

PRISCILA PRIMO ANDRADE SILVA

**Assimilação do nitrogênio na bromélia *Ananas
comosus* var. *ananassoides* (Baker) Coppens &
F. Leal na presença de nitrato e/ou amônio em
plantas provenientes de sementes ou de
segmentos nodais**

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

SÃO PAULO

2016

PRISCILA PRIMO ANDRADE SILVA

**Assimilação do nitrogênio na bromélia *Ananas
comosus* var. *ananassoides* (Baker) Coppens &
F. Leal na presença de nitrato e/ou amônio em
plantas provenientes de sementes ou de
segmentos nodais**

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

ORIENTADORA: DRA. VÍVIAN TAMAKI

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

S586A Silva, Priscila Primo Andrade
Assimilação do nitrogênio na bromélia *Ananas comosus* var. *ananassoides* (Baker) Coppens & F. Leal na presença de nitrato e/ou amônio em plantas provenientes de sementes ou de segmentos nodais/Priscila Primo Andrade Silva – São Paulo, 2016.112p.il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2016.

Bibliografia.

1. Bromeliaceae. 2. Micropropagação. 3. Nutrição Mineral. I. Título.

CDU: 582.564

Dedico este trabalho carinhosamente aos meus amados: filho Deric Primo Brigagão, marido Márcio Narcizo Brigagão, mãe Irani Andrade Silva e pai José Arnaldo Andrade Silva

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

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado condições de executar e finalizar o presente trabalho.

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

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

À minha orientadora Dra. Vívian Tamki pela confiança ao oferecer a oportunidade de desenvolver este projeto. Agradeço também por todos os ensinamentos, conversas e conselhos nos momentos mais difíceis.

Ao Dr. Ladaslav Sodek da Universidade Estadual de Campinas, cujos ensinamentos durante a disciplina de Enzimologia Vegetal foram essenciais para a realização dos cálculos e análises de todos os resultados obtidos neste trabalho.

Aos funcionários, colegas e amigos do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais do Instituto de Botânica pelos momentos de descontração e apoio. Em especial ao Ivomar Aparecido Medina e ao Jorge Luiz Marx Young por toda a ajuda na parte experimental que foi imprescindível para realização deste trabalho.

À Camila Pereira de Carvalho pela companhia, amizade, ensinamentos, conversas, conselhos e muitas outras coisas e à Victória de Carvalho pela companhia nas disciplinas, conversas; ensinamentos, conselhos, amizade e muito mais.

À Sabrina Vanessa Andrade amizade, ensinamentos, conversas, conselhos e muitas outras.

Ao meu amado esposo Márcio Narcizo Brigagão pela paciência e dedicação comigo e com o nosso filho Deric Primo Brigagão, para eu poder realizar todo experimental do presente trabalho.

Aos meus pais José Arnaldo Andrade Silva e Irani Andrade Silva, pela força, oração e por acreditarem em mim.

Muito obrigada!

RESUMO

Ananas comosus var. *ananassoides* (Baker) Coppins & F. Leal é uma bromélia ornamental que é produzida e exportada como “flor de corte”. Além do seu potencial paisagístico, esta espécie é nativa do cerrado, um bioma ameaçado de extinção, tornando-se necessários estudos e medidas de conservação de suas espécies. O cultivo *in vitro*, juntamente com os estudos nutricionais, tem sido utilizado na conservação de diversas plantas de interesse econômico, visto que possibilita a propagação e a otimização do seu crescimento. Dentre os nutrientes o nitrogênio é requerido em maior quantidade, este se encontra disponível, principalmente, nas formas de nitrato e de amônio, os quais podem ser fornecidos separadamente ou combinados. Poucos são os estudos sobre a micropropagação desta espécie em relação ao metabolismo do nitrogênio, e a respeito da influência do fornecimento isolado de diferentes formas nitrogenadas para propagação da mesma. Diante do exposto, o presente trabalho objetivou avaliar o crescimento, o desenvolvimento, e a assimilação do nitrogênio em *Ananas comosus* var. *ananassoides* cultivadas *in vitro* na presença de diferentes fontes nitrogenadas (nitrato, amônio e nitrato de amônio), tanto em plantas provenientes de segmentos nodais quanto em plantas provenientes de sementes, e com isso, determinar a melhor fonte nitrogenada para a sua propagação a fim de fornecer subsídios para estudos de propagação e, conseqüentemente, para conservação da espécie. Plantas obtidas *in vitro* de segmentos nodais e sementes foram cultivadas por sete meses em meio de cultura modificados com as formas de nitrato (NO_3^-), amônio (NH_4^+) e nitrato de amônio (NH_4NO_3), nas concentrações de 15, 30, 60, 90 mM de N, posteriormente as plantas foram aclimatizadas por três meses, verificando que 60 mM de NO_3^- e NH_4NO_3 foram os tratamentos mais indicados para o crescimento desta espécie *in vitro*, todavia as plantas cultivadas *ex vitro* apresentaram maior crescimento em 60 mM de NH_4NO_3 , observando também que as plantas cultivadas *in vitro* em 60 mM de NO_3^- e NH_4NO_3 apresentaram semelhanças nos comportamentos de crescimento e assimilação de N.

Palavras-chave: Bromeliaceae, Micropropagação, Nutrição Mineral, Cultivo *in vitro*.

ABSTRACT

Ananas comosus var. *Ananas* (Baker) Coppins F. Leal is a bromeliad that has ornamental potential and currently is being produced and exported as " cut flower " . However among the species of ornamental pineapples, it is still not economically exploited. Besides its scenic potential, this species is native to the cerrado, an endangered biome extinction studies and conservation measures of their species, making it necessary. *In vitro* culture, along with nutritional studies, has been used in the conservation of many plants of economic interest, as it allows the propagation and optimization of its growth. A major plant nutrient is nitrogen which is available mainly in the form of nitrate and ammonium, which can be supplied separately or combined in the culture medium. There are few studies about the micropropagation of this species using nodal segments on nitrogen metabolism, and the influence of the supply of different nitrogen forms isolated for propagation. Thereby, the aim of this study was to evaluate the growth, development and nitrogen assimilation in *A. comosus* var. *ananassoides* cultured *in vitro* in the presence of different nitrogen sources (nitrate, ammonium and ammonium nitrate) in plants from nodal segments and plants from seeds, and thus determine the best nitrogen source for its spread in order to provide for studies of propagation and to conserve species. Plants obtained *in vitro* from nodal segments and from the seeds were cultivated for seven months in the medium of culture modified with forms of nitrate (NO_3^-), ammonium (NH_4^+) and ammonium nitrate (NH_4NO_3) at concentrations of 15, 30, 60, 90 mM N, then the plants were acclimatized for three months, seeing that 60 mM of NO_3^- and of NH_4NO_3 were the treatments most suited to the growth of this species *in vitro*, however cultured *ex vitro* plants showed higher growth in 60 mM NH_4NO_3 , noting also that the *in vitro* cultured plants in 60 mM NO_3^- and NH_4NO_3 showed similar growth behavior and assimilation N.

Keywords: Bromeliaceae, Micropropagation, Mineral Nutrition, *In vitro* culture.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA: ácido abscísico
AGDH: atividade da glutamato desidrogenase
AGS: atividade da glutamina sintase
ANR: atividade da enzima nitrato redutase
ATP: adenosina trifosfato
CAE: conteúdo de amônio endógeno
CNE: conteúdo de nitrato endógeno
Co⁺²: cobalto bivalente
C: carbono
CO₂: dióxido de carbono
2-OG: 2-oxoglutarato
d.p.: desvio padrão
Fd_{red}: ferredoxina reduzida
FM: folhas mortas
γ: fótons
GDH: glutamato desidrogenase
GLN: glutamina
GLU: glutamato
GOGAT: glutamina oxoglutarato aminotransferase ou glutamato sintase
GOGAT-NADH: glutamato sintase dependentes de NADH citosólica
GOGAT-Fed: glutamato sintase dependentes de ferredoxina reduzida plastídica
GS: glutamina sintase
GS1: glutamina sintase citosólica
GS2: glutamina sintase plastídica ou cloroplástica
HATS: sistema de transportadores de alta afinidade
H₂O: água
H₂SO₄: ácido sulfúrico
IAA: auxina
IBt/SMA-SP: Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente de São Paulo
LATS: sistema de transportadores de baixa afinidade
Mg⁺²: magnésio bivalente
mM: milimolar
Mn⁺²: manganês bivalente

MS: massa seca

MS-1962: meio de cultura Murashige & Skoog (1962)

MS/2: meio de cultura Murashige & Skoog com 50% da concentração de macronutrientes

N: nitrogênio

N₂: nitrogênio molecular

NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

NH₄⁺: amônio

NH₄ NO₃: nitrato de amônio

NiR: nitrito redutase

NO₂⁻: nitrito

NO₃⁻: nitrato

NPPO: Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais

NR: nitrato redutase

PAR: radiação fotossinteticamente ativa

m/v: massa/volume

RBMG: Reserva Biológica de Mogi Guaçu

RCF: força centrífuga relativa ou força g

RL: raízes laterais

RuBisCo: ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase

TA: tempo aclimatização

¹TCA: ácido tricloroacético

TCA: ciclo do ácido tricarboxílico

TF: tempo final

TI: tempo inicial

Tris-HCl: tris(hidroximetil)aminometano cloridrato

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| INTRODUÇÃO GERAL..... | 1 |
| 1. Bromeliaceae e <i>Ananas comosus</i> var. <i>ananassoides</i> (Baker) Coppens & F. Leal | 2 |
| 1.1. Micropropagação | 3 |
| 1.2. Nitrogênio (N) | 5 |
| 1.3. Assimilação de N | 6 |
| 1.4. Aclimatização | 9 |
| 2. Justificativa e hipóteses | 10 |
| MATERIAL E MÉTODOS GERAL | 12 |
| 3. Obtenção das plantas a partir de sementes | 12 |
| 3.1. Obtenção das plantas a partir de segmentos nodais | 13 |
| 3.2. Transferência das plantas para as diferentes fontes de N | 14 |
| 3.3. Aclimatização | 15 |
| 3.4. Coleta de material vegetal, delineamento experimental e parâmetros analisados | 15 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 18 |

