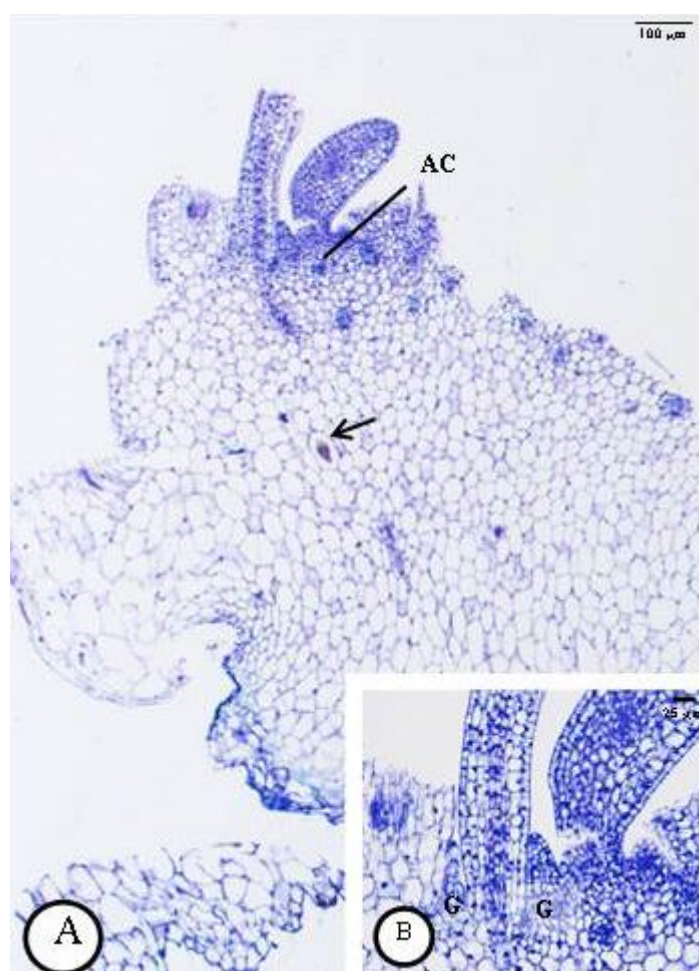


Figura 46: Seções longitudinais do caule de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms com 3 dias de cultivo *in vitro* no meio controle (15 mM de NO_3^-), mostrando a organização do eixo caulinar (A) e o detalhe das gemas laterais (B). AC = ápice caulinar, G = gema lateral, Ráfides (seta).

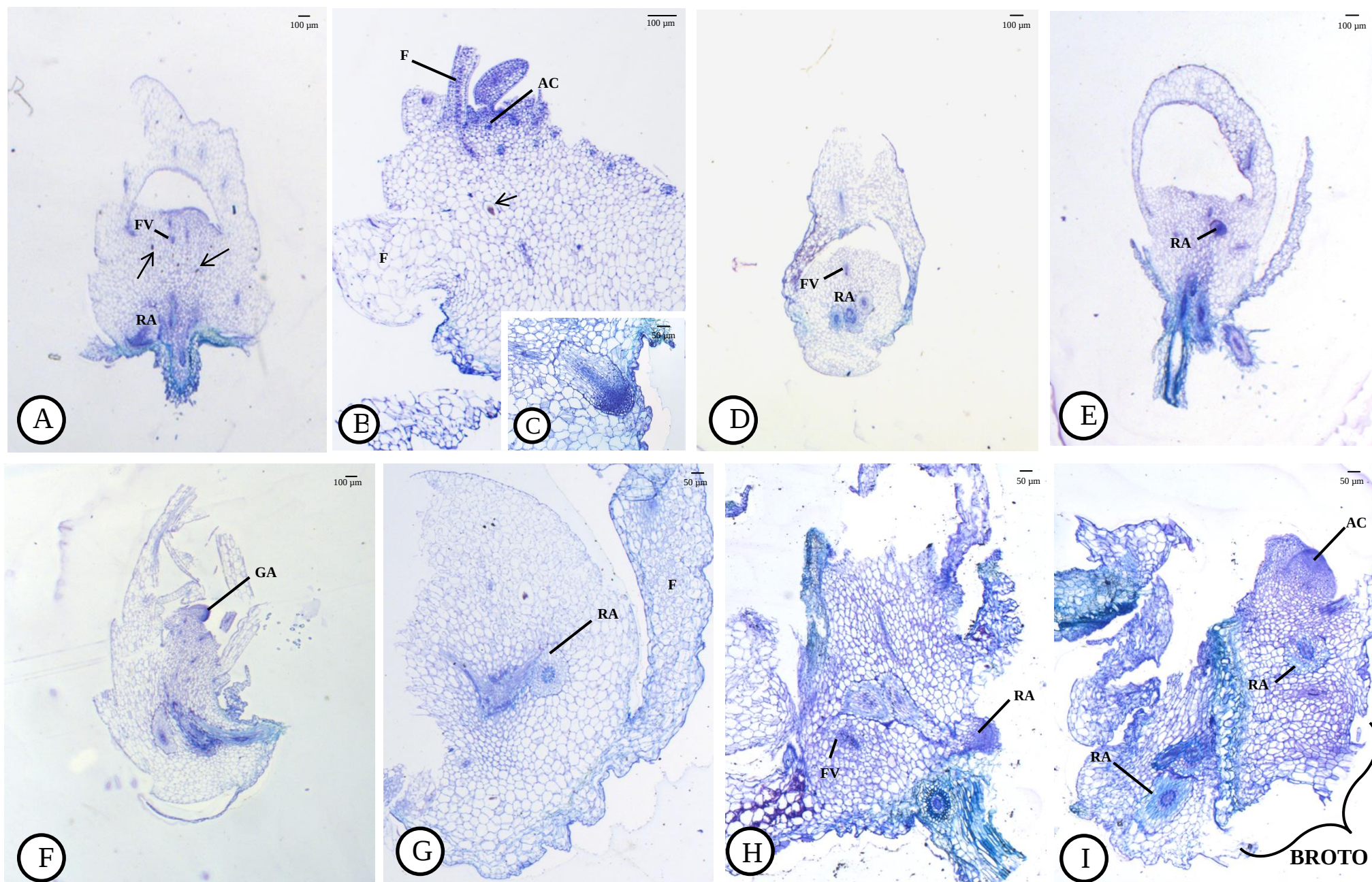


Figura 47: Cortes longitudinais do caule de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms com 3 (A), 6 (B, C), 9 (D), 12 (E), 15 (F), 20 (G), 25 (H) e 30 dias (I) de cultivo *in vitro* no meio indutor de multiplicação (30 mM de NH_4NO_3). AC = ápice caulinar, F = folha, FV = feixe vascular, GA = gema apical, RA = raiz adventícia, Ráfides (setas).

A partir dos três dias de cultivo no meio indutor de multiplicação (30 mM de NH_4NO_3), já podem ser observados a formação e o desenvolvimento das raízes adventícias a partir do caule, as quais têm origem endógena (periciclo) e crescem basipetamente (Figura 47A-I). A raiz primária é geralmente efêmera, sendo a função de absorção/fixação desempenhada pelo sistema radicular adventício, assim como observado em *Ananas comosus* (L.) Merr. (Krauss, 1949). Em *Dyckia brevifolia* Bertol. (Lobo, 2007), as raízes também estão relacionadas com a absorção de nutrientes e a fixação das plantas nas fissuras das rochas e, visto que *A. imperialis* é uma espécie rupícola (Versieux & Wanderley, 2007), tais funções também são exercidas pelo sistema radicular dessa espécie.

Durante as coletas, observou-se que havia diferença na coloração das raízes, as quais eram escuras e claras (Figura 48).

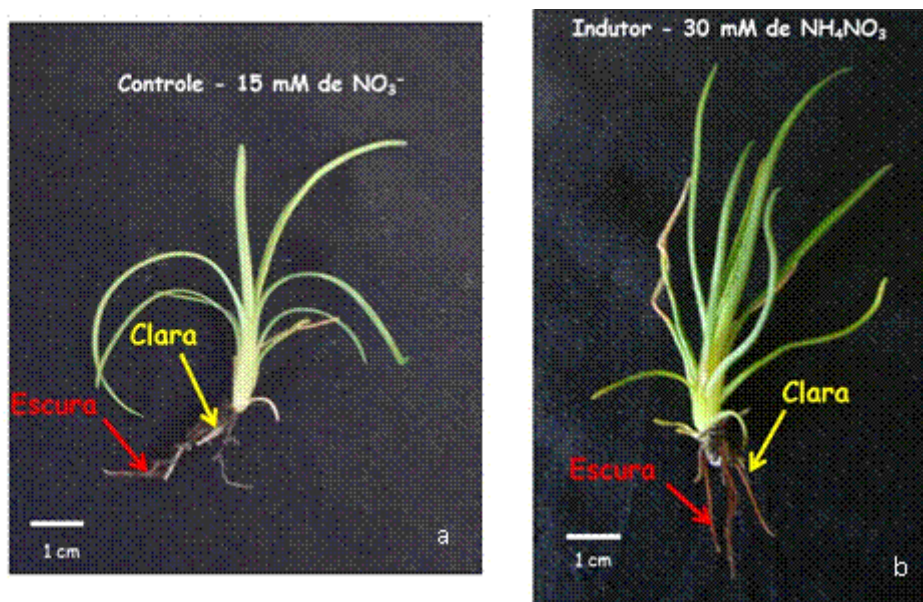


Figura 48: Aspecto da planta de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 90 dias de cultivo *in vitro* no (a) meio de cultura para crescimento (15 mM de NO_3^-) e no (b) meio de cultura indutor de multiplicação (30 mM de NH_4NO_3). A seta vermelha indica as raízes escuras e seta amarela indica as raízes claras. Barra=1 cm.

Estruturalmente, ambas as raízes apresentam velame, córtex diferenciado (externo, mediano e interno) e cilindro vascular (Figuras 49 e 50), como observaram Silva & Scatena (2011) em espécies de bromélias da região amazônica.

Na região apical, as raízes escuras e claras não apresentaram diferenças estruturais entre si e também entre os tratamentos (meio controle e meio indutor) (Figuras 49A-B e 50A-B). Já nas regiões mediana e basal, as raízes cultivadas no meio controle (15 mM de NO_3^-) apresentaram diferença no formato das células do velame, cujas paredes eram sinuosas nas raízes escuras (Figura 49C-D) e retas nas raízes claras (Figura 49E-F). Nas plantas cultivadas no meio indutor de multiplicação (30 mM de NH_4NO_3), as raízes na região mediana apresentaram velame com células de paredes retas nas raízes escuras e paredes sinuosas nas

raízes claras (Figura 50C-D). Já na região basal, tanto as raízes claras quanto as escuras possuíam as células do velame com paredes sinuosas (Figuras 50E-F).

Na porção mais distal da região apical da raiz, podem ser observados a protoderme, o procâmbio e o meristema fundamental, no qual podem ser visualizados idioblastos com ráfides formando fileiras longitudinais (Figuras 49A-B e 50A-B). O velame é multiestratificado, constituído por células com paredes finas e formato variável (Figuras 49C-F e 50C-F). Nas raízes terrestres de *Dyckia* e *Encholirium*, a presença de velame está relacionada com a adaptação dessas plantas ao ambiente xérico (Pita & Menezes, 2002). O epivelame (camada mais externa do velame) é uniestratificado e possui pelos radiculares, principalmente na região apical da raiz (Figuras 49A-B e 50A-B). Essa característica também foi observada em *Tillandsia* sp., sendo interpretada como estratégia para aumentar a superfície de absorção da água, visto que essa espécie possui hábito rupícola, ficando exposta à insolação direta e ventos constantes, em locais onde o escoamento de água da chuva é rápido (Segecin & Scatena, 2004).