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO 1: Efeito de diferentes fontes inorgânicas de nitrogênio no crescimento de <i>Ananas comosus</i> var. <i>ananassoides</i> (Baker) Coppens & F. Leal..... | 30 |
|--|-----------|

| | |
|---|----|
| RESUMO..... | 31 |
| 1. INTRODUÇÃO | 32 |
| 2. MATERIAL AND MÉTODOS | 36 |
| 2.1. Obtenção dos segmentos nodais | 36 |
| 2.1.1 Obtenção das plantas a partir de segmentos nodais e o crescimento <i>in vitro</i> em diferentes fontes e concentrações de N | 37 |
| 2.2. Coleta do material vegetal delineamento experimental e parâmetros analisados..... | 39 |
| 2.3. Ensaio da enzima nitrato redutase (NR) | 40 |
| 2.4. Extração enzimática para análise da glutamina sintase (GS) glutamato desidrogenase dependente de NADH (GDH-NADH) | 41 |
| 2.4.1. Ensaio enzimático da GS | 41 |
| 2.4.2. Ensaio enzimático da GDH-NADH | 42 |
| 2.5. Determinação do conteúdo endógeno de amônio (NH ₄ ⁺) e nitrato (NO ₃ ⁻) | 43 |
| 2.5.1. Preparação do extrato vegetal | 43 |
| 2.5.2. Determinação do conteúdo endógeno de NH ₄ ⁺ | 43 |
| 2.5.3. Determinação do conteúdo endógeno de NO ₃ ⁻ | 44 |

| | |
|--|----|
| 2.6. Determinação do conteúdo de pigmentos | 44 |
| 2.7. Análises estatísticas dos resultados..... | 45 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 45 |
| 3.1. Obtenção das plantas <i>in vitro</i> a partir de segmentos nodais | 45 |
| 3.2. Crescimento nas diferentes fontes e concentrações de N | 45 |
| 3.3. Assimilação de N na parte aérea de plantas cultivadas <i>in vitro</i> em diferentes formas e concentrações de N | 54 |
| 3.4. Aclimatização das plantas obtidas <i>in vitro</i> nas diferentes concentrações e fontes de N..... | 59 |
| 4. CONCLUSÃO | 63 |
| 5. AGRADECIMENTOS | 64 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 64 |

CAPÍTULO 2: Assimilação do nitrogênio na bromélia *Ananas comosus* var. *ananassoides* (Baker) Coppins & F.Leal provenientes de sementes ou segmentos nodais cultivadas *in vitro* na presença de nitrato ou nitrato de amônio..... **79**

| | |
|--|----|
| RESUMO..... | 80 |
| 1. INTRODUÇÃO | 81 |
| 2. MATERIAL AND MÉTODOS | 83 |
| 2.1. Obtenção das plantas a partir de sementes | 83 |
| 2.2. Obtenção das plantas a partir de segmentos nodais | 84 |
| 2.3. Transferência das plantas para as diferentes fontes de N | 84 |
| 2.4. Coleta de material vegetal, delineamento experimental e parâmetros analisados | 85 |
| 2.5. Ensaio das enzimas nitrato redutase (NR) glutamina sintase (GS) e glutamato desidrogenase dependente de NADH (GDH-NADH) | 86 |
| 2.6. Determinação do conteúdo endógeno de amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-) | 86 |
| 2.6.1. Preparação do extrato vegetal | 86 |
| 2.6.2. Determinação do conteúdo endógeno de NH_4^+ | 87 |
| 2.6.3. Determinação do conteúdo endógeno de NO_3^- | 87 |
| 2.7. Determinação do conteúdo de pigmentos fotossintéticos..... | 88 |
| 2.8. Análises estatísticas dos resultados..... | 88 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 89 |
| 3.1. Caracterização das plantas obtidas <i>in vitro</i> a partir de sementes e segmentos nodais utilizadas nos tratamentos..... | 89 |
| 3.2. Crescimento das plantas originadas de sementes e de segmentos nodais nas diferentes fontes de N | 93 |

| | |
|--|-----|
| 3.3. Assimilação de N na parte aérea de plantas obtidas a partir de sementes e segmentos nodais cultivadas <i>in vitro</i> em diferentes fontes de N | 96 |
| 4. CONCLUSÃO | 101 |
| AGRADECIMENTOS | 101 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 102 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 112 |

INTRODUÇÃO GERAL

1. Bromeliaceae e *Ananas comosus* var. *ananassoides* (Baker) Coppens & F. Leal

A família Bromeliaceae possui 58 gêneros e aproximadamente 3.248 espécies (Luther, 2010) e está dividida em oito subfamílias Brocchinioideae, Bromelioideae, Hechtioideae, Lindmanioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae e Tillandsioideae (Givnish et al., 2007, 2011, 2014).

Pertencente à subfamília Bromelioideae, o gênero *Ananas*, compreende espécies cultivadas e silvestres (Crestani et al., 2010). Este gênero apresenta grande relevância em termos econômicos (Albert, 2004; Crestani et al., 2010), sendo as cultivares de *Ananas comosus* (L.) Merrill, muito utilizadas para o consumo *in natura* e industrializado (Cotias-de-Oliveira et al., 2000; Albert, 2004; Crestani et al., 2010; Coppens D'Eeckenbrugge et al., 2011).

Além de sua relevância na indústria alimentícia, algumas bromélias servem ainda para uso medicinal, agrícola com a extração de suas fibras e também possuem grande potencial paisagístico (Paula e Silva, 2004; Silva, 2006; Crestani et al., 2010; Coppens D'Eeckenbrugge et al., 2011). As bromélias são muito utilizadas na ornamentação devido às suas inflorescências que duram muitos meses e às suas folhas vistosas (Paula e Silva, 2004; Nunes, 2006; Carvalho et al., 2012). Dentre estas, podem se destacar os abacaxizeiros ornamentais, que vêm sendo muito utilizados no Brasil, Europa e Estados Unidos (Paula e Silva, 2004; Carvalho et al., 2009, Souza et al., 2012; Dias et al., 2013).

Coppens D'Eeckenbrugge e Leal (2003) propuseram uma nova classificação para as espécies do gênero *Ananas*, levando em consideração as características morfológicas, bioquímicas e moleculares, além da distribuição geográfica e da biologia reprodutiva destas espécies. Sendo assim, com esta nova classificação, a espécie de abacaxizeiro ornamental, *Ananas ananassoides* (Baker) L.B. Smith passou a ser denominada, *Ananas comosus* var.

ananassoides (Baker) Coppens & F. Leal, (Coppens D'Eeckenbrugge & Leal, 2003; Coppens D'Eeckenbrugge et al., 2011).

O *A. comosus* var. *ananassoides*, também denominado de ananás do campo (Silva, 2006; Crestani et al., 2010), ainda é pouco explorado economicamente (Silva, 2006; Souza et al., 2007; Crestani et al., 2010) e destaca-se dentre as demais espécies, por possuir inflorescência globosa, sustentando brácteas com flores completas e pequenas. Sua infrutescência apresenta coloração de amarelo creme a rosa, mede de 8 a 10 cm e fica disposta na posição apical da haste que pode medir até 80 cm (Fig. 1) (Paula e Silva, 2004; Souza et al., 2007). Devido a estas características, esta espécie vem sendo cultivada visando à exportação como "flor de corte" (Paula e Silva, 2004, Souza et al. 2012).



Figura 1: Aspecto geral das plantas de *Ananas comosus* var. *ananassoides* (Baker) Coppens & F. leal. Fotos tiradas de espécimes encontrados na Reserva Biológica de Mogi Guaçu do IBt/SMA-SP. A) Vista vertical da inflorescência. B) Vista longitudinal da inflorescência. Fotos: Priscila P. A. Silva.

Além de sua importância no mercado de plantas ornamentais, *A. comosus* var. *ananassoides*, é uma espécie nativa do cerrado (Vieira et al., 2006, Proença e Sajo, 2007), bioma pertencente aos 34 *hotspots* globais de biodiversidade (áreas de grande biodiversidade e endemismo que estão sob alto risco de extinção) (Myer et al. 2000; Orme et al., 2005), assim, medidas de conservação de suas espécies são necessárias. Fato que eleva a importância dos estudos com esta espécie.

Uma forma de contribuir com a conservação de uma espécie vegetal, pode ser por meio dos estudos sobre a sua micropropagação.

1.1. Micropropagação

A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação, tem sido um instrumento utilizado em diversos estudos com bromélias de interesse ornamental, com espécies endêmicas, raras e/ou ameaçadas de extinção (Mercier e Kerbauy, 1995, 1996; Pasqual et al., 2008; Dias et al., 2011a, 2011b; Dias et al. 2013) e, também, para a produção comercial de plantas, mostrando ser uma ferramenta importante nos estudos biotecnológicos (Engelmann, 1991; fay, 1992, 1994; Sarasam et al., 2006, Carvalho et al., 2012).

Em comparação com os métodos convencionais de propagação que fornecem baixos números de plantas em longos períodos de tempo, além de não garantir qualidade fitossanitária destas, o cultivo *in vitro* oferece grande número de plantas em curto período de tempo, garantindo plantas livres de microrganismos, o que não ocorre no ambiente natural (Pasqual et al., 2008, Carvalho et al., 2012, Krishna et al, 2016).