O córtex das raízes de *A. imperialis* pode ser diferenciado em externo, mediano e interno. Na região apical, não ocorre o espessamento da parede das células corticais. Na região mediana das raízes de plantas cultivadas em 15 mM de NO_3^- (Figura 49B-C) e 30 mM de NH_4NO_3 (Figura 50B-C), esta diferenciação não é muito evidente, sendo possível visualizar somente o córtex externo e interno. Entretanto, nas raízes de espécies de *Tillandsia*, Segecin & Scatena (2004) e Silva & Scatena (2011) observaram somente a presença de córtex mediano e interno. Para a região basal das raízes de ambos os tratamentos, o córtex apresenta as três regiões diferenciadas. No córtex externo, a exoderme apresenta duas a quatro camadas de células com paredes lignificadas (Figuras 49B-E e 50B-E), já no córtex mediano as paredes das células são mais finas e, no córtex interno, as células podem apresentar grandes espaços intercelulares, constituindo as lacunas de ar (Figuras 49E-F e 50E-F), como observado por Segecin & Scatena (2004) em espécies de *Tillandsia*. De acordo com Pita & Menezes (2002), o espessamento da parede das células corticais depende do hábito da planta (rupícola, terrícola ou epífita), sendo mais espessa nas epífitas. A endoderme, última camada do córtex, possui células de paredes com espessamento em “U” (Figuras 49C-F e 50C-F).

O cilindro vascular, delimitado pelo periciclo constituído por células com paredes finas, é poliarco na região basal, formado pelos cordões de xilema alternados com os cordões de floema (Figuras 49E-F e 50E-F), como nas raízes de *Aechmea*, *Dyckia* e *Tillandsia* estudadas por Silva & Scatena (2011).

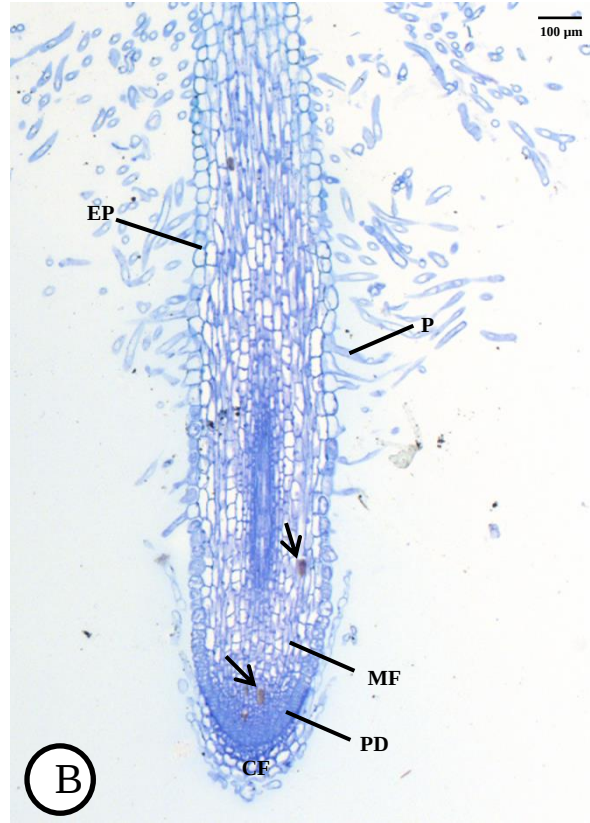
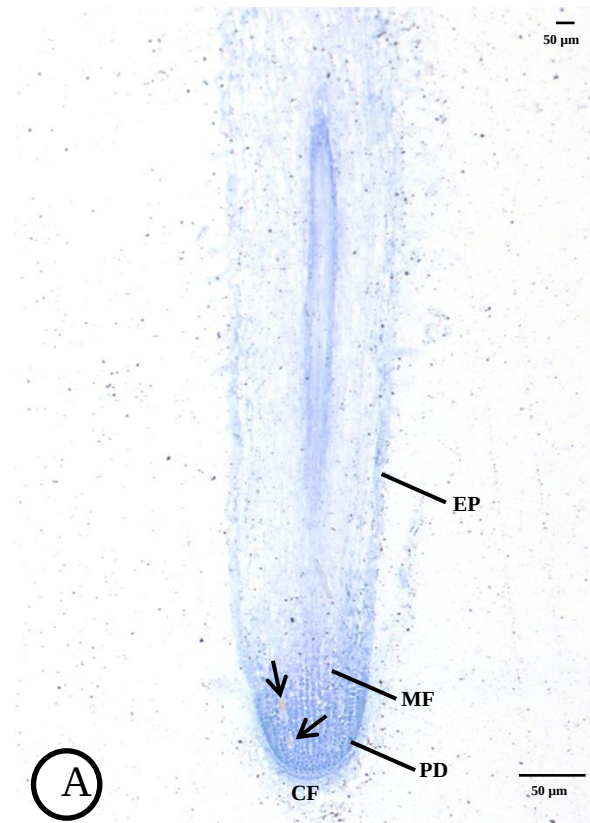
Os resultados mostraram também que na concentração de 30 mM de NH_4NO_3 as plantas, cultivadas *in vitro*, apresentaram a formação de brotos, pois na combinação das duas fontes, o

nitrato pode inibir os efeitos negativos do amônio e servir como sinalizador da citocinina que pode ter levado à multiplicação das plantas. Com isso, pode-se concluir ser possível multiplicar a bromélia *A.imperialis* sem o uso de hormônios vegetais, utilizando-se 30 mM de NH_4NO_3 , o que reduz o custo de produção, e pode contribuir para a conservação desta planta, que é uma espécie ameaçada de extinção e amplamente utilizada no paisagismo. Entretanto, do ponto de vista anatômico, não foi possível acompanhar a ontogenia das gemas, somente foi possível visualizar o broto já desenvolvido em plantas cultivadas no meio indutor de multiplicação (30 mM de NH_4NO_3), devido à baixa porcentagem de brotação das plantas. Em relação ao sistema radicular, houve diferença estrutural entre as raízes escuras e claras, com as raízes escuras apresentando células do velame com paredes sinuosas, diferentemente do padrão no qual as células apresentam paredes retas. O tratamento controle (15 mM de NO_3^-), considerado a melhor concentração e fonte nitrogenada para o crescimento das plantas *in vitro*.

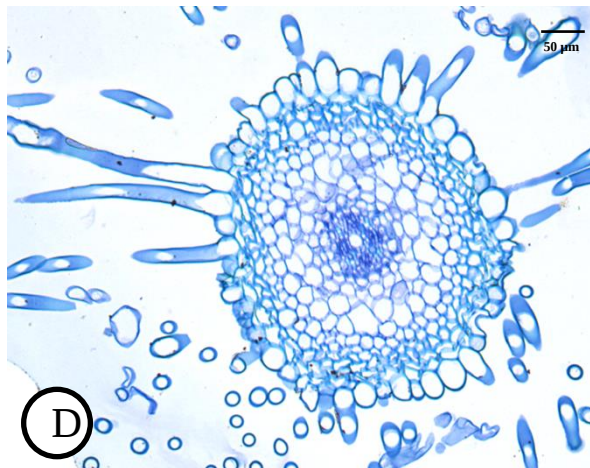
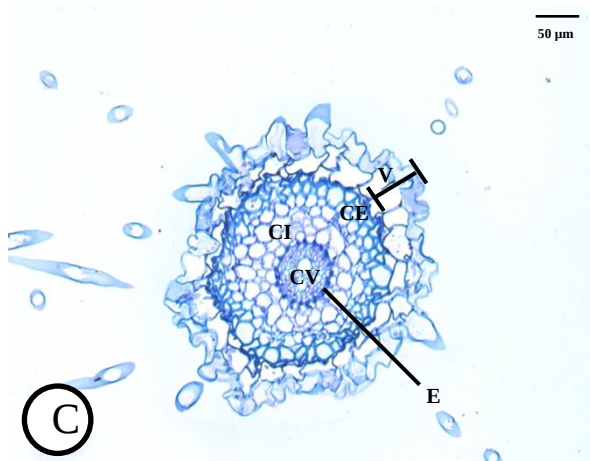
Escura

Clara

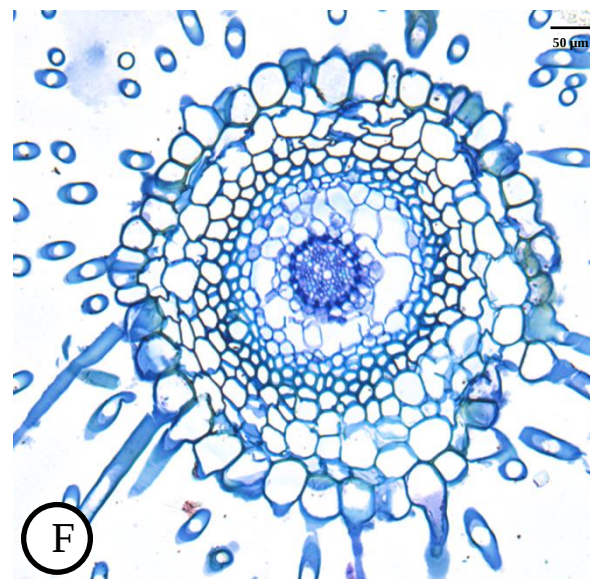
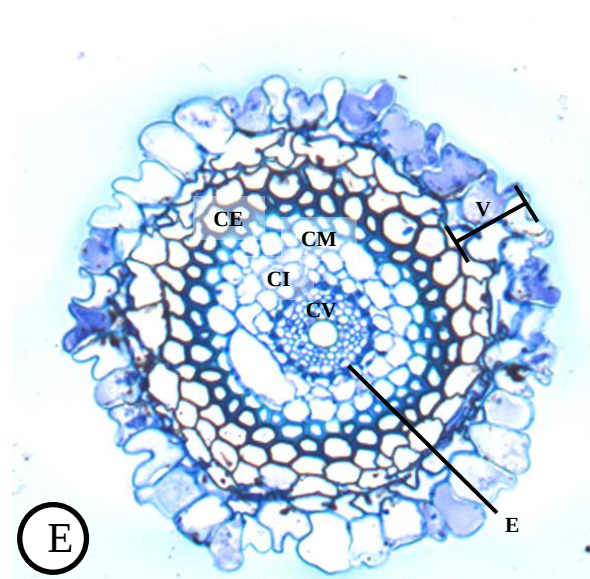
84



Apical



Mediana



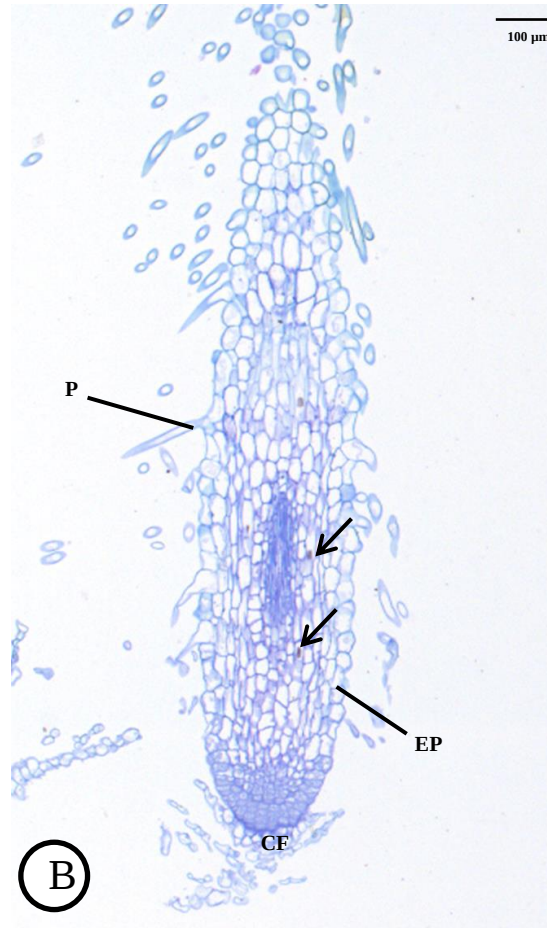
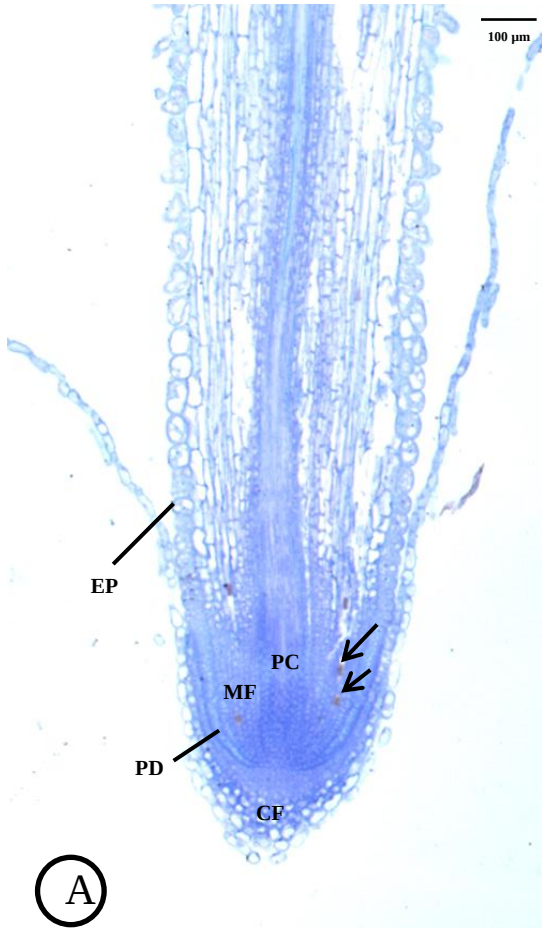
Basal

Figura 49: Seções longitudinais do ápice da raiz escura (A) e clara (B) e cortes transversais da região mediana da raiz escura (C) e clara (D) e da região basal da raiz escura (E) e clara (F) de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms com 90 dias no cultivo *in vitro* no meio controle (15 mM de NO_3^-). CE = côrtex externo, CF = coifa, CI = côrtex interno, CM = côrtex mediano, CV = cilindro vascular, E = endoderme, EP = epiderme, MF = meristema fundamental, P = pêlo radicular, PD = protoderme, V = velame. Ráfides (setas).