Na ultima década, vêm sendo realizados vários estudos sobre a produção de mudas micropropagadas de abacaxizeiros ornamentais, principalmente com as espécies, *A. comosus* var. *bracteatus* (Lindl.) Coppens & F. Leal e *A. comosus* var. *erectifolius* (L.B. Smith) coppens & F. Leal, (Borges, 2000; Borges et al., 2003; Costa e Zaffari, 2005; Pereira et al. 2006; Bomfim et al., 2007a, 2007b; Oliveira et al., 2007; Azevedo et al., 2008; Dias et al., 2008; Pasqual et al., 2008; Santos et al., 2008; Silva et al., 2008; Carvalho et al., 2009; Correia et al., 2009; Souza et al., 2009; Correia et al., 2010; Dias et al., 2010; Oliveira et al., 2010; Bomfim et al., 2011; Correia et al., 2011; Dias et al., 2011a, 2011b; Moreira et al., 2011; Carvalho et al. 2012; Dias et al., 2013). Entretanto, ainda são poucos os trabalhos de micropropagação desenvolvidos com *A.comosus* var. *ananassoides* (Dias et al., 2008, Dias et al., 2010; Dias et al., 2011a, 2011b; Carvalho et al., 2012, Dias et al., 2013), visto a sua importância tanto ecológica quanto ornamental.

Dias et al. (2013) estudaram o efeito de diferentes concentrações de nitrogênio, fósforo e potássio no crescimento *in vitro* de plantas de *A. comosus* var. *ananassoides* obtidas a partir de gemas axilares e verificaram que alterações nas concentrações de macronutrientes do meio de cultura elaborado por Murashige e Skoog (1962) (MS-1962), favoreceram o crescimento das plantas.

Entre alguns métodos de micropropagação pode-se citar a multiplicação por estiolamento caulinar, que poderia ser utilizado com a bromélia *A. comosus* var. *ananassoides* (Dias et al., 2008; Dias et al., 2011b; Silva; Tamaki, 2012). Todavia, a maioria dos trabalhos desenvolvidos, utilizando esta técnica, sugere o uso de reguladores de crescimento no meio de cultivo, cuja utilização pode estar associada à indução de variações somaclonais, sendo impróprio quando se visa obter lotes para a conservação de uma espécie e para produção em larga escala (Tamaki et al., 2007a). No entanto, Silva e Tamaki (2012), trabalhando com esta espécie, não utilizaram reguladores de crescimento na micropropagação e conseguiram propagar via estiolamento caulinar, mostrando ser possível o uso desse método.

A seleção do meio de cultura mais adequado é fundamental para o estabelecimento do cultivo *in vitro*, uma vez que a nutrição mineral implica no crescimento e desenvolvimento das plantas (Bunn et al., 2011). Na maioria das vezes os meios de cultura utilizados são baseados em formulações básicas modificadas (Kanashiro, 2005; Kanashiro et al., 2007), sendo a formulação do meio de MS-1962 a mais utilizada para o cultivo *in vitro* (Werner et al., 2010;). E dentre os nutrientes que compõem os meios de culturas o nitrogênio (N) é um dos mais importantes

Segundo Marschner e Marschner (2012) o N é o quarto elemento mais abundante nas plantas, ocorrendo apenas em menor quantidade que o carbono, o oxigênio e o hidrogênio.

1.2. Nitrogênio (N)

O N é parte de estrutura química das várias substâncias envolvidas no metabolismo das plantas, tais como aminoácidos, poliaminas, proteínas, ácidos nucleicos, fitormônios, clorofilas e coenzimas, além de compor moléculas envolvidas no metabolismo secundário, como alcaloides (Raven et al., 2007, Marschner e Marschner, 2012; Buchanan et al. 2015). Além de desempenhar função estrutural o N também apresenta papel de sinalizador, para transcrição de genes específicos relacionados com a absorção, transporte e assimilação de N, assim como para o balanço endógeno dos hormônios auxinas/citocininas que atuam no crescimento e desenvolvimento vegetal (Crawford, 1995, Miller et al., 2007; Tamaki e Mercier, 2007b; Garnica et al., 2010). Quando há carência de N este é translocado das folhas mais velhas, que apresentam clorose, para as folhas mais jovens que apresentam um menor desenvolvimento (Marschner e Marschner, 2012).

No solo o N apresenta disponibilidade reduzida, mas é abundante na atmosfera (Epstein e Bloom, 2006). Apesar dessa abundância, o nitrogênio atmosférico (N_2) necessita ser transformado nas formas inorgânicas, amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-), para ser absorvido pelas raízes das plantas (Marschner e Marschner, 2012). Além das formas inorgânicas, o N também pode ser absorvido em formas orgânicas, como aminoácidos e ureia, providos da decomposição da matéria orgânica (geradas a partir das excretas de animais e da degradação de animais e vegetais mortos) (Epstein e Bloom, 2006). Todavia, a forma orgânica de N é mais escassa para absorção pelas raízes das plantas, devido a grande competição com os microorganismos presentes no solo. Desta forma, os íons NH_4^+ e NO_3^- são as fontes de N mais disponíveis para absorção, sendo o NO_3^- a principal e mais abundante fonte disponível na maioria dos solos (Marschner e Marschner, 2012).

O uso de NO_3^- ou de NH_4^+ separadamente ou combinados tem proporcionado bons resultados na organogênese e na morfogênese *in vitro*, assim como para o crescimento e desenvolvimento de algumas espécies de plantas (Lakshmanan e Taji, 2000). Laukkanen et al.

(1997) estudaram o efeito de diferentes fontes de N em culturas de calos de *Pinus sylvestris* em meio Murashige e Skoog (1962) modificado e indicaram que o crescimento dos calos foi baixo no meio de cultura que continha somente NO_3^- , comparados aos calos que cresceram na presença de nitrato de amônio (NH_4NO_3), cujo o desenvolvimento mostrou-se superior. Já para *Helianthus annuus* L., obtiveram maior biomassa, as plantas cultivadas apenas com NO_3^- com fonte de N (Silva et al., 2010). Todavia, plantas de *Catsetum fimbriatum* (Morren) Lindl. (Majerowisc et al, 2000) e de *Solanum lycopersicum* L. cv. Rio Grande (Horchani et al., 2010) obtiveram maior crescimento quando cultivadas apenas em NH_4^+ , quando comparadas as plantas cultivadas em NO_3^- , como fonte de N (Garbin e Dillenburg, 2008). Sendo assim, a preferência pela absorção de NO_3^- e /ou NH_4^+ pode variar de acordo com a espécie.

1.3. Assimilação de N

Em plantas superiores a assimilação de N é o segundo maior processo metabólico, superado apenas pela fixação fotossintética do CO_2 (Lemos et al, 1999). Devido a este fato, a concentração e a forma do N presente no substrato influencia diretamente o crescimento da planta (Yoneyama, 2001; Prado, 2008).

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, 2008; Marschner e Marschner, 2012; Buchanan et al. 2015) 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; 2001b; Tamaki e Mercier, 2007). Além de metabolizado, o N absorvido na forma de NO_3^- também pode ser armazenado no vacúolo das células (Prado, 2008).

O NH_4^+ é absorvido pelas raízes por processo ativo, quando em baixas concentrações, e por processo passivo em altas concentrações (Kerbaudy, 2008). Após a absorção, o íon é rapidamente assimilado na forma orgânica, 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 e Zeiger, 2013). 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). Estudos indicam que a combinação destes dois íons favorece o crescimento *in vitro* de várias espécies (Araujo et al., 2009). Entretanto, o efeito benéfico destes dois íons ainda não é bem entendido (Niedz e Evens, 2008; Lu et al., 2009, Garnica et al. 2010, Andrews et al., 2013).

O N presente na molécula de NO_3^- pode ser assimilado em aminoácidos pelas plantas, apenas quando esse composto nitrogenado é reduzido e hidrolisado formando NH_4^+ (Sodek, 2004, Prado, 2008). A redução completa do NO_3^- até NH_4^+ ocorre em duas etapas: após ser absorvido, o NO_3^- é reduzido a nitrito (NO_2^-) pela enzima nitrato redutase (NR) localizada no citosol. O NO_2^- é citotóxico, devendo ser rapidamente reduzido a NH_4^+ . A enzima responsável por essa segunda etapa é a nitrito redutase (NiR) que utiliza a ferredoxina reduzida (Fd_{red}) como cofator e está localizada nos cloroplastos (tecidos clorofilados) ou nos plastídios (tecidos não clorofilados) (Fig. 2) (Heldt, 1997; Sodek, 2004; Prado, 2008; Taiz e Zeiger, 2013; Marschner e Marschner, 2012).

O NH_4^+ pode ser incorporado em aminoácidos pela ação combinada da glutamina sintase (GS) e glutamina oxoglutarato aminotransferase (GOGAT) (Marschner e Marschner, 2012; Buchanan et al. 2015) Existem duas isoformas para ambas as enzimas, sendo a GS1/NADH-GOGAT encontrada principalmente no citosol e a GS2/Fd-GOGAT localizada nos plastídios (nos tecido não fotossintetizantes) e cloroplastos (Masclaux-Daubresse et al., 2010, Xu et al., 2012). GS tem grande afinidade pela molécula de NH_4^+ e está presente em todos os tecidos vegetais (Marschner e Marschner, 2012; Buchanan et al. 2015). Esta enzima tem a função de combinar o NH_4^+ com o glutamato (GLU) para produzir glutamina (GLN). Essa reação necessita da hidrólise de um ATP e envolve um cátion divalente, como o Mg^{+2} , Mn^{+2} ou Co^{+2} como cofator (Sodek, 2004, Prado, 2008). Posteriormente, a GLN formada tem

o seu grupo amida transferido para o 2-oxoglutarato, produzindo duas moléculas de GLU pela GOGAT (Fig. 2) (Prado, 2008; Marschner e Marschner, 2012).