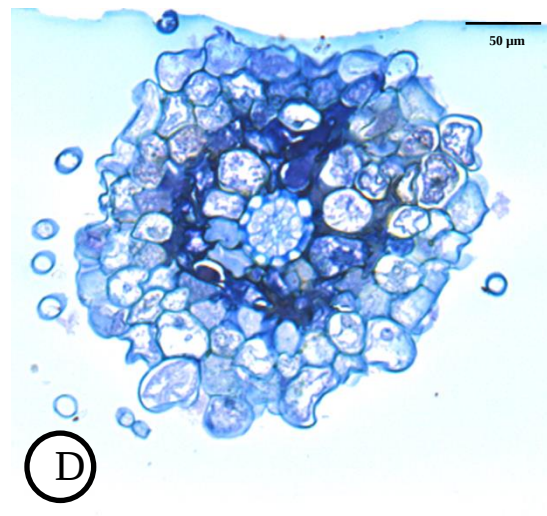
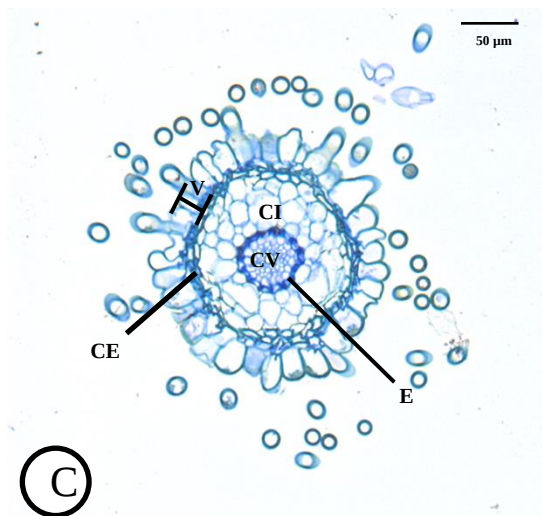
Escura

Clara

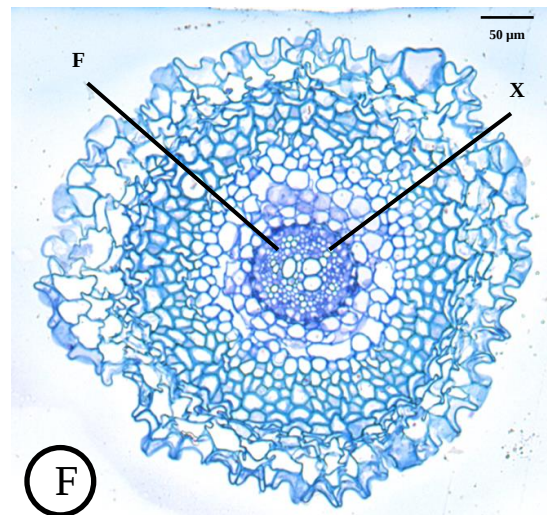
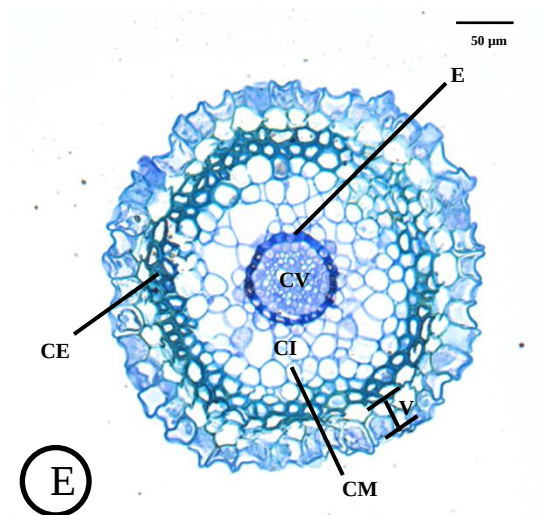
85



Apical



Mediana



Basal

Figura 50: Seções longitudinais do ápice da raiz escura (A) e clara (B) e cortes transversais da região mediana da raiz escura (C) e clara (D) e da região basal da raiz escura (E) e clara (F) de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms com 90 dias no cultivo *in vitro* no meio indutor (30 mM de NH_4NO_3). CE = côrtex externo, CF = coifa, CI = côrtex interno, CM = côrtex mediano, CV = cilindro vascular, E = endoderme, EP = epiderme, F = floema, MF = Meristema fundamental, PC = procâmbio, PD = protoderme, X = xilema, Ráfides (setas).

V.13) Crescimento das plantas em ambiente controlado no tempo zero (T0)

Observou-se que as plantas germinadas apenas com água apresentaram, após 45 dias, 1,55cm, com seis folhas, com a raiz medindo 0,39 cm. A massa fresca (MF) e seca (MD) da parte aérea das plantas foram em média 0,013 g/planta e 0,0008 g/planta, respectivamente, as raízes apresentaram aproximadamente 0,0012 g/planta de MF e 0,0001 g/planta de MD, por terem uma massa muito baixa de raízes, não foi possível realizar as coletas para os ensaios bioquímicos neste órgão da planta no T0. Em relação aos pigmentos fotossintéticos, as plantas apresentaram 0,225 mg.g⁻¹ MF de clorofila a, 0,084 mg.g⁻¹ MF de clorofila b e 0,055 mg.g⁻¹ MF de carotenóides, mostrando que mesmo sendo germinadas apenas com água não apresentaram clorose, nem folhas senescentes (Figura 51) e não apresentaram mortalidade. Porém as plantas *in vitro* (Figura 2) apresentaram-se com crescimento maior.



Figura 51: Aspecto da planta de *A.imperialis* após 45 dias germinando em placa de Petri contendo apenas com água. Barra= 1 cm

IV.14) Crescimento das plantas em ambiente controlado por 3 meses (90 dias)

Amônio (NH₄⁺), como fonte nitrogenada

Os resultados mostraram que nas concentrações de 5 mM de NH₄⁺ as plantas cresceram mais e apresentaram-se com aspecto mais vigoroso (Figura 52).



Figura 52: Aspectos das plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após três meses de crescimento em ambiente controlado nos diferentes tratamentos de amônio (NH_4^+) (a) Plantas cultivadas em 5 mM de NH_4^+ . (b) Plantas cultivadas em 15 mM de NH_4^+ . (c) Plantas cultivadas em 30 mM de NH_4^+ . (d) Plantas cultivadas em 60 mM de NH_4^+ . Barra = 1 cm.

Não se observou diferenças estatísticas no parâmetro número de folhas entre os tratamentos (Tabela 19).

Com relação ao comprimento da parte aérea (Tabela 19), as menores folhas ocorreram nas plantas cultivadas na concentração de 15 mM de NH_4^+ ($1,73 \pm 0,20$ cm) e as maiores folhas em 30 mM de NH_4^+ ($2,44 \pm 0,35$ cm). Em relação às massas fresca e seca observaram-se nas plantas crescidas em 5 mM de NH_4^+ os maiores valores de médias (39 ± 10 mg/planta de MF e 7 ± 1 mg /planta de MS) (Tabela 19).

Tabela 19

Número de folhas, comprimento da parte aérea (cm) e quantidades de massa fresca (MF) (mg) e massa seca (MD) (mg) da parte aérea de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, após três meses de cultivo em ambiente controlado em diferentes concentrações de amônio (NH_4^+).

Parâmetros analisados	Tratamentos (mM de NH_4^+)			
	5	15	30	60
Número de folhas	7 a	6 a	7 a	6 a
Comprimento da parte aérea (cm)	2,17 a	1,73 b	2,44 a	1,80 b
Massa fresca (MF) da parte aérea por planta (mg)	39 a	15 c	38 ab	22 bc
Massa seca (MD) da parte aérea por planta (mg)	7 a	3 b	3 b	3 b

Letras comparam os valores na horizontal e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nas análises dos pigmentos fotossintéticos (Figura 53), para a clorofila *a* e *b* não se observaram diferenças estatísticas, porém para carotenóides, os menores valores foram observados nas concentrações de 15 e 30 mM de NH_4^+ .

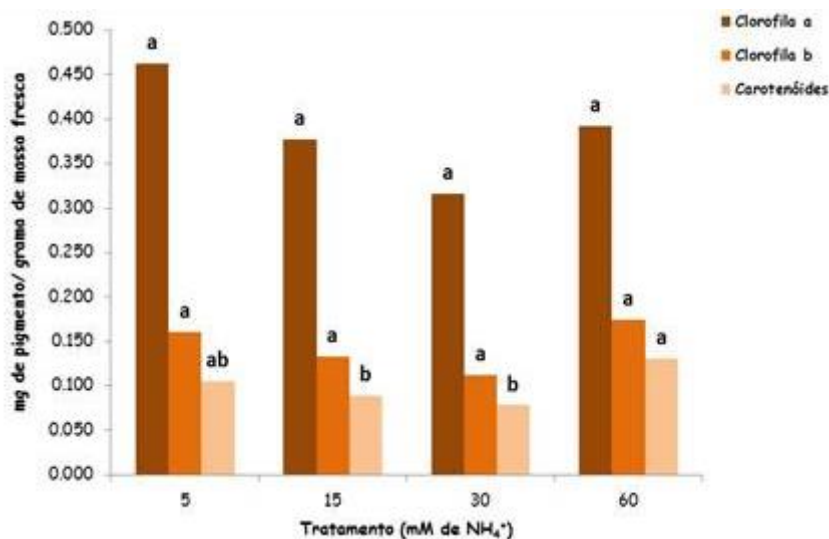


Figura 53: Quantidade de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b* e carotenóides) nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após três meses de cultivo em ambiente controlado nas concentrações 5, 15, 30 e 60 mM de amônio (NH_4^+). A quantidade de pigmento foi expressa em mg do pigmento por grama de massa fresca. Letras diferentes indicam que os dados são significativamente diferentes de acordo com o teste Tukey a 5 % de probabilidade para um mesmo pigmento.

Quanto ao parâmetro comprimento da raiz (Tabela 20), na concentração de 30 mM de NH_4^+ ($1,24 \pm 0,45$ cm) as plantas tiveram os maiores valores de médias.

Em relação às massas fresca e seca da parte radicular (Tabela 20), na concentração de 30 e 15 mM de NH_4^+ as plantas apresentaram as maiores médias ($2,3 \pm 0,1$ mg de massa fresca/planta e $1,1 \pm 0,1$ mg de massa seca de raiz/planta), respectivamente.

Tabela 20

Comprimento da raiz (cm), quantidades de massa fresca (MF) (g) e massa seca (MD) (g) da raiz de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, após três meses de cultivo em ambiente controlado em diferentes concentrações de amônio (NH_4^+).

Parâmetros analisados	Tratamentos (mM de NH_4^+)			
	5	15	30	60
Comprimento da raiz (cm)	0,80 b	0,62 b	1,24 a	0,57 b
Massa fresca (MF) da raiz por planta (mg)	0,9 c	1,6 b	2,3 a	0,7 c
Massa seca (MD) da raiz por planta (mg)	0,3 b	1,1 a	0,8 b	0,4 b

Letras comparam os valores na horizontal e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resumindo, adubação com 5 mM de NH_4^+ dos sais utilizados no meio MS modificado promoveu um aumento no crescimento em ambiente controlado de plantas de *A. imperialis* por três meses, em relação à multiplicação, nenhum tratamento induziu a brotação da espécie em estudo.

Nitrato (NO_3^-), como fonte nitrogenada

Os resultados mostraram que na concentração de 60 mM de NO_3^- as plantas cresceram mais e apresentaram-se com aspecto mais vigoroso. Em nenhuma das concentrações se observou mortalidade das plantas (Figura 54).



Figura 54: Aspectos das plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após três meses de crescimento em ambiente controlado nos diferentes tratamentos de nitrato (NO_3^-) (a) Plantas cultivadas em 5 mM de NO_3^- . (b) Plantas cultivadas em 15 mM de NO_3^- . (c) Plantas cultivadas em 30 mM de NO_3^- . (d) Plantas cultivadas em 60 mM de NO_3^- . Barra = 1 cm.

Não se observou diferenças estatísticas no parâmetro número de folhas entre os tratamentos (Tabela 21).

Com relação ao comprimento da parte aérea (Tabela 21), as menores folhas ocorreram nas plantas cultivadas nas concentrações de 5 e 30 mM de NO_3^- ($2,71 \pm 0,81$ cm e $2,39 \pm 0,89$ cm, respectivamente) e as maiores folhas em 15 e 60 mM de NO_3^- ($2,99 \pm 0,63$ cm e $3,63 \pm 0,70$ cm, respectivamente). Em relação às massas fresca e seca da parte aérea as maiores médias observadas foram nas plantas cultivadas em 60 e 5 mM NO_3^- (92 ± 15 mg/planta de MF e 14 ± 2 mg /planta de MD, respectivamente).

Tabela 21

Número de folhas, comprimento da parte aérea (cm) e quantidades de massa fresca (MF) (mg) e massa seca (MD) (mg) da parte aérea de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, após três meses de cultivo em ambiente controlado em diferentes concentrações de nitrato (NO_3^-).

Parâmetros analisados	Tratamentos (mM de NO_3^-)			
	5	15	30	60
Número de folhas	9 ab	10 a	9 ab	10 a
Comprimento da parte aérea (cm)	2,71 b	2,99 ab	2,39 b	3,63 a
Massa fresca (MF) da parte aérea por planta (mg)	70 b	74 b	69 b	92 a
Massa seca (MD) da parte aérea por planta (mg)	14 a	5 b	7 b	5 b

Letras comparam os valores na horizontal e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nas análises dos pigmentos fotossintéticos (Figura 55), as plantas cultivadas em 5 mM de NO_3^- apresentaram os menores valores de clorofila a e b e carotenóides.

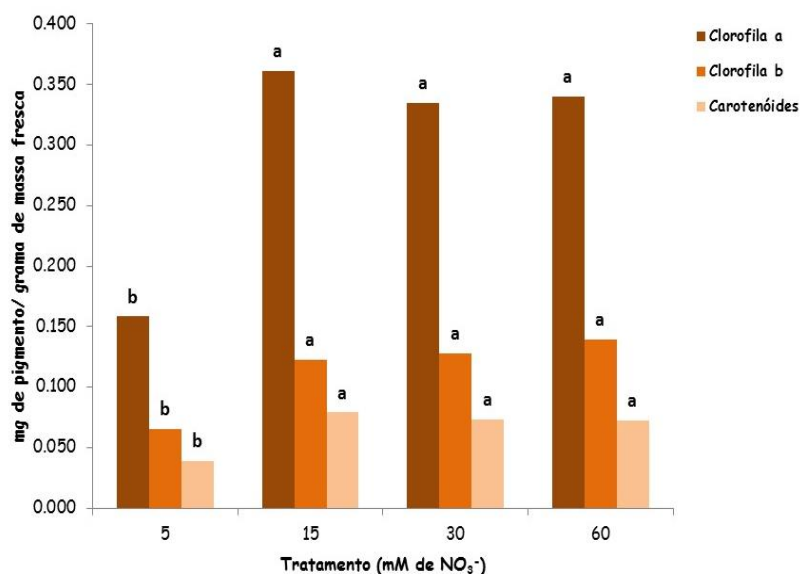


Figura 55: Quantidade de pigmentos fotossintéticos (clorofila a, b e carotenóides) nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após três meses de cultivo em ambiente controlado nas concentrações 5,15,30 e 60 mM de nitrato (NO_3^-). A quantidade de pigmento foi expressa em mg do pigmento por grama de massa fresca. Letras diferentes indicam que os dados são significativamente diferentes de acordo com o teste Tukey a 5 % de probabilidade para um mesmo pigmento.

Quanto ao parâmetro comprimento da raiz (Tabela 22), na concentração de 30 mM de NO_3^- ($0,54 \pm 0,15$ cm) as plantas tiveram as menores raízes.

Em relação às massas fresca e seca da parte radicular (Tabela 22), as menores médias foram encontradas na concentração de 5 mM de NO_3^- ($1,3 \pm 0,2$ mg/planta de MF e $0,3 \pm 0,07$ mg/planta de MD).

TABELA 22

Comprimento da raiz (cm), quantidades de massa fresca (MF) (mg) e massa seca (MD) (mg) da raiz de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, após três meses de cultivo em ambiente controlado em diferentes concentrações de nitrato (NO_3^-).

Parâmetros analisados	Tratamentos (mM de NO_3^-)			
	5	15	30	60
Comprimento da raiz (cm)	1,05 ab	1,27 a	0,57 b	1,23 a
Massa fresca (MF) da raiz por planta (mg)	1,3 b	4,2 ab	2,5 ab	5,5 a
Massa seca (MD) da raiz por planta (mg)	0,3 b	1,1 a	0,5 b	1,1 a

Letras comparam os valores na horizontal e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resumindo, a adubação com 60 mM de NO_3^- dos sais utilizados no meio MS modificado promoveu um aumento no crescimento em ambiente controlado de *A. imperialis* por três meses, em relação à multiplicação nenhum tratamento induziu a brotação da espécie em estudo.

Nitrato de amônio (NH_4NO_3), como fonte nitrogenada

Os resultados mostraram que as plantas crescidas nas quatro concentrações de NH_4NO_3 apresentaram um aspecto mais vigoroso (Figura 56). Em nenhuma das concentrações se observou mortalidade das plantas.



Figura 56: Aspectos das plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após três meses de crescimento em ambiente controlado nos diferentes tratamentos de nitrato de amônio (NH_4NO_3). (a) Plantas cultivadas em 5 mM de NH_4NO_3 . (b) Plantas cultivadas em 15 mM de NH_4NO_3 . (c) Plantas cultivadas em 30 mM de NH_4NO_3 . (d) Plantas cultivadas em 60 mM de NH_4NO_3 . Barra = 1 cm.

Não houve diferenças estatísticas para o parâmetro número de folhas (Tabela 23).

Com relação ao comprimento da parte aérea (Tabela 23), as menores folhas ocorreram nas plantas cultivadas na concentração de 60 mM de NH_4NO_3 , e as maiores folhas em 15 e 30 mM de NH_4NO_3 . Em relação a massa fresca apenas na concentração de 60 mM de NH_4NO_3 as plantas apresentaram o menor, porém a massa fresca e seca não se observou diferenças estatísticas.

TABELA 23

Número de folhas, número de folhas mortas, comprimento da parte aérea (cm) e quantidades de massa fresca (MF) (mg) e massa seca (MD) (mg) da parte aérea de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, após três meses de cultivo em ambiente controlado em diferentes concentrações de nitrato de amônio (NH_4NO_3).

Parâmetros analisados	Tratamentos (mM de NH_4NO_3)			
	5	15	30	60
Número de folhas	9 a	13 a	9 a	9 a
Comprimento da parte aérea (cm)	2,75 b	3,49 a	3,51 a	2,00 b
Massa fresca (MF) da parte aérea por planta (mg)	61 a	92 a	86 a	44 b
Massa seca (MD) da parte aérea por planta (mg)	3 a	5 a	6 a	5 a

Letras comparam os valores na horizontal e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nas análises dos pigmentos fotossintéticos (Figura 57), não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos.

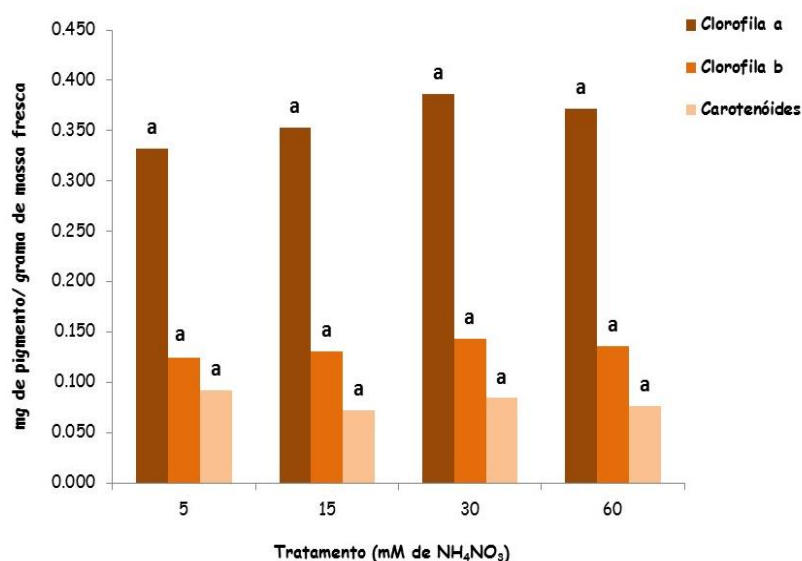


Figura 57: Quantidade de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b* e carotenóides) nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após três meses de cultivo em ambiente controlado nas concentrações 5,15,30 e 60 mM de nitrato de amônio (NH_4NO_3). A quantidade de pigmento foi expressa em mg do pigmento por grama de massa fresca. Letras diferentes indicam que os dados são significativamente diferentes de acordo com o teste Tukey a 5 % de probabilidade para um mesmo pigmento.

Quanto ao parâmetro comprimento da raiz (Tabela 24), as plantas cultivadas em 60 mM de NH_4NO_3 apresentou o menor valor, porém em relação a massa fresca e seca, as raízes das plantas dos tratamentos de 5 e 60 mM de NH_4NO_3 , tiveram as menores médias.

TABELA 24

Comprimento da raiz (cm), quantidades de massa fresca (MF) (mg) e massa seca (MD) (mg) da raiz de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, após três meses de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de nitrato de amônio (NH_4NO_3).

Parâmetros analisados	Tratamentos (mM de NH_4NO_3)			
	5	15	30	60
Comprimento da raiz (cm)	1,39 a	1,81 a	1,97 a	0,91 b
Massa fresca (MF) da raiz por planta (mg)	2,6 c	5,6 b	8,9 a	3,7 c
Massa seca (MD) da raiz por planta (mg)	0,5 b	1,6 a	1,2 a	0,7 b

Letras comparam os valores na horizontal e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resumindo, a adubação com 30 mM de NH_4NO_3 dos sais utilizados no meio MS modificado promoveu um aumento no crescimento em ambiente controlado de *A. imperialis* por três meses, em relação à multiplicação nenhum tratamento induziu a brotação da espécie em estudo.

IV.15) Crescimento das plantas em ambiente controlado por 6 meses (180 dias)

Amônio (NH_4^+), como fonte nitrogenada

Os resultados mostraram que nas concentrações de 5 mM de NH_4^+ as plantas cresceram mais e apresentaram-se com aspecto mais vigoroso (Figura 56), assim como observado em três meses (Figura 58). As plantas crescidas na concentração de 30 e 60 mM de NH_4^+ apresentaram 100% de mortalidade.