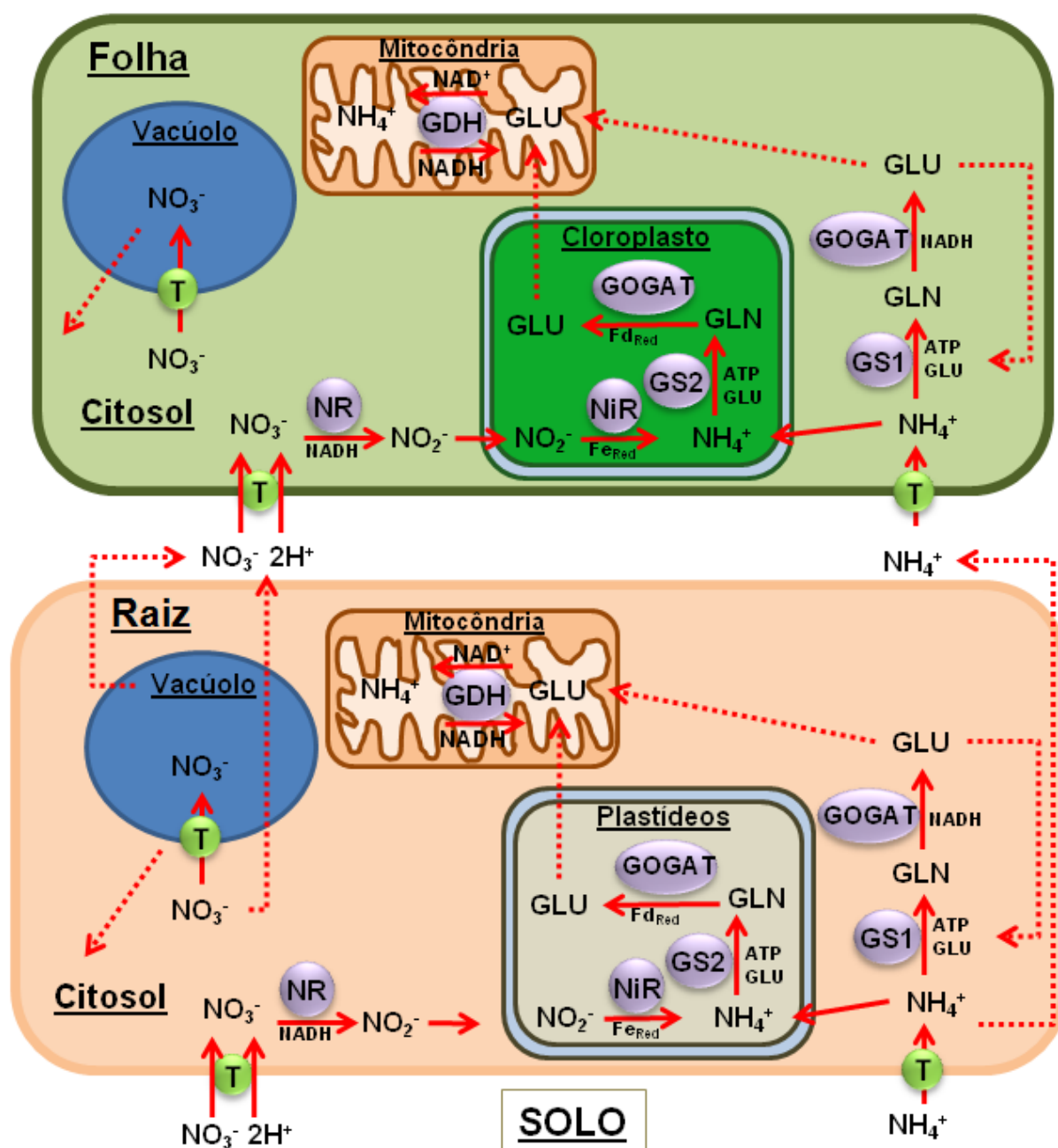


Figura 2: Esquema da absorção e assimilação das fontes inorgânicas de nitrogênio nas células da raiz e folha das plantas. A) Etapas da assimilação do nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+) na parte aérea da planta. B) Etapas da assimilação do NO_3^- e NH_4^+ na parte radicular da planta. Respectivos componentes da assimilação: NO_3^- , nitrato redutase - NR, nitrito - NO_2^- , nitrito redutase - NiR, NH_4^+ , glutamina sintase citosólica e plastídica - GS1/GS2, respectivamente, glutamina oxoglutarato aminotransferase citosólica e plastídica - NADH-GOGAT/Fd-GOGAT, respectivamente, glutamato desidrogenase - GDH. Adaptado: Bredemeier & Mundstock, 2000.

A desidrogenase do glutamato (GDH) é outra enzima que tem uma importante função no metabolismo do nitrogênio, e encontra-se localizada na mitocôndria (Mifflin e Habash, 2002, Luo et al., 2015). Antes da descoberta da via de assimilação GS/GOGAT, acreditava-se que a GDH tinha a função única de catalisar a síntese de GLU a partir de NH_4^+ e 2-oxoglutarato (Epstein e Bloom, 2006). Entretanto, o trabalho de Cammaerts e 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 NH_4^+ , enquanto a GDH-desaminante forneceria esqueletos carbônicos para o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) em condições onde há baixa disponibilidade de carbono. Assim, a GDH faria uma ligação entre os metabolismos do carbono e do nitrogênio (Robinson et al., 1991). Stitt et al. (2002) sugerem que a ação da GDH possa variar de acordo com as necessidades celulares em relação aos conteúdos de GLU e esqueletos carbônicos.

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.

1.4. Aclimatização

Após a produção das plantas *in vitro*, há a necessidade de se aclimatizar os exemplares para que completem o seu ciclo de vida. Assim, a aclimatização é o estágio no qual as plantas obtidas por meio do cultivo *in vitro* são transferidas para condições *ex vitro* antes da transferência para o campo (Grattapaglia e Machado 1998). Essa etapa envolve: substituição de uma condição heterotrófica (fornecimento de carbono na forma de açúcar) para outra autotrófica (sem o fornecimento de açúcar); transferência das plantas de uma situação de reduzido fluxo respiratório para um ambiente que demanda o aumento da taxa de transpiração, podendo levar ao estresse hídrico, mudança de uma condição de alta disponibilidade de nutrientes para outra onde é necessário incrementar a absorção de sais e

passagem de um ambiente asséptico para outro onde a planta estará sujeita ao ataque de microorganismos (Hartmann et al., 2002). Em algumas espécies essa mudança súbita pode representar um fator limitante para o processo de propagação (Grattapaglia e Machado 1998), justificando a importância dos estudos de aclimatização.

2. Justificativas e hipóteses

O Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais (NPPO) do Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente (IBt/SMA-SP), local onde foi desenvolvido o presente trabalho, visa, entre outros, o estudo de conservação de bromélias ornamentais, por meio do cultivo *in vitro*.

A preservação de espécies nativas, está no Plano de Ação para os Jardins Botânicos Brasileiros (Pereira et al., 2004), que propõe como metas-chave, garantir a proteção e inclusão de plantas nativas em suas coleções vivas.

O NPPO abriga uma coleção com cerca de 160 espécies de bromélias distribuídas em 1.158 exemplares, constituindo-se num importante patrimônio genético de Bromeliaceae. No entanto, aspectos relacionados ao estudo da conservação das bromélias não foram ainda avaliados, sendo esta uma nova linha iniciada nesse núcleo de pesquisa.

O presente trabalho é importante para o IBt/SMA -SP, por se tratar de produção de planta nativa e ornamental, através do cultivo *in vitro*, que pode ser uma ferramenta fundamental para a conservação dessa espécie em um pequeno espaço físico, além de fornecer material necessário para um futuro trabalho de reintrodução ou repovoamento com esta espécie, caso houver necessidade. Além de servir de respaldo para futuros estudos de produção de mudas para atender o mercado paisagístico, visto que esta espécie possui grande potencial ornamental.

Este trabalho é complementar aos estudos desenvolvidos pela orientadora e pela aluna, no qual se observou que *A. comosus* var. *ananassoides* se desenvolve melhor de 15 a 60 mM de nitrogênio (Trabalho de Iniciação Científica com bolsa CNPq no IBt desenvolvido

pela aluna em 2011-2012 e 2012-2013), justificando as concentrações que foram utilizadas no presente trabalho, também verificou-se a possibilidade da obtenção de plantas a partir de segmentos nodais, sem a utilização de reguladores de crescimento (Trabalho de Iniciação Científica com bolsa CNPq no IBt desenvolvido pela aluna em 2012-2013), fato de grande importância, pois a utilização destas substâncias, possuem altos custos e, podem induzir a variações somaclonais.

Todavia, não foram encontrados na literatura, trabalhos que avaliassem o crescimento e desenvolvimento desta espécie, em diferentes formas de nitrogênio inorgânico (NH_4^+ , NO_3^- e NH_4NO_3). Devido a isso e aos resultados dos trabalhos desenvolvidos anteriormente com *A. comosus* var. *ananassoides*, houve a necessidade de se verificar qual a melhor fonte inorgânica para o crescimento desta espécie e, se as plantas provenientes dos segmentos nodais se comportariam da mesma forma que as provenientes de sementes. Assim, um primeiro estudo foi em relação à assimilação do nitrogênio, promovendo um avanço nas pesquisas com nutrição nitrogenada, micropropagação e conservação de bromélias, logo que não foram encontrados registros de estudos sobre o metabolismo do nitrogênio com esta espécie, nem estudos que comparam o metabolismo entre plantas provenientes de sementes com plantas provenientes de segmentos nodais.

Sendo assim este trabalho se baseia nas seguintes hipóteses:

(i) As plantas de *A. comosus* var. *ananassoides* apresentarão maior desenvolvimento sob o cultivo na fonte de NH_4NO_3 , visto o papel de sinalização celular que ambos os íons (NH_4^+ , NO_3^-) desempenham e que são importantes para o balanço dos hormônios (auxinas e citocininas) responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento vegetal.

(ii) Cada fonte inorgânica de N (NH_4^+ , NO_3^- e NH_4NO_3) influencia de maneira diferente as atividades das enzimas responsáveis pela assimilação de N, visto que estes íons são substratos de diferentes enzimas na via de assimilação N;

(iii) Existem diferenças no crescimento e na assimilação de nitrogênio entre as plantas de *A. comosus* var. *ananassoides* provenientes de sementes e de segmentos nodais, visto a diferença na origem (zigótica e somática) e idade cronológica.