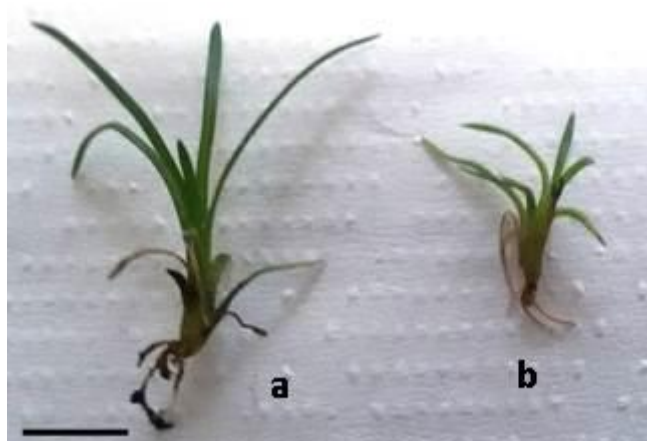


Figura 58: Aspectos das plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após seis meses de crescimento em ambiente controlado nos diferentes tratamentos de amônio (NH_4^+). (a) Plantas cultivadas em 5 mM de NH_4^+ . (b) Plantas cultivadas em 15 mM de NH_4^+ . Barra=1 cm.

Não se observou diferenças estatísticas no parâmetro número de folhas entre os tratamentos (Tabela 25).

Com relação ao comprimento da parte aérea (Tabela 25), as maiores folhas em 5 mM de NH_4^+ ($4,28 \pm 0,86$ cm). Em relação às massas fresca e seca observaram-se que as plantas crescidas em 5 mM de NH_4^+ tiveram as maiores quantidades (147 ± 32 mg/planta de MF e 10 ± 2 mg/planta de MD) (Tabela 25).

Tabela 25

Número de folhas, comprimento da parte aérea (cm) e quantidades de massa fresca (MF) (mg) e massa seca (MD) (mg) da parte aérea de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, após seis meses de cultivo em ambiente controlado em diferentes concentrações de amônio (NH_4^+).

Parâmetros analisados	Tratamentos (mM de NH_4^+)	
	5	15
Número de folhas	10 a	6 a
Comprimento da parte aérea (cm)	4,28 a	1,93 b
Massa fresca (MF) da parte aérea por planta (mg)	147 a	37 b
Massa seca (MD) da parte aérea por planta (mg)	10 a	3 b

Letras comparam os valores na horizontal e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nas análises dos pigmentos fotossintéticos (Figura 59), não se observou diferenças estatísticas nas plantas cultivadas nos diferentes tratamentos.

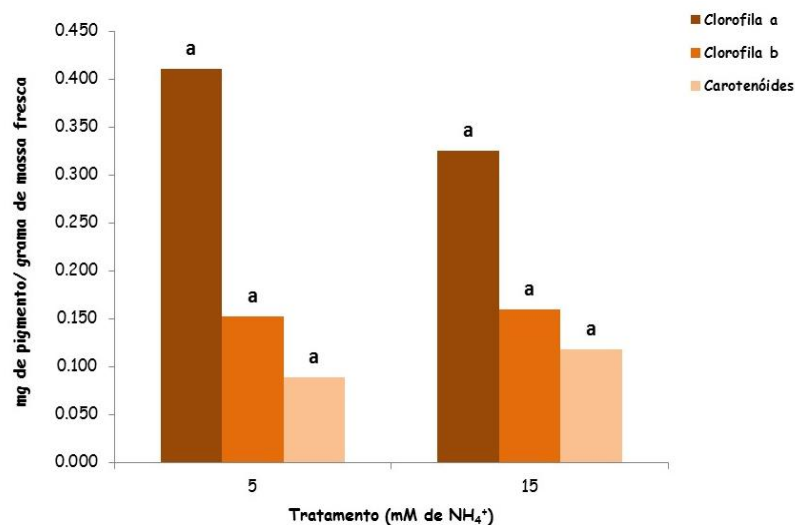


Figura 59: Quantidade de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b* e carotenóides) nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após seis meses de cultivo em ambiente controlado nas concentrações 5,15,30 e 60 mM de amônio (NH₄⁺). A quantidade de pigmento foi expressa em mg do pigmento por grama de massa fresca. Letras diferentes indicam que os dados são significativamente diferentes de acordo com o teste Tukey a 5 % de probabilidade para um mesmo pigmento.

Quanto ao parâmetro comprimento da raiz (Tabela 26), na concentração de 5 mM de NH₄⁺ as plantas tiveram as maiores raízes (1,47±0,52 cm).

Em relação às massas seca e fresca da parte radicular (Tabela 26), na concentração de 5 mM de NH₄⁺ as plantas apresentaram os maiores valores (5,8±0,2 mg de MF e 1,03±0,05 mg de MD).

Tabela 26

Comprimento da raiz (cm), quantidades de massa fresca (MF) (mg) e massa seca (MD) (mg) da raiz de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, após seis meses de cultivo ambiente controlado em diferentes concentrações de amônio (NH₄⁺).

Parâmetros analisados	Tratamentos (mM de NH ₄ ⁺)	
	5	15
Comprimento da raiz (cm)	1,47 a	0,47 b
Massa fresca (MF) da raiz por planta (mg)	5,8 a	0,7 b
Massa seca (MD) da raiz por planta (mg)	1,0 a	0,3 b

Letras comparam os valores na horizontal e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De modo geral, após a análise dos resultados acima, a adubação com 5 mM de NH_4^+ dos sais utilizados no meio MS modificado promoveu um aumento no crescimento em ambiente controlado e *A. imperialis* por seis meses e em 30 e 60 mM de NH_4^+ observou-se mortalidade das plantas, não corroborando com os resultados do crescimento *in vitro* da espécie em estudo.

Este pode ter ocorrido devido ao tipo de substrato em que as plantas foram cultivadas, pois modificando o tipo de substrato, muda-se a disponibilidade de água e nutrientes (Mengarda *et al.*, 2009), além de estarem alterando a velocidade de difusão de nutrientes. Assim, troca de substrato (meio de cultura e casca de *Pinus* sp. compostada), pode representar efeitos significativos que estavam atuando de forma diferenciada sobre o desenvolvimento vegetal.

Nitrato (NO_3^-), como fonte nitrogenada

Os resultados mostraram que na concentração de 60 mM de NO_3^- as plantas cresceram mais e apresentaram-se com aspecto mais vigoroso. Em nenhuma das concentrações se observou mortalidade das plantas (Figura 60).



Figura 60: Aspectos das plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após seis meses de crescimento em ambiente controlado nos diferentes tratamentos de nitrato (NO_3^-) (a) Plantas cultivadas em 5 mM de NO_3^- . (b) Plantas cultivadas em 15 mM de NO_3^- . (c) Plantas cultivadas em 30 mM de NO_3^- . (d) Plantas cultivadas em 60 mM de NO_3^- . Barra = 1 cm.

Não se observou diferenças estatísticas no parâmetro número de folhas entre os tratamentos (Tabela 27).

Com relação ao comprimento da parte aérea (Tabela 27), as menores folhas ocorreram nas plantas cultivadas na concentração de 30 mM de NO_3^- ($5,01 \pm 0,74$ cm), assim como às massas fresca e seca da parte aérea (169 ± 68 mg/planta de MF e 12 ± 5 mg /planta de MD, respectivamente) também foram as menores nesta concentração.

Tabela 27

Número de folhas, comprimento da parte aérea (cm) e quantidades de massa fresca (MF) (mg) e massa seca (MD) (mg) da parte aérea de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, após seis meses de cultivo em ambiente controlado em diferentes concentrações de nitrato (NO_3^-).

Parâmetros analisados	Tratamentos (mM de NO_3^-)			
	5	15	30	60
Número de folhas	11 a	12 a	11 a	12 a
Comprimento da parte aérea (cm)	6,09 a	5,88 a	5,01 b	5,81 a
Massa fresca (MF) da parte aérea por planta (mg)	250 a	237 a	169 b	240 a
Massa seca (MD) da parte aérea por planta (mg)	19 a	19 a	12 b	22 a

Letras comparam os valores na horizontal e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nas análises dos pigmentos fotossintéticos (Figura 61), as plantas cultivadas em diferentes concentrações de NO_3^- não apresentaram diferenças estatísticas.

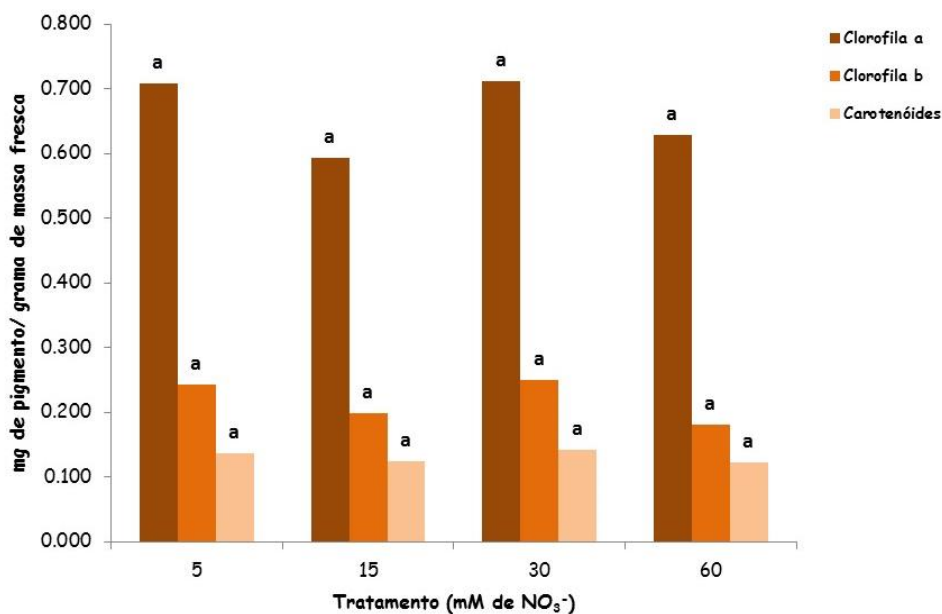


Figura 61: Quantidade de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b* e carotenóides) nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após seis meses de cultivo em ambiente controlado nas concentrações 5,15,30 e 60 mM de nitrato (NO_3^-). A quantidade de pigmento foi expressa em mg do pigmento por grama de massa fresca. Letras diferentes indicam que os dados são significativamente diferentes de acordo com o teste Tukey a 5 % de probabilidade para um mesmo pigmento.

Quanto ao parâmetro comprimento da raiz (Tabela 28), na concentração de 60 mM de NO_3^- ($3,38 \pm 1,07$ cm) as plantas tiveram as maiores raízes.

Em relação às massas fresca e seca da parte radicular (Tabela 28), as menores médias foram encontradas na concentração de 60 mM de NO_3^- (36 ± 4 mg/planta de MF e 3 ± 1 mg/planta de MD).

TABELA 28

Comprimento da raiz (cm), quantidades de massa fresca (MF) (mg) e massa seca (MD) (mg) da raiz de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, após seis meses de cultivo em ambiente controlado em diferentes concentrações de nitrato (NO_3^-).

Parâmetros analisados	Tratamentos (mM de NO_3^-)			
	5	15	30	60
Comprimento da raiz (cm)	2,74 b	2,87 b	2,99 b	3,38 a
Massa fresca (MF) da raiz por planta (mg)	51 a	57 a	54 a	36 b
Massa seca (MD) da raiz por planta (mg)	7 a	4 b	9 a	3 b

Letras comparam os valores na horizontal e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resumindo, a adubação com 60 mM de NO_3^- dos sais utilizados no meio MS modificado promoveu um aumento no crescimento em ambiente controlado de *A. imperialis* por seis meses, em relação à multiplicação nenhum tratamento induziu a brotação da espécie em estudo.

Nitrato de amônio (NH_4NO_3), como fonte nitrogenada

Os resultados mostraram que as plantas crescidas nas quatro concentrações de NH_4NO_3 as plantas apresentaram um aspecto mais vigoroso (Figura 62). Em nenhuma das concentrações se observou mortalidade das plantas.



Figura 62: Aspectos das plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após seis meses de crescimento em ambiente controlado nos diferentes tratamentos de nitrato de amônio (NH_4NO_3). (a) Plantas cultivadas em 5 mM de NH_4NO_3 . (b) Plantas cultivadas em 15 mM de NH_4NO_3 . (c) Plantas cultivadas em 30 mM de NH_4NO_3 . (d) Plantas cultivadas em 60 mM de NH_4NO_3 . Barra = 1 cm.

Não houve diferenças estatísticas para o parâmetro número de folhas (Tabela 29).

Com relação ao comprimento da parte aérea (Tabela 29), as menores folhas ocorreram nas plantas cultivadas na concentração de 60 mM de NH_4NO_3 , e as maiores folhas em 5 mM de NH_4NO_3 . Em relação as massa fresca e seca, na concentração de 5 mM de NH_4NO_3 as plantas apresentaram os maiores valores.

TABELA 29

Número de folhas, número de folhas mortas, comprimento da parte aérea (cm) e quantidades de massa fresca (MF) (mg) e massa seca (MD) (mg) da parte aérea de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, após seis meses de cultivo em ambiente controlado em diferentes concentrações de nitrato de amônio (NH_4NO_3).

Parâmetros analisados	Tratamentos (mM de NH_4NO_3)			
	5	15	30	60
Número de folhas	12 a	12 a	12 a	11 a
Comprimento da parte aérea (cm)	4,68 a	3,27 b	3,78 b	2,00 c
Massa fresca (MF) da parte aérea por planta (mg)	209 a	143 b	165 b	127 b
Massa seca (MD) da parte aérea por planta (mg)	15 a	9 b	10 b	6 b

Letras comparam os valores na horizontal e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nas análises dos pigmentos fotossintéticos (Figura 63), as plantas cultivadas em 5 e 60 mM de nitrato de amônio apresentaram os maiores valores de clorofilas e de carotenóides.

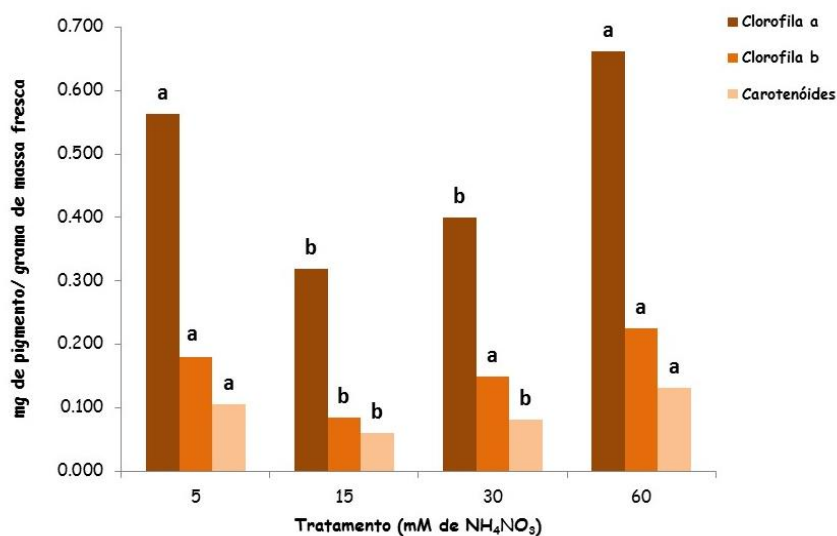


Figura 63: Quantidade de pigmentos fotossintéticos (clorofila a, b e carotenóides) nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após seis meses de cultivo em ambiente controlado nas concentrações 5, 15, 30 e 60 mM de nitrato de amônio (NH_4NO_3). A quantidade de pigmento foi expressa em mg do pigmento por grama de massa fresca. Letras diferentes indicam que os dados são significativamente diferentes de acordo com o teste Tukey a 5 % de probabilidade para um mesmo pigmento.

Quanto ao parâmetro comprimento da raiz (Tabela 30), as plantas cultivadas em 30 e 60 mM de NH_4NO_3 apresentaram os menores valores, porém em relação a massa fresca, as plantas do tratamento de 60 mM de nitrato de amônio, tiveram o maior valor, e a massa seca, das raízes das plantas dos tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas.

TABELA 30

Comprimento da raiz (cm), quantidades de massa fresca (MF) (mg) e massa seca (MD) (mg) da raiz de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, após três meses de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de nitrato de amônio (NH_4NO_3).

Parâmetros analisados	Tratamentos (mM de NH_4NO_3)			
	5	15	30	60
Comprimento da raiz (cm)	3,35 a	1,91 b	1,38 c	1,22 c
Massa fresca (MF) da raiz por planta (mg)	13 b	11 b	13 b	17 a
Massa seca (MD) da raiz por planta (mg)	3 a	3 a	7 a	3 a

Letras comparam os valores na horizontal e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resumindo, a adubação com 5 mM de NH_4NO_3 dos sais utilizados no meio MS modificado promoveu um aumento no crescimento em ambiente controlado de *A. imperialis* por seis meses, em relação à multiplicação nenhum tratamento induziu a brotação da espécie em estudo.

Quando se compara as três fontes nitrogenadas utilizadas na adubação em ambiente controlado das plantas de *A. imperialis*, observa-se que as plantas crescidas em 60 mM de nitrato apresentaram o melhor crescimento e as plantas cultivadas apenas com amônio tiveram o seu crescimento reduzido e mortalidade, assim como ocorreu com o crescimento *in vitro*.

Quando se compara o crescimento em ambiente controlado com o cultivo *in vitro*, observa-se que há um incremento do crescimento nas plantas mantidas *in vitro*, isto pode estar relacionado com a adição de sacarose ao meio de cultura, pois no ambiente controlado optou-se pela retirada da sacarose para se evitar a proliferação de fungos.

De acordo com Buchanan *et al.* (2002), a sacarose fornece esqueletos carbônicos que auxiliam na aquisição de nutrientes, o que favore o crescimento das plantas.

Outro fator que pode ter contribuído para o maior crescimento das plantas *in vitro*, é o estado físico do substrato. O meio de cultura é semi-sólido, o que contribui para maior disponibilidade de água e nutrientes (Grattapaglia & Machado, 1998), o que não acontece com o substrato utilizado no ambiente controlado, que foi casca de *Pinus* sp. compostada,

neste tratamento a disponibilidade hídrica não é constante bem como a quantidade de nutrientes fornecido.

O cultivo *in vitro* pode otimizar o crescimento das plantas quando comparado ao cultivo em ambiente controlado, com isso, mesmo a técnica *in vitro* sendo mais trabalhosa, o tempo de crescimento é reduzido e, conseqüentemente, a produção é maior.

VI) CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados mostraram ser possível melhorar o crescimento *in vitro* de *A. imperialis* modificando as concentrações das fontes nitrogenadas a partir da formulação original de MS, meio mais utilizado no cultivo *in vitro*, sendo a melhor concentração a de 15 mM de NO_3^- . *A. imperialis* mostrou ser capaz de utilizar tanto amônio quanto nitrato no seu crescimento, porém o amônio foi considerado a fonte de nitrogênio menos eficiente para espécie. O nitrato, combinado ou não com o amônio, mostrou ser a melhor fonte nitrogenada para o crescimento das plantas.

As células das camadas mais externas da raízes escuras das plantas cultivadas em meio indutor (30 mM de NH_4NO_3) apresentaram paredes sinuosas, o que pode ter influenciado negativamente na absorção dos nutrientes e, conseqüentemente favorecido a multiplicação das plantas.

Conclui-se, portanto, que a espécie em estudo se multiplica, quando há uma combinação de nitrato e amônio, principalmente na concentração de 30 mM de NH_4NO_3 .

VII) PERSPECTIVAS FUTURAS

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho ficaram algumas perspectivas:

- cultivar *in vitro* *A. imperialis* com outras fontes de nitrogênio, como uréia e aminoácidos e outras enzimas relacionadas ao metabolismo nitrogenado como a urease e arginase;
- investigar o metabolismo nitrogenado das raízes;
- desenvolver trabalhos de aclimatização das plantas produzidas *in vitro*;
- desenvolver trabalhos com plantas adultas (com tanque/fitotelma).
- aumentar o número de amostras para o estudo ontogenético das gemas devido à baixa porcentagem de brotação das plantas cultivadas no meio indutor.

VIII) RESUMO

A maioria dos representantes de Bromeliaceae é considerada ornamental, tornando-se alvo do extrativismo ilegal como, por exemplo, *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms. Essa espécie encontra-se ameaçada de extinção, tendo como agravante o seu lento crescimento para atingir a idade reprodutiva e a sua incapacidade de se propagar vegetativamente em condições naturais. O cultivo *in vitro*, juntamente com os estudos nutricionais, tem sido utilizado na conservação de diversas espécies de interesse econômico, visto que possibilita a propagação e a otimização do seu crescimento. Um dos principais nutrientes para o crescimento das plantas é o nitrogênio que se encontra disponível, principalmente, nas formas de nitrato e de amônio, os quais podem ser fornecidos separadamente ou combinados ao meio de cultura. Dados preliminares, obtidos no Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais do IBt, mostraram que modificações no meio de Murashige & Skoog (MS), como a redução na concentração de N, favorece a multiplicação de *A. imperialis*. No entanto, estudos sobre o fornecimento isolado de diferentes fontes nitrogenadas e da multiplicação vegetativa dessa espécie são inexistentes. Com isso o objetivo deste projeto foi determinar a melhor fonte nitrogenada para a multiplicação e o crescimento *in vitro* de *A. imperialis*, e por meio de estudos anatômicos, compreender o desenvolvimento das gemas responsáveis pela formação dos brotos a fim de fornecer subsídios para estudos de propagação e, conseqüentemente, para conservação da espécie. Desse modo, no presente estudo, plântulas germinadas *in vitro* foram transferidas para meio MS modificado (quatro concentrações e três fontes nitrogenadas). Foram realizadas três coletas, uma aos 30 dias após a deposição das sementes no meio de cultura e 3 e 6 meses após a transferência das plântulas para os tratamentos. As plantas foram analisadas quanto à assimilação do nitrogênio e quanto ao seu crescimento. Após a definição do melhor meio de cultivo para a multiplicação e crescimento das plantas, foram realizados estudos anatômicos para o estudo das gemas e das raízes. Segundo os resultados, o nitrato foi considerado a fonte de nitrogênio melhor metabolizada quando comparada ao amônio, em todos os tempos de coleta. O nitrato está relacionado com a multiplicação das plantas, pois além de amenizar os efeitos de toxicidade do amônio, pode estar sinalizando a produção de citocininas, um hormônio relacionado com a formação de brotos. Em relação às análises anatômicas, não foi possível acompanhar a ontogênese das gemas em plantas cultivadas em meio de 30 mM de NH_4NO_3 (indutor de multiplicação) devido à baixa porcentagem de brotação, mas o meio controle foi o mais favorável para a manutenção da organização estrutural das raízes. Conclui-se, portanto, que a espécie em estudo se multiplica, quando há uma combinação de nitrato e amônio, principalmente na concentração de 30 mM de NH_4NO_3 .

Palavras chaves: Bromeliaceae, conservação, nitrogênio.

IX) ABSTRACT

Most Bromeliaceae is considered ornamental, becoming illegal extraction target, for example, *Alcantarea imperialis* (Carriere) Harms. This species is endangered, with the aggravating its slow growth to reach reproductive age and their inability to propagate vegetatively under natural conditions. The *in vitro* culture, along with nutritional studies, has been used in the conservation of many species of economic interest, since it enables the propagation and optimization of its growth. One of the key nutrients for plant growth is nitrogen which is available mainly in the form of nitrate and ammonium, which can be provided separately or in combination to the culture medium. Preliminary studies at the Research Center for Ornamental Plants of IBt, have shown that changes in Murashige and Skoog (MS), as the reduction in the concentration of N favors the multiplication of *A. imperialis*. However, studies on the isolated supply of different nitrogen sources and vegetative propagation of this species are non-existent. Thus the objective of this project was to determine the best nitrogen source for multiplication and *in vitro* growth of *A. imperialis*, and through anatomical studies, to understand the development of buds responsible for the formation of shoots in order to provide grants for studies propagation and consequently to conserve species. Thus, in this study, *in vitro* germinated seedlings were transferred to MS medium (four concentrations and three nitrogen sources). Three samples were taken, one at 30 days after seed deposition in the culture medium and 3 and 6 months after the transfer of seedlings for treatments. The plants were analyzed for nitrogen assimilation and for their growth. After defining the ideal culture medium for multiplication and growth of plants, anatomical studies for the study of buds and roots were conducted. According to the results, the nitrate is considered the best source of nitrogen when compared to ammonium metabolized at all sampling times. Nitrate is related to the multiplication of plants, as well as mitigate the effects of ammonium toxicity, may be signaling the production of cytokines, a related hormone with the formation of shoots. Regarding the anatomical analysis it was not possible keep up with the ontogenesis of buds in both culture media of 15 mM NO_3^- (control) and in the 30 mM NH_4NO_3 (multiplication inductor), but the control media was the most favorable for maintenance of structural organization of the roots. It follows therefore that the species under study is multiplied when there is a combination of nitrate and ammonium, particularly at a concentration of 30 mM NH_4NO_3 .