Com isso, visa-se responder as seguintes questões:

(i) Qual a melhor fonte de nitrogênio inorgânico para o crescimento e desenvolvimento de *A. comosus* var. *ananassoides*?

(ii) Como ocorre a assimilação de nitrogênio na fonte de maior crescimento para as plantas de *A. comosus* var. *ananassoides* em relação as demais fontes?

(iii) O crescimento e a assimilação do nitrogênio nas plantas de *A. comosus* var. *ananassoides* obtidas a partir de sementes e de segmentos nodais é diferente?

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o crescimento e desenvolvimento e, a assimilação do nitrogênio em *Ananas comosus* var. *ananassoides* (Baker) Coppens & F. Leal cultivadas *in vitro* na presença de diferentes fontes inorgânicas de nitrogênio, em plantas provenientes de segmentos nodais e em plantas provenientes de sementes, e com isso, determinar a melhor fonte nitrogenada para a sua propagação.

MATERIAL E MÉTODOS GERAL

3. Obtenção das plantas a partir de sementes

O experimental foi realizado no NPPO do IBt/SMA-SP e as sementes de *Ananas comosus* var. *ananassoides* (Baker) Coppens & F. Leal. utilizadas nos experimentos foram obtidas de frutos coletados na Reserva Biológica de Mogi Guaçu do IBt/SMA-SP (Fig. 3). Posteriormente ao beneficiamento dos frutos para obtenção das sementes, estas foram acondicionadas em sacos de papel pardo e armazenadas em condições de refrigeração a 10 °C.



Figura 3: Aspecto geral de plantas e fruto de *Ananas comosus* var. *ananassoides* (Baker) Coppens & F.Leal. Foto tirada de espécimes encontrados na Reserva Biológica de Mogi Guaçu do Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo (RBMG do IBt/SMA-SP). A) Inflorescências protegidas com tule, para preservação dos futuros frutos. B) Corte longitudinal do fruto maduro coletado na RBMG-IBt/SMA-SP. B) Barra de escala corresponde a 5 cm. Foto: Priscila P. A. Silva.

As plantas de *A. comosus* var. *ananassoides* utilizadas no experimento, foram obtidas da germinação de sementes em placas de Petri do mesmo modo como descrito por Araujo et al. (2012).

3.1. Obtenção das plantas a partir de segmentos nodais

Já para a obtenção dos segmentos nodais, sementes de *A. comosus* var. *ananassoides* foram germinadas e transferidas para frascos contendo do meio Murashige & Skoog (1962) (MS-1962) com 50% da concentração de macronutrientes (MS/2), por dois meses em sala de cultura, sob condições controladas. Após esse período as plantas tiveram suas folhas cortadas e foram transferidas para frascos contendo o meio MS/2, que foram colocados no escuro, onde permaneceram por cinco meses, visando o estiolamento do eixo caulinar das plantas. Posteriormente, as plantas estioladas tiveram os segmentos nodais isolados (Fig. 4).

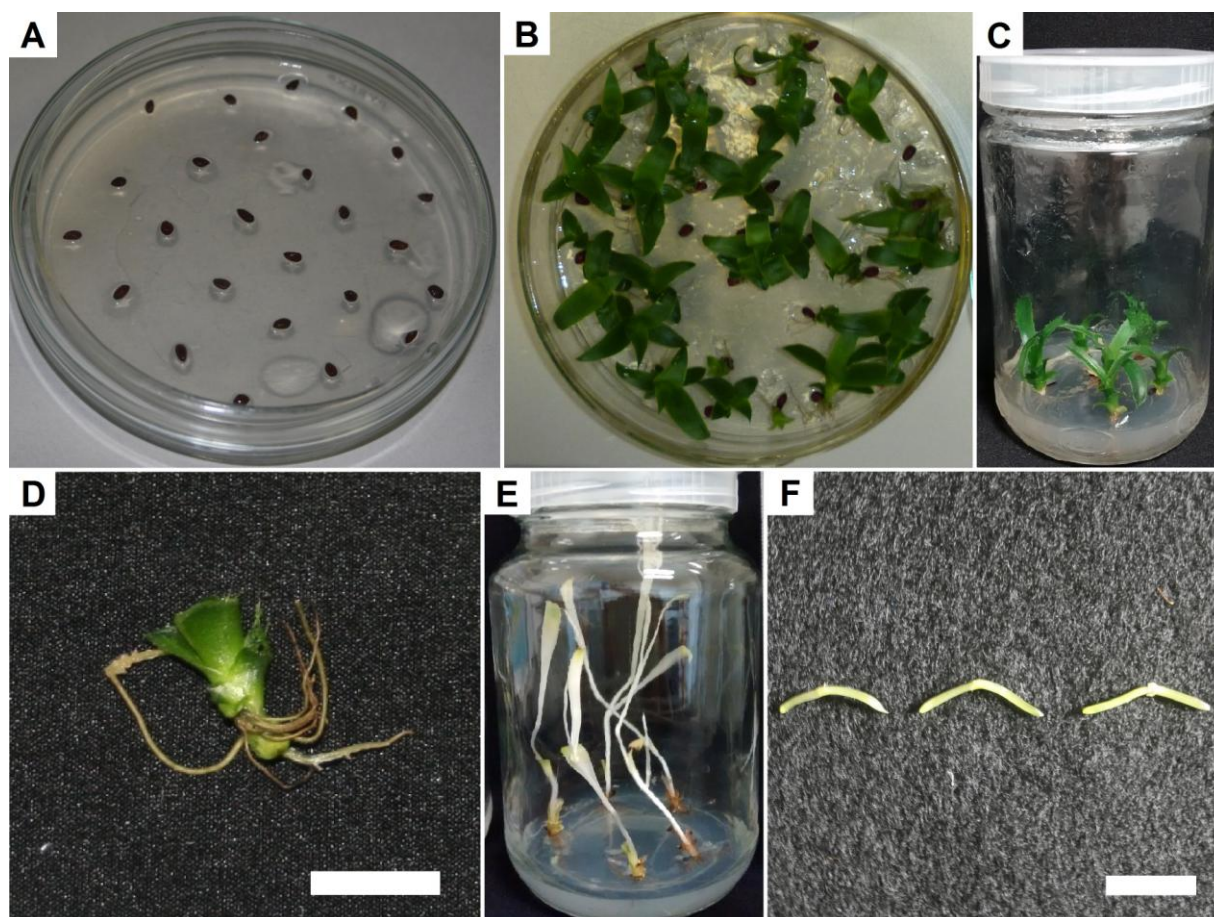


Figura 4: Etapas de obtenção dos segmentos nodais. A) Sementes depositadas em placas de Petri de 10 cm de diâmetro contendo meio constituído por H₂O, 3% (p/v) de sacarose e 0,5% (p/v) de ágar. B) Plântulas após 127 dias de germinação. C) Plantas após dois meses de cultivo em frasco de 350 mL contendo o meio MS/2. D) Planta com as folhas cortadas. E) Plantas estioladas após cinco meses de cultivo em frasco 500 mL contendo o meio MS/2. F) Segmentos nodais isolados das plantas estioladas. D e F – Barra de escala corresponde a 1 cm. Foto: Priscila P. A. Silva.

3.2. Transferência das plantas para as diferentes fontes de N

As plantas e os segmentos nodais obtidos *in vitro* (descritos nos itens 3 e 3.1), foram transferidos para frascos contendo o meio MS/2, onde permaneceram por dois meses em sala de cultura sob condições controladas. Posteriormente, as plantas foram transferidas para frascos contendo o meio MS-1962 modificado com as diferentes fontes de N inorgânico NH₄⁺, NO₃⁻ e NH₄NO₃, cujas concentrações foram 15 mM, 30 mM, 60 mM e 90 mM (para cada fonte de N), permanecendo por sete meses sob as mesmas condições controladas.

As plantas cultivadas por dois meses em meio MS/2, assim como as plantas cultivadas por sete meses em meio MS-1962 modificado com as diferentes fontes (NH₄⁺,

NO_3^- e NH_4NO_3) e concentrações (15, 30, 60 e 90 mM) de N, foram transferidas para novos frascos de contendo o meio MS modificado com as diferentes fontes e concentrações de N, antes de 24 horas das coletas de material vegetal para as análises (descritas no item 3.4), visando garantir o suprimento de N para as plantas.

3.3. Aclimatização

As plantas obtidas após sete meses de cultivo *in vitro* nas diferentes fontes (NH_4^+ , NO_3^- e NH_4NO_3) e suas respectivas concentrações (15, 30, 60 e 90 mM), foram transferidas para bandejas contendo areia lavada como substrato, sendo regadas quinzenalmente, com solução nutritiva constituída pela formulação de MS-1962 modificado, sem sacarose e ágar e com as diferentes fontes de N fornecidas nas formas inorgânicas de NH_4^+ , NO_3^- e NH_4NO_3 , cujas concentrações foram 15, 30, 60 e 90 mM (de acordo com o tratamento do qual foram cultivadas anteriormente *in vitro*), por um período de três meses em sala de cultura sob as mesmas condições controladas. Ressalta-se que a última rega foi feita 24 horas antes da coleta de material vegetal para as análises (descritas no item 3.4) em todos os tratamentos.

3.4. Coleta de material vegetal, delineamento experimental e parâmetros analisados.

As coletas de material vegetal para todas as análises foram feitas nos seguintes períodos do experimento (Fig. 5):

- Tempo inicial (TI): plantas cultivadas (por dois meses) em MS/2, após 24 horas de transferência para meios contendo MS-1962 modificado com as diferentes fontes (NH_4^+ , NO_3^- e NH_4NO_3) e concentrações (15, 30, 60, 90 mM) de N.

- Tempo final (TF): plantas cultivadas (por sete meses) em MS-1962 modificado com as diferentes fontes e concentrações de N, após 24 horas de transferência para novos meios contendo as mesmas fontes e concentrações de N, cujas plantas foram anteriormente cultivadas.

- Tempo aclimatização (TA): plantas cultivadas (por três meses) em bandejas e, regadas com solução MS-1962 modificado com as diferentes fontes e concentrações de N, após 24 horas à última rega.

As coletas de material vegetal em TI e TF foram feitas em intervalos de quatro horas até completar um ciclo de 24 horas, obtendo-se o total de sete pontos de coleta em 24 horas, sendo a primeira coleta feita após três horas início do período luminoso da sala e cultura. Já em TA foi feita única coleta de material vegetal, após três horas início do período luminoso da sala e cultura (Fig. 5). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial $2 \times 3 \times 4$, constituído de duas origens (semente e segmento nodal), três diferentes fontes de nitrogênio (NH_4^+ , NO_3^- e NH_4NO_3) e quatro concentrações de N (15, 30, 60 e 90 mM). Sendo que cada parcela experimental (ou seja, uma concentração de uma fonte de N) foi constituída por 35 frascos, com cinco plantas (cada frasco) e três repetições.

Os parâmetros analisados foram: comprimento das partes aérea e radicular, número de folha e raiz, massas fresca e seca das partes aérea e radicular, quantificação de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b* e carotenoides), quantificação de NH_4^+ e NO_3^- endógenos. Além das atividades das enzimas: nitrato redutase (NR), glutamina Sintase (GS) e glutamato desidrogenase dependente de NADH (GDH-NADH). A quantidade de plantas utilizadas para cada análise, assim como a descrição detalhada dos métodos utilizados serão descritos nos próximos capítulos desta dissertação.

O texto com os principais resultados e discussões do presente trabalho foi dividido em dois capítulos formatados na forma de artigos científicos. Sendo assim, o capítulo 1 corresponde aos resultados e discussão que respondem a primeira e a segunda questão, levantadas pelo projeto e o capítulo 2 corresponde aos resultados e discussão que respondem a terceira e última questão. Ressalta-se que a tradução para língua inglesa será realizada posteriormente para a submissão destes aos periódicos internacionais.

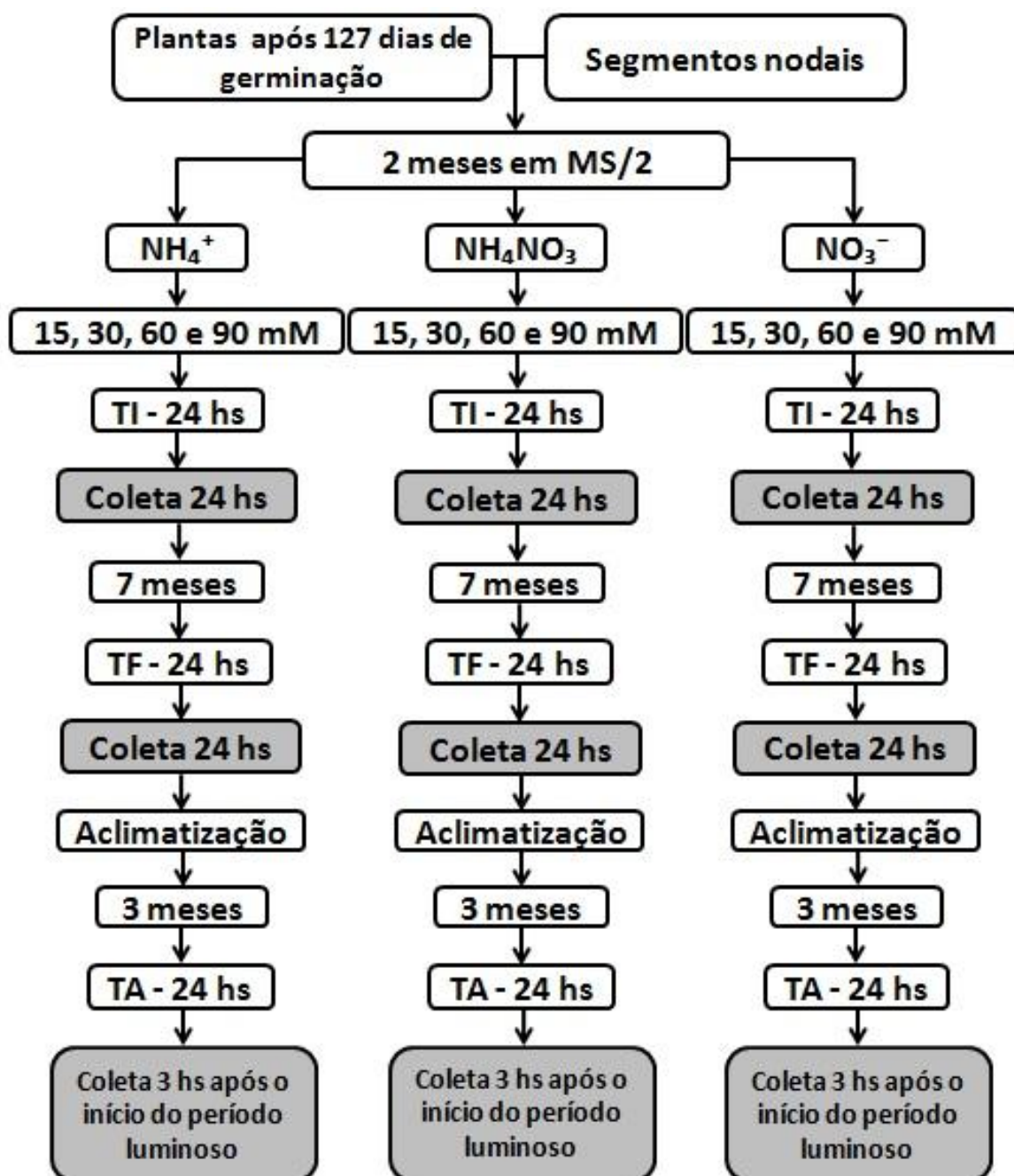


Figura 5: Fluxograma do experimental do trabalho. TI - Tempo Inicial corresponde às plantas que após serem cultivadas *in vitro* em meio Murashige e Skoog (1962) MS-1962) com 50% da concentração de macronutriente (MS/2) por 2 meses, foram transferidas (em seguida) para meio MS-1962 modificado com as diferentes fontes (NH_4^+ , NO_3^- e NH_4NO_3) e concentrações (15, 30, 60 e 90 mM) de N, permanecendo por 24hs (nesses meios), até o início da coleta 24 horas. TF - Tempo Final corresponde às plantas que após serem cultivadas *in vitro* por sete meses nas diferentes fontes e concentrações de N, foram transferidas para novos meios contendo as mesmas concentrações e fontes de N, cujas plantas foram cultivadas anteriormente, permanecendo por 24hs (nesses meios), até o início da coleta 24 horas. TA - Tempo Aclimatização corresponde às plantas cultivadas em bandejas e, regadas com solução MS-1962 modificado com diferentes fontes e concentrações de N, por três meses, após 24 horas da última rega.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albert, L. H. B. 2004. Aspectos morfoanatômicos de mudas de abacaxizeiro ‘Smooth Cayenne’ micropropagadas Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras.
- Andrews, M., Raven, J. A. e Lea, P. J. Do plants need nitrate ? The mechanisms by which nitrogen form affects plants. *Annals of Applied Biology* 1-26.
- Araujo, Aparecida Gomes et al. 2009. Fontes de nitrogênio no crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae). *Acta Scientiarum Biological Sciences*. 31(1) 35-39.
- Araujo, Nathalia et al. 2012. Nutritional reserves in seeds of bromeliad species. *Communications in Plant Sciences* 2(3-4): 57-59.
- Azevedo, B. M. de; et al. 2008. Aclimatização ex vitro de abacaxizeiro ornamental com diferentes lâminas de irrigação. *Irriga* 13(3): 298-309.
- Bomfim, G. V. do et al. 2007a. Aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro ornamental em diferentes volumes de substrato. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental* 13(2): 121-128.
- Bomfim, G. V. do et al. 2007b. Aclimatização ex vitro de abacaxizeiro ornamental em substrato à base de pó-de-coco. *Plant Cell Culture & Micropropagation* 3(1): 41-48.
- Bomfim, G. V. do et al. 2011. Aclimatização ex vitro de abacaxizeiro ornamental com diferentes frequências de irrigação. *Irriga* 16(1): 104-114.
- Borges, N. S. S. Influência da adição de meio de cultura líquido no crescimento e desenvolvimento de gemas de abacaxi ornamental (*Ananas lucidus* Miller) in vitro. 2000. 44 f. Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000.

- Borges, N. S. S. et al. 2003. Influência do meio bifásico na multiplicação de gemas e no alongamento de brotos in vitro de *Ananas lucidus* Miller. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental* 9(1): 37-44.
- Bredemeier, C. e Mundstock C. M. 2000. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. *Ciência Rural* 30: 365-372.
- Bunn, Eric. et al. 2011 Biotechnology for saving rare and threatened florain a biodiversity hotspot. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 47(1) 188-200.
- Cammaerts, D. e Jacobs, M. 1985. A study of the role of glutamate dehydrogenase in the nitrogen metabolism os *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 163(4): 517-526.
- Carvalho, Pollyanna Aparecida de. 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. 2012. 77f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- Carvalho, Ana Cristina P. P. et al. 2009. Multiplicação in vitro de abacaxi ornamental por estiolamento e regeneração de brotações. *Horticultura Brasileira* 27(1): 103-108.
- Carvalho, Ana Cristina Portugal Pinto de et al. 2012. *Estiolamento In Vitro de Plantas: Alternativa para a Produção de Mudas Micropropagadas de Abacaxizeiro Ornamental*. Embrapa Agroindústria Tropical: Circular Técnica 42, Fortaleza, p. 1-12.
- Cataldo, D. A. et al. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 6(1): 71-80.
- Clarke, A. L.; Barley, K. P. 1968. The uptake of nitrogen sails in relation to solute diffusion. *Australian Journal of Soil Research* 6: 75-92.