Key words: Bromeliaceae, conservation, nitrogen.

X) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, V.A., Tamaki, V. 2014. *In vitro* growth of bromeliad *Nidularium minutum* with different concentrations of nitrogen, phosphorus, potassium and calcium. **Journal of Plant Nutrition**, no prelo.
- Aranda-Peres, A. N., Peres, L.E.P., Higashi, E.N., Martinelli, A.P. 2009. Adjustment of mineral elements in the culture medium for the micropropagation of three *Vriesea* bromeliads from the Brazilian atlantic forest: the importance of calcium. **Hortscience** 44:106–112.
- Aoyama, E.M. 2010. **Propagação *in vitro* e em estufa de *Alcantarea imperialis* (Carriere) Harms (Bromeliaceae) a partir de sementes**. Tese (Doutorado) Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo.
- Araujo, A.G., Pasqual, M., Rodrigues, F.A., Carvalho, J.G., Zarraga, D.Z.A. 2009. Fontes de nitrogênio no crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae). **Acta Scientiarum Biological Sciences** 31(1): 35-39.
- Barboza, S.B.S.C., Graciano-Ribeiro, D., Teixeira, J.B., Portes, T.A., Souza, L.A.C. 2006. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 41: 185-194.
- Benzing, D.H. 2000. **Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation**. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bradford, M.M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72: 248-254.
- Britto, D.T., Kronzucke, H.J. 2002. NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. *Journal of Plant Physiology* 59(6):567-584
- Bobrowski, R., Biondi, D., Baggenstoss, D. 2009. Composição de canteiros na arborização de ruas de Curitiba (PR). **Revista da Sociedade Brasileira de Arborização Urbana** 1: 44-61.
- Bonifas, K.D. & Lindquist, J.L. 2009. Effects of nitrogen supply on the root morphology of corn and velvetleaf. **Journal of Plant Nutrition** 32:1371-1382.
- Bunn, E., Turner, S.R., Dixon, K.W. 2011. Biotechnology for saving rare and threatened flora in a biodiversity hotspot. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**. 47:188-200.
- Cammaerts, D., Jacobs, M. 1985. A study of the role of glutamate dehydrogenase in the nitrogen metabolism of *Arabidopsis thaliana*. **Planta** 163: 517-526.

- Carvalho, P. A. 2012. **Metabolismos do nitrogênio e antioxidante em plantas jovens de seringueira (*Hevea* spp) submetidas à baixa disponibilidade de oxigênio na presença de nitrato e/ou amônio**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Carvalho, P.C., Hayashi, A.H., Braga, M.R., Nievola, C.C. 2013. Biochemical and anatomical responses related to the *in vitro* survival of the tropical bromeliad *Nidularium minutum* to low temperatures. **Plant Physiology and Biochemistry** 71:144-154.
- Carvalho, P.G., Aidar, M.P.M., Zaidan, L.B.P., Carvalho, M.A.M. 2006. Aspectos do crescimento e atividade da redutase do nitrato em plantas de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby submetidas a diferentes fontes de nitrogênio. **Hoehnea** 33(1): 89-97
- Cataldo, D.A., Haroom, M., Schrader, L.E., Youngs, V.L. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis** 6:71-80.
- Cruz, S.L., Pelacani, C.R., Araújo, W.L. 2006. Efeito do nitrato e amônio sobre o crescimento e eficiência de utilização do nitrogênio em mandioca. *Bragantia* 65(3):467-475.
- Davies, P.J. 2010. **The plant hormones: their nature, occurrence, and functions**. Ithaca Cornell University.
- Dettke, G.A., Milaneze-Gutierrez, M.A. 2008. Anatomia vegetativa de *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae, Bromelioideae). **Balduinia** 13:1-14.
- Donato, V.M.S., Andrade, A.G., Souza, E.S., França, J.G.E., Maciel, G.A. 2004. Atividade enzimática em variedades de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* sob diferentes níveis de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 39(11):1087-1093.
- Dubois, F., Tercé-Laforgue, T., Gonzalez-Moro, M-B., Estavillo, J-M., Sangwan, R., Gallais, A., Hirel, B. 2003. Glutamate dehydrogenase in plants: is there a new story for an old enzyme? **Plant Physiology and Biochemistry** 41: 565-576.
- Elbl, P.M. 2012. **Espessamento primário do sistema caulinar em Poales: Morfologia, anatomia, expressão do gene scarecrow**. Tese (Doutorado em Ciências, Área de Botânica) – Universidade de São Paulo, SP.
- Epstein, E., Bloom, A.J. 2006. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. Ed. Planta, Londrina.
- Farnden, K.J.S., Robertson, J.G. 1980. **Methods for studying enzyme involved in metabolism related to nitrogenase**. In: Bergsen, F.J. (ed.). *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*. John Wiley & Sons Ltd., p. 279-286.
- Ferrario-Méry, S., Masclaux, C., Suzuki, A., Valadier, M-H., Hirel, B., Foyer, C.H. 2011. Glutamine and α -ketoglutarate are metabolite signals involved in nitrate reductase

- gene transcription in untransformed and transformed tobacco plants deficient in ferredoxin-glutamine- α -ketoglutarate aminotransferase. **Planta** 213(2):265-271
- Forzza, R.C., Costa, A., Siqueira Filho, J.A., Martinelli, G., Monteiro, R.F., Santos-Silva, F., Saraiva, D.P., Paixão-Souza, B. 2015. *Bromeliaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB66>).
- Freschi, L., Rodrigues, M.A., Tiné, M.A., Mercier, H. 2010. Correlation between citric acid and nitrate metabolisms during CAM cycle in the atmospheric bromeliad *Tillandsia pohliana*. **Journal of Plant Physiology** 167(18):1577-1583.
- Fukushima, A., Kusano, M. 2014. A network perspective on nitrogen metabolism from model to crop plants using integrated ‘omics’ approaches. **Journal of Experimental Botany** 65(19): 5619-5630.
- Galeck, R., Kukczanka, K. 1996. Influence of growth regulators (IBA, BA) on anatomical and morphological changes in bromeliads in *in vitro* culture. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae** 65(3-4):213-219.
- Givnish, T.J., Barfuss, M. H.J., Ee, B.J., Riina, R., Schulte, K., Horres, H., Gonsiska, P.A., Jabaily, R.S., Crayn, D.M., Smith, A.C., Winter, K., Brown, G.K., Evans, T.M., Holst, B.K., Luther, H., Till, W., Zizka, G., Berry, P.E., Sytsm, K.J. 2011. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. **American Journal of Botany** 98(5): 872-895.
- Glass, A.D.M., Britto, D.T., Kaiser, B.N., Kinghorn, J.R., Kronzucker, H.J., Kumar, A., Okamoto, M., Rawat, S., Siddiqi, M.Y., Unkles, S.E., Vidmar, J.J. 2002. The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. **Journal of Experimental Botany** 53(370): 855-864.
- Grattapaglia, D., Machado, M.A. 1998. Micropropagação. In: Torres, A.C., Caldas, L.S., Buso, J. A. (eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. 1. ed. Brasília: Embrapa- CNPH. p.183-260.
- Guimarães, M.M.C., Cairo, P.A.R., Neves, O.S.C. 2014. Crescimento de *Eucalyptus urophylla* em meio hidropônico com diferentes proporções de nitrato e amônio. **Floresta e Ambiente** 21(1):52-61.
- Hachiya, T., Watanabe, C.K., Fujimoto, M., Ishikawa, T., Takahara, K., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H., Uesono, Y., Terashima, I., Noguchi, K. 2012. Nitrate addition alleviates ammonium toxicity without lessening ammonium accumulation, organic acid depletion and inorganic cation depletion in *Arabidopsis thaliana* shoots. **Plant and Cell Physiology** 53(3): 577-591.

- Heldt, H-W. 1997. **Nitrate assimilation**. In Heldt, H-W., Plant Biochemistry & Molecular Biology, Oxford University Press, p. 247-276.
- Horta, A.C., Sodek, L. 1994. Free amino acid and storage protein composition of soybean fruit explants and isolated cotyledons cultured with and without methionine. **Annals of Botany** 79:547:552.
- Inselsbacher, E., Cambuí, C.A., Richter, A., Strange, C.F., Mercier, H., Wanek, W. 2007. Microbial activities and foliar uptake of nitrogen in the epiphytic bromeliad *Vriesea gigantea*. **New Phytologist** 175:311-320.
- Jaworski, E. 1974. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 43 (6): 1274-1279.
- Kalamaki, M.S., Merkouropoulos, G., Kanellis, A.K. 2009. Can ornithine accumulation modulate abiotic stress tolerance in Arabidopsis? **Plant Signaling & Behavior** 4 (11): 1099-1101.
- Kanashiro, S. 2005. **Nitrogênio, fósforo, potássio e cálcio e o crescimento de plântulas de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith in vitro**. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Kaneko, F.H., Leal, A.J.F., Anselmo, J.L., Buzetti, S., Tosta, F.S. 2013. Fontes e manejos da adubação nitrogenada em algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical** 43(1):57-63.
- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology** 27: 137-138.
- Kerbaui, G. 2008. **Fisiologia vegetal**. 2 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Kievitsbosch, T. 2011. **Cultivo in vitro e desenvolvimento pós-seminal de espécies de Bromeliaceae com potencial ornamental**. Dissertação (Mestrado-Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Krauss, B. 1948. Anatomy of the Vegetative Organs of the Pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr. I. Introduction, Organography, the Stem, and the Lateral Branch or Axillary Buds. **Botanical Gazette** 110(2): 159-217.
- Kurita, F.M.K., Machado, B.M., Teixeira, N.B., César, C.G.A., Nievola, C.C., Tamaki, V. 2013. Fenologia, cultivo *in vitro* e aclimatização da bromélia ameaçada de extinção *Nidularium minutum* Mez. **Biotemas** 27(1):59-69.
- Kurita, F.M.K., Tamaki, V. 2014. *In vitro* growth of bromeliad *Alcantarea imperialis* with different concentrations of nitrogen. **Acta Scientiarum. Biological Science** 26(3):279-285.

- Laukkanen, H., Tiitto, R.J., Hohtala, A. 1997. Effect of different nitrogen nutrients on the viability, protein synthesis and tannin production of Scots pine callus. **Physiologia Plantarum** 100 (4):982-988.
- Lawlor, D.W. 2002. Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production systems. **Journal of Experimental Botany** 53 (370): 773-787
- Lea, P.J. **Nitrogen metabolism**. 1993. In: Lea, P.J., Leegood, R.C. (eds.). Plant Biochemistry and Molecular Biology. 1st ed. England: John Wiley & Sons Ltda., pp: 155-180.
- Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and Carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology** 148:350-382.
- Lobo, G.M. 2007. **Morfoanatomia da reófito *Dyckia brevifolia* Baker (Bromeliaceae)**. Dissertação (Mestrado em Biologia vegetal) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Li, S. X.; Wang, Z. H.; Stewar, B. A. 2013. Responses of crop plants to ammonium and nitrate N. 2013. **Advances in Agronomy** 118: 205-397.
- Lu, Y.L., Xu, Y.C., Shen, Q.R., Dong, C.X. 2009. Effects of different nitrogen forms on the growth and cytokinin content in xylem sap of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedlings. **Plant and Soil** 315 (12): 67-77.
- Luther, H.E. 2012. **An alphabetical list of Bromeliad Binomials**. 13th ed. The Bromeliad Society International, Sarasota.
- Malavolta, E., Vitti, G.C., Oliveira, S.A. 1997. Avaliação do estado nutricional das plantas: Princípios e aplicações. 2ed. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo. 319 p.
- Maldaner, J., Nicoloso, F.T., Santos, E.S., Flores, R., Skrebsky, E.C. 2006. Sacarose e nitrogênio na multiplicação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ciência Rural** 36 (4): 1201-1206.
- Marschner, P. 2012. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press.
- Maun, M.A. 1994. Adaptations enhancing survival and establishment of seedlings on coastal dune systems. **Vegetation** 111: 59-70.
- Masclaux, C., Quillere, I., Gallais, A., Hirel, B. 2001. The challenge of remobilisation in plant nitrogen economy. A survey of physio-agronomic and molecular approaches. **Annals of Applied Biology** 138(1):69-81.
- Mccullough, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. **Clinica Chimica Acta** 17(2): 297-304.