- Coppens D'eeckenbrugge, G.; Leal F. 2003. Morphology, anatomy and taxonomy. In: *The pineapple: botany, production and uses*. eds. Bartholomew D. P.; Paull R. E.; Rohrbach K.G. pp. 13-32. CABI, Wallingford, Oxford.
- Coppens D'eeckenbrugge, G. et al. 2011. Ananas. In: *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Tropical and Subtropical Fruits* eds. Kole, C., pp. 21-41. Springer, Berlin.
- Correia, D. et al. 2009. Growth of micropropagated *Ananas comosus* var. *erectifolius* plantlets in different substrates under screenhouse conditions. *Acta Horticulturae* 822: 85-89.
- Correia, D. et al. 2010. *Produção de mudas micropropagadas de abacaxizeiro ornamental em diferentes substratos na presença e ausência de fertilizante*. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza: Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 35, 18 p.
- Correia, D. et al. 2011. *Produção de mudas in vitro e indução floral de abacaxizeiro ornamental*. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, Documentos, 134, 2011. 24p.
- Cotias-de-oliveira, A.L.P. et al. 2000. Chromosome numbers in Bromeliaceae. *Genetics and Molecular Biology*.23(1): 173-177.
- Crestani, M. et al. 2010. Das Américas para o mundo - origem, domesticação e dispersão do abacaxizeiro. *Ciência Rural* 40(6):1473-1483.
- Costa, T.e Zaffari, G. R. 2005. Micropropagação de *Ananas bracteatus* (Shultz) cv. *estriatus* *Hort. Revista Brasileira de Horticultura Ornamental* 11(2): 109-113.
- Crawford, N. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *The Plant cell* 7: 859-868.
- Dias, G. de M. G. et al. 2008. Micropropagação de abacaxi ornamental (*Ananas comosus* var. *ananassoides*) por estiolamento e regeneração de plântulas. *Plant Cell Culture & Micropropagation* 4(1): 1-7.

- Dias, Márcia M. et al. 2010. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização de plantas micropropagadas de abacaxizeiro ornamental. *Tecnologia & Ciência Agropecuária* 4(2): 29-33.
- Dias, Márcia M. et al. 2011a. Reguladores de crescimento na propagação *in vitro* de abacaxizeiro ornamental. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* 6(3): 383-390.
- Dias, Márcia M. et al. 2011b. Concentrações de reguladores vegetais no estiolamento *in vitro* de ananás do campo. *Semina: Ciências Agrárias* 32(2): 513-520.
- Dias, Márcia M. et al. 2013. Concentrações de NPK no cultivo *in vitro* de abacaxizeiro ornamental. *Tecnologia & Ciência Agropecuária* 7(4): 1-6.
- Engelmann, F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm: a review. *Euphytica* 57: 227-243.
- Epstein, E. e Bloom, A. J. 2006. *Nutrição Mineral de Plantas: Princípios e Perspectivas*. 2 ed. Trad. Editora Planta.
- Fay, Michael F. 1992. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. *In Vitro Cellular Development Biology* 28:1-4.
- Fay, Michael F. 1994. In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservation? *Biodiversity and Conservation* 3(2): 176-183.
- Farnden, K.J.S. e Robertson, J.G. 1980. Methods for studying enzyme involved in metabolism related to nitrogenase. In: *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation* eds Bergsen, F. J., pp. 279-286. John Wiley & Sons Ltda.
- Garbin, M. L. e Dillenburg, L. R. 2008. Effects of different nitrogen sources on growth , chlorophyll concentration, nitrate reductase activity and carbon and nitrogen distribution in *Araucaria angustifolia*. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 20(4): 295-303.

- Garnica, M.; Houdusse, F.; Zamarreno, A. M. e Garcia-Mina, J. M. 2010. The signal effect of nitrate supply enhances active forms of cytokinins and indole acetic content and reduces abscisic acid in wheat plants grown with ammonium. *Journal of Plant Physiology* 167: 1264–1272.
- Givnish, Thomas J. et al. 2007. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of bromeliaceae inferred from *ndhf* sequence data. *Rancho Santa Ana Botanic Garden* 23: 3–26.
- Givnish, Thomas J. et al. 2011. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in bromeliaceae: insights from an Eight-locus plastid phylogeny. *American Journal of Botany* 98(5): 872–895.
- Givnish, Thomas J. et al. 2014. Adaptive radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 71: 55–78.
- Grattapaglia, D. e Machado, M. A. 1998. Micropropagação. In: *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*, eds. Torres, A.C., Caldas, L.S., Buso, J. A. 1. ed. pp.183-260. Brasília: Embrapa- CNPH.
- Hartmann, H. T. et al. 2002 *Plant propagation: Principles and Practices*. New York: Englewood Clippis.
- Horchani, F., Aschi-Smiti, S. e Brouquisse, R. 2010. Involvement of nitrate reductase in the tolerance of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants to prolonged root hypoxia. *Acta Physiol Plant* 32: 1113-1123.
- Horta, A.C. & Sodek, L. 1997. Free amino acids and storage protein composition of soybean fruit explants and isolated cotyledons cultured with and without methionine. *Annals of Botany* 79: 547-552.

- Heldt, H.W. 1997 Nitrate assimilation. In: *Plant Biochemistry & Molecular Biology*, eds. Heldt, H.W. 4 ed. New York: Oxford University Press.
- Jaworski, E. 1971. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 43(6): 1274-1279.
- Kanashiro, Shoey. 2005. Nitrogênio, fósforo, potássio e cálcio e o crescimento de plântulas de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith *in vitro*. 2005. 187f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- Kanashiro, Shoey et al. 2007. Efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio no crescimento de *Aechmea blanchetiana* (Baker) LB Sm. cultivadas *in vitro* *Hoehnea* 34(1): 59-66.
- Kerbaudy, Gilberto Barbante. 2008. *Fisiologia Vegetal*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,
- Krishna, H., Alizadeh, M., Singh, D., Singh, U., Chauhan, N., Eftekhari, M., Sadh, R. K. 2016. Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. *3 Biotech*. 6:54.
- Lakshmanan, P. & Taji, A. 2000. Somatic embryogenesis in leguminous plants. *Plant Biology* 2(2): 136-148.
- Laukkanen, Hanna. et al. Effect of different nitrogen nutrients on the viability, protein synthesis and tannin production of Scots pine callus. *Physiologia Plantarum*. v. 100, n. 4, ago. 1997.
- Lawlor, David 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. 1993 Nitrogen metabolism. In: *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. eds. Lea, P. J.; Leegood, R. C. 1^a ed. pp. 155-180. England: John Wiley & Sons Ltda.
- Lemos, G. B. et al. 1999. Atividade das enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira cultivadas com diferentes relações de nitrato e amônio. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 11(2): 113-118.
- Lu, Ying Lin et al. 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(1-2): 67-77.
- Luo, J., Zhou, J., Li, H., Shi, W., Polle, A., Lu, M., Sun, X. e Luo, Z. B. 2015. Global poplar root and leaf transcriptomes reveal links between growth and stress responses under nitrogen starvation and excess. *Tree Physiology* 35: 1283–1302.
- Luther, H. E. 2010. *An alphabetical list of bromeliad binomials*. 12 ed Sarasota: Bromeliad Society and Marie Selby Botanical Gardens.
- Majerowicz, N., Kerbaudy, G. B., Nievola, C. C., Suzuki, R. M. 2000. Growth and nitrogen metabolism of *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae) grown with different nitrogen sources. *Environ Exp Bot* 44: 195–206.
- Malavolta, E. et al. 1997. *Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações*. 2. ed. Piracicaba: Potafos.
- Marschner, Horst e Marschner, Petra. 2012. *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. 3 ed. London: Academic Press.
- Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L. e Suzuki, A. 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilisation in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany* 105: 1141–1158.

- McCullough, Helen. 1967. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clinica Chimica Acta* 17(2): 297-304.
- Mercier, H. e Kerbaudy, G. B. 1995. Importance Of Tissue Culture Technique For Conservation Of Endangered Brazilian Bromeliads From Atlantic Rain Forest Canopy. *Selbyana* 16: 147-149.
- Mercier, H. e Kerbaudy, G. B. 1996 Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). In: *Biotechnology in agriculture and forestry, high-tech and micropropagation* eds Bajaj Y. P. S. pp. 43-57. Berlin: Springer-Verlag.
- Mercier, H. e Nievola, C. C. 2003. Obtenção de bromélias *in vitro* como estratégia de preservação. *Vidalia* 1(1): 57-62.
- Mifflin, B. J. e 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.
- Miller, A. J., Fan, X., Orsel, M., Smith, S. J., e Wells, D. M. 2007. Nitrate transport and signalling *Journal of Experimental Botany* 58(9): 2297–2306.
- Moore, S. e Stein, W.H. 1954. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *Journal of Biological Chemistry* 211: 907-913.
- Moreira, C. M. et al. 2011. Indução de brotação *in vitro* em curauá: sistema de cultivo e concentrações de BAP. *Horticultura Brasileira* 29(2): 58-66.
- Myers, N. et al. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Niedz, R. P. e 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(126): 1-11.