- McIlvaine, T.C. 1921. A buffer solution for colorimetric comparison. **Journal of Biological Chemistry** 49 (1):183-186.
- Mengarda, L.H.G., Povoas, L., Debiasi, C., Pescador, R. 2009. Estado físico do meio de cultura na propagação *in vitro* de Bromeliaceae. **Scientia Agraria** 10 (6):469-474.
- Mercier, H., Kerbaudy, G.B. 1995. The importance of tissue culture technique for conservation of endangered Brazilian bromeliads from Atlantic rain forest canopy. **Selbyana** 16: 147-149.
- Mercier, H. 2004. **Estudos em Bromeliaceae: desenvolvimento e metabolismo do nitrogênio**. Tese (Livre-Docência) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Mifflin, B.J., Habash, D.Z. 2002. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. **Journal of Experimental Botany** 53 (370): 979-987.
- Ministério do Meio Ambiente. 2014. Portaria 443. Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15: 473-497.
- Naves, V.C. 2001. **Propagação *in vitro* da bromélia imperial *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms**. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Niedz, R.P., Evens, T.J. 2008. The effects of nitrogen and potassium nutrition on the growth of nonembryogenic and embryogenic tissue of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). **BMC Plant Biology** 8: 1-11.
- Nievola, C.C., Mercier, H. 2001. Variações diurnas da atividade *in vivo* da redutase do nitrato em abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merr. - Bromeliaceae). **Revista Brasileira de Botânica** 24 (3): 295-301.
- Ohkama-Ohtsu, N., Wasaki, J. 2010. Recent progress in plant nutrition research: cross-talk between nutrients, plant physiology and soil microorganisms. **Plant and Cell Physiology** 51(8): 1255-1264.
- Okamoto, M., Vidmar, J.J., Glass, A.D.M. 2003. Regulation of *NRT1* and *NRT2* Gene Families of *Arabidopsis thaliana*: Responses to Nitrate Provision. **Plant Cell Physiology** 44(3):304-317
- Pageau, K., Reisdorf-Cren, M., Morot-Gaudry, J.F., Masclaux-Daubresse, C. 2006. The two senescence-related markers, GS1 (cytosolic glutamine synthetase) and GDH (glutamate dehydrogenase), involved in nitrogen mobilization, are differentially regulated during

- pathogen attack and by stress hormones and reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum* L. leaves. **Journal of Experimental Botany** 57(3):547-557.
- Pérez-Soba, M., Stulen, I., van der Eerden, L.J.M. 1994. Effect of atmospheric ammonia on the nitrogen metabolism of Scots pine (*Pinus sylvestris*) needles. **Physiologia Plantarum** 90: 629-636.
- Pita, P., Menezes, N.L. 2002. Anatomia da raiz de espécies de *Dyckia* Schult. f. e *Encholirium* Mart. Ex Schult. & Schult. f. (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) da Serra do Cipó (Minas Gerais, Brasil), com especial referência ao velame. **Revista Brasileira de Botânica** 25 (1):25-34.
- Pittedrigh, C. S. 1948. The bromeliad-anopheles-malaria complex in Trinidad. I-The bromeliad flora. **Evolution** 2: 5889.
- Prado, R.M. 2008. **Nutrição de plantas**. Ed. Unesp, São Paulo.407p.
- Proença, S.L., Sajo, M.G. 2008. Rhizome and root anatomy of 14 species of Bromeliaceae. **Rodriguésia** 59(1):113-128.
- Ribeiro, M.O., Boechat, C.L., Conceição, M.G.S., Moreira, F.M., Ribeiro, L.O., Santos, A.R. 2012. Efeito das interações entre os íons amônio e nitrato na fisiologia do crescimento do amendoimzeiro. **Revista Ceres** 59(5):630-635.
- Sakai, W.S. 1973. Simple method for different staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain Technology** 48: 247-249.
- Sakakibara, H., Suzuki, M., Takei, K., Deji, A., Taniguchi, M., Sugiyama, T. 1998. A response-regulator homologue possibly involved in nitrogen signal transduction mediated by cytokinin in maize. **Plant Journal** 14: 337–344.
- Sarmiento, R., Garcia, J.L., Mazuelo, S.C., Linan, J., Trancoso, A. 1994. Effect of the form and concentration of N on the growth and mineral composition of olive seedlings. **Acta Horticulture** 356:156-161.
- Santos, A. J., Bittencourt A. M., Nogueira, A. S. 2005. Aspectos econômicos da cadeia produtiva das bromélias na região metropolitana de Curitiba e litoral paranaense. **Floresta** 35 (3): 409-417.
- Santos, A.S. 2010. **Indução termoperiódica da nitrato redutase de membrana plasmática em abacaxizeiro (*Ananas comosus*)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Área de Botânica) – Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Santos, D.S., Tamaki, V., Nievola, C.C. 2010. *In vitro* propagation of the ornamental bromeliad *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Klotzsch via nodal segments. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant** 46(6): 524-529.

- Santos, R.R., Almeida, A.A.S., Almeida, J.C.R. 2012. Atividade da redutase do nitrato em mudas de açaizeiro adubadas com nitrogênio e potássio. **Revista Biociências** 18:13-17.
- S. Schmidt, S., Stewart, G.R., Turnbull, M.H., Erskine, P.D., Ashwath, N. 1998. Nitrogen relations of natural and disturbed plant communities in tropical Australia. **Oecologia** (117):95-104.
- Segecin, S., Scateca, V.L. 2004. Morfoanatomia de rizomas e raízes de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais, PR, Brasil. **Acta Botanica Brasílica** 18(2):253-260.
- Setién, I., Vega-Masa, I., Celestino, N., Calleja-Cervantes, M.E., González-Murua C., Estavillo, J.M., González-Moroa, M.B. 2014. Root phosphoenolpyruvate carboxylase and NAD-malic enzymes activity increase the ammonium-assimilating capacity in tomato. **Journal of Plant Physiology** 171:49-63.
- Silva, A.L.L, Franco, E.T.H., Bisognin, D.A., Dornelles, E.B., Walter, J. M. 2005. Efeitos do nitrato de amônia na multiplicação e regeneração de gemas laterais de *Dyckia maritima* Baker – Bromeliaceae. **Revista Brasileira de Agrociência** 11(3): 369-371.
- Silva, I.V., Scatena, V.L. 2011. Anatomia de raízes de nove espécies de Bromeliaceae (Poales) da região amazônica do estado de Mato Grosso, Brasil. **Acta Botanica Brasílica** 25(3):618-627.
- Shan, A.Y.K.V., Oliveira, L.E.M., Bonome, L.T.S., Mesquita, A.C. 2012. Assimilação metabólica de nitrogênio em plântulas de seringueira cultivadas com nitrato ou amônio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 47 (6):754-762.
- Solomonson, L.P., Barber, M.J. 1990. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation.. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** 41: 225-253.
- Stitt, M., Müller, C., Matt, P., Gibon, Y., Carillo, P., Morcuende, R., Scheible, W-R., Krapp, A. 2002. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. **Journal of Experimental Botany** 53 (370): 959-970.
- Taiz, L., E. Zeiger. 2013. **Fisiologia vegetal**. Sunderland: Sinauer.
- Takahashi, C.A. 2013. **Assimilação do nitrogênio em folhas de *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae) durante a transição ontogenética do hábito atmosférico para o epífita com tanque**. Tese (Doutorado em Ciências, Área de Botânica, Fisiologia Vegetal) - Universidade de São Paulo, SP.
- Takei, K., Sakakibara, H., Sugiyama, T. 2001a. Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Biological Chemistry** 276: 26405–26410.

- Takei, K., Sakakibara, H., Taniguchi, M., Sugiyama, T. 2001b. Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. **Plant and Cell Physiology** 42: 85–93.
- Tamaki, V., Mercier, H. 2007. Cytokinins and auxin communicate nitrogen availability as long-distance signal molecules in pineapple (*Ananas comosus*). **Journal of Plant Physiology** 164: 1543-1547.
- Tamaki, V., Mercier, H., Nievola, C.C. 2007. *In vitro* culture of clones of *Ananas comosus* (L.) Merr. - Smooth Cayenne in different concentrations of macronutrients. **Hoehnea** 34:67-73.
- Teixeira, J., Pereira, S., Ca'novas, F., Salema, R. 2005. Glutamine synthetase of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. De'sire'e) plants: cell- and organ-specific expression and differential developmental regulation reveal specific roles in nitrogen assimilation and mobilization. **Journal of Experimental Botany** 56 (412):663-671.
- Teixeira, W.F., Fagan, E.B., Silva, J.O., Silva, P.G., Silva, F.H., Sousa, M.C., Canedo, S.C. 2013. Atividade da enzima nitrato redutase e crescimento de *Swietenia macrophylla* king sob efeito de sombreamento. **Floresta e Ambiente** 20(1):91-98.
- Tomlinson, P.B. 1969. **Commelinales-Zingiberales**. In: Anatomy of the monocotyledons (C.R. Metcalfe, ed.). Clarendon Press, Oxford. v.3.
- Versieux, L.M., Wanderley, M.G.L. 2007. Two new species of *Alcantarea* (Bromeliaceae, Tillandsioideae) from Brazil. **Brittonia** 59: 57-64.
- Versieux, L.M. 2009. **Sistemática, filogenia e morfologia de Alcantarea (Bromeliaceae)**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Viégas, P.R., Queiroz, J.E., Rocha, I.M.A. 2004. Redução assimilatória de NO₃⁻ em plantas de cajueiro cultivados em meio salinizado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** 8(2/3):189-195.
- Vidal, E.A., Moyano, T.C., Canales, J. Gutiérrez, R.A., 2014. Nitrogen control of developmental phase transitions in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany** 65 (19):5611-5618.
- Villa, F., Araújo, A.G., Pio, L.A.S., Pasqual, M. 2005. Multiplicação *in vitro* da amoreira-preta 'Ébano' em diferentes concentrações de meio MS e BAP. **Ciência e Agrotecnologia** 29 (3):582-589.
- Villa, F., Pasqual, M., Salles, L.A., Fráguas, C.B., Rezendes, J.C. 2009. Utilização de nitrato de amônio e de uréia como fontes de nitrogênio na micropropagação de amoreira-preta. **Scientia Agraria** 5:365-370.

- Xu, G., Fan, X., Miller, A.J. 2012. Plant Nitrogen Assimilation and Use Efficiency. **Annual Review of Plant Biology** 63:153-182.
- Weatherburn, M.W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry** 39: 971-974.
- Werner, E.T., Milanez, C.R.D., Mengarda, L.H.G., Vendrame, W.A, Cuzzuol, G.R.F. 2010. Meios de cultura, reguladores de crescimento e fontes de nitrogênio na regulação da calogênese do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) **Acta Botanica Brasilica** 24(4): 1046-1051.
- White, P.J., Brown, P.H. 2010. Plant nutrition for sustainable development and global health. **Annals of Botany** 105:1073–1080.
- Yemm, E.W., Cocking, E.C. 1955. The determination of amino acids with ninhydrin. **Analyst** 80:208-213.
- Yoneyama, T., Matsumaru, T., Usui, K., Engelaar, W.M.H.G. 2001. Discrimination of nitrogen isotopes during absorption of ammonium and nitrate at different nitrogen concentrations by rice (*Oryza sativa* L.) plants. **Plant, Cell and Environment** 24: 133-139.