- Nunes, J. V. C. 2006. Bromélias. In: *Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais*.eds. Simões, L. L. e Lino, C. F., pp119-132 2.ed. São Paulo: Senac.
- Ohkama-Ohtsu, N. e Wasaki, J. 2010. Recent progress in plant nutrition Research: cross-talk between nutrients, plant physiology and soil microorganisms. *Plant Cell Physiology* 51(8): 1255-1264.
- Oliveira, M. K. T. de et al. 2007. Propagação in vitro da cultura do abacaxizeiro ornamental (*Ananas lucidus* Miller). *Caatinga* 20(3): 167-171.
- Oliveira, Y. de et al. 2010. Pré-aclimatização in vitro de abacaxi ornamental. *Ciência e Agrotecnologia* 34: 1647-1653.
- Orme, C. D. R. et al. 2005. Global *hotspots* of species richness are not congruent with endemism or threat. *Nature* 436(7053): 1016-1019.
- Pallardy, S. G. 2007. *Physiology of woody plants*. 3ed. San Diego: Academic Press.
- Pasqual M et al. 2008. Micropropagação do abacaxizeiro ornamental. *Horticultura Brasileira* 26: 45-49.
- Paula, C. C. e Silva, H. M. 2004. *Peregrino do Cultivo prático de bromélias*. 3 ed. Viçosa: UFV.
- Pereira, T. S. et al. 2004. *Plano de Ação para os Jardins Botânicos Brasileiros*. Rio de Janeiro: RBB, JBRJ, BGCI.
- Pereira, F. D. et al. 2006 Proliferação in vitro de brotos de curauá utilizando diferentes volumes de meio de cultura. *Plant Cell Culture & Micropropagation* 2(2): 102-106.
- Pérez-Soba, M. et al. 1994. Effect of atmospheric ammonia on the nitrogen metabolism of Scots pine (*Pinus sylvestris*) needles. *Physiologia Plantarum* 90(4): 629-636.
- Prado, R. M. 2008. Nutrição de plantas. 1 ed. São Paulo: Editora UNIFESP.
- Proença, S. L. e SAJO, M. G. 2007. Anatomia foliar de bromélias ocorrentes em áreas de cerrado do Estado de São Paulo, Brasil. *Acta Botânica Brasílica* 21(3): 657-673.

- Raven, Peter H. et al. 2007. *Biologia Vegetal*. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Robinson, S. A., Slade, A. P., Fox, G. G. Phillips, R., Ratcliffe, R. G. e Stewart, G. R. 1991. The Role of Glutamate Dehydrogenase in Plant Nitrogen Metabolism. *Plant Physiol* 95: 509-516.
- Sakakibara, H. et al. 1998. A response-regulator homolog possibly involved in nitrogen signal transduction mediated by cytokinin in maize. *Plant Journal* 14(3): 337–344.
- Silva, A. B. 2006. Biorreator e luz natural na micropropagação do abacaxizeiro. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras.
- Silva, K. J. D., Souza, V. A. B. e Gomes, R. L. F. G. 2008. Efeito da altura de mudas na adaptação pós-cultivo in vitro de abacaxizeiro ornamental. *Ceres* 55(6): 551-555.
- Silva, P. P. A. e Tamaki, V. 2012. Micropropagação da bromélia *Ananas ananassoides* (Baker) L.B. Sm. In: XVI Encontro de Iniciação Científica do Instituto de Botânica. pp22-22: Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente.
- Santos, M. do D. M. et al. 2008. Brotações adventícias de abacaxizeiro ornamental sob efeito de benzilaminopurina, ácido naftalenoacético e períodos de subcultivo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43(9): 1115-1120.
- Sarasan, V. et al. 2006. Conservation *in vitro* of threatened plants: progress in the past decade. *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 42: 206-214.
- Sodek, L. 2004. *Metabolismo do Nitrogênio*. In: Fisiologia Vegetal. ed. Kerbauy, G. B. 1 ed. pp. 94-113. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Souza, F. V. D. et al. 2007. Abacaxi ornamental: uma riqueza a ser explorada. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Abacaxi em foco, 37, Cruz das Almas.

- Souza, F. V. D. Et al. 2009 Micropropagação do abacaxizeiro e outras bromeliáceas. In: *Aspectos práticos da micropropagação de plantas* eds. Junghas, T. G. e Souza, A. S, pp. 177-205. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical.
- Souza, F. V. D. et al. 2012. O abacaxi ornamental. In: *Produção de flores de corte*. eds. Paiva, P. D. O. e Almeida, E. F. A. C., pp. 18-39 Lavras: UFLA.
- Stitt, M. et al. 2002. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *Journal Experimental Botany* 53(370): 959-970.
- Taiz, L; Zeiger, E. 2013. *Fisiologia Vegetal*. 5 ed. Artmed.
- Takei, K., et al. 2001a. Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 276(28): 26405–26410.
- Takei, K., et al. 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(1): 85-93.
- Tamaki, V. et al. 2007a Cultivo *in vitro* de clones de *Ananas comosus* (L.) Merrill cultivar Smooth Cayene em diferentes concentrações de macronutrientes. *Hoehnea* 34(1): 67-73.
- Tamaki, V. e Mercier, H. 2007b. Cytokinins and auxin communicate nitrogen availability as long-distance signal molecules in pineapple (*Ananas comosus*). *Journal of Plant Physiology* 164(11): 1543-1547.
- Vieira, R. F. et al. 2006 Frutas nativas da região Centro-Oeste. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.
- Weatherburn, M. W. 1967. Phenol-Hypochlorite Reaction for Determination of ammonia. *Analytical Chemistry* 39(8): 971-974.

- Werner, Elias Terra et al. 2010. Meios de cultura, reguladores de crescimento e fontes de nitrogênio na regulação da calogênese do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) *Acta Botânica Brasílica* 24(4): 1046-1051.
- Yoneyama, T. et al. 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(1): 133-139.
- Xu, G., Fan, X. e Miller, A. J. 2012. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annual Review of Plant Biology* 63: 153–182.

CAPITULO 1

Artigo elaborado para submissão ao periódico Plant Physiology and Biochemistry

Effect of different inorganic nitrogen sources on *in vitro* growth and nitrogen assimilation in bromeliad *Ananas comosus* var. *ananassoides* (Baker) Coppens & F.Leal

Efeito de diferentes fontes inorgânicas de nitrogênio no crescimento *in vitro* e na assimilação do nitrogênio na bromélia *Ananas comosus* var. *ananassoides* (Baker) Coppens & F.Leal

Priscila Primo Andrade Silva^a, Ivomar Aparecido Medina^b, Jorge Luiz Marx Young^c and

Vívian Tamaki^d

^a Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica SMA/SP, 04301-902, São Paulo, SP, Brazil;

^{b,c,d} Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais, Instituto de Botânica SMA/SP, 04301-902, São Paulo, SP, Brazil.

Corresponding author: Vívian Tamaki- vtamaki@gmail.com

RESUMO

Ananas comosus var *ananassoides* é uma bromélia ornamental cultivada visando à exportação. Além disso, é nativo do cerrado, bioma ameaçado de extinção. Os estudos de micropropagação por estiolamento caulinar podem ser uma forma de contribuir para preservação e produção desta espécie. Dos nutrientes que compõem o meio de cultura destaca-se o nitrogênio, absorvido pelas plantas através dos íons nitrato e amônio que posteriormente, serão assimilados em aminoácidos. Poucos são os estudos sobre a sua propagação e nenhum avalia a influência de diferentes fontes nitrogenadas sobre o seu crescimento e assimilação de nitrogênio. Assim, objetivou-se avaliar o crescimento e a assimilação de nitrogênio nesta bromélia em diferentes concentrações e formas nitrogenadas. Plantas obtidas de segmentos nodais foram cultivadas *in vitro* por sete meses em meio de cultura modificado com as formas de nitrato, amônio e nitrato de amônio, nas concentrações de 15, 30, 60 e 90 mM de N, posteriormente as plantas foram aclimatizadas, verificando que 60 mM de nitrato de amônio foi a concentração mais indicada para o seu crescimento em ambas as condições.

Palavras chave: Bromeliaceae, cultivo *in vitro*, Aclimatização, nitrogênio

1. INTRODUÇÃO

Ananas comosus var *ananassoides* (Baker) Coppens & F. Leal é uma bromélia terrícola e ornamental, que vem sendo cultivada visando à exportação como "flor de corte" (Souza et al., 2012). Além da sua importância no mercado de plantas ornamentais, esta espécie é nativa do cerrado (Vieira et al., 2006, Proença e Sajo, 2007), bioma pertencente aos 34 *hotspots* globais de biodiversidade, classificados como áreas de grande biodiversidade e endemismo que estão sob alto risco de extinção (Myer et al., 2000, Orme et al., 2005). Sendo assim, medidas de conservação de suas espécies são importantes e necessárias e, uma forma de contribuir para a preservação de uma espécie, pode ser através de estudos sobre sua micropropagação.

A micropropagação também chamada de propagação *in vitro*, tem sido uma ferramenta muito utilizada em diversos estudos com bromélias de interesse ornamental, assim como para espécies endêmicas, raras e/ou ameaçadas de extinção. (Mercier & Kerbaudy, 1993, 1994, 1995; 1996, Pasqual et al., 2008; Dias et al., 2011a, 2011b; Dias et al., 2013) Comparando a métodos convencionais de propagação, a micropropagação destaca-se por garantir qualidade fitossanitária, além de oferecer grande número de plantas em um curto período (Carvalho et al., 2013, Krishna et al., 2016).

Existem vários estudos sobre a produção de mudas micropropagadas de abacaxizeiros ornamentais, principalmente com *Ananas comosus* var. *bracteatus*(Lindl.) Coppens & F. Leal e *Ananas comosus* var. *erectifolius* (L. B. Smith) Coppens & F. Leal (Borges et al., 2003; Costa e Zaffari, 2005; Pereira et al. 2006; Bomfim et al., 2007a, 2007b; Oliveira et al., 2007; Azevedo et al., 2008; Dias et al., 2008; Pasqual et al., 2008; Santos et al., 2008; Silva et al., 2008; Carvalho et al., 2009; Correia et al., 2009; Souza et al., 2009; Dias et al., 2010; Oliveira et al., 2010; Bomfim et al., 2011; Dias et al., 2011a, 2011b; Moreira et al., 2011; Carvalho et al. 2012; Dias et al., 2013). Todavia,

ainda são poucos os trabalhos de micropropagação com *Ananas comosus* var. *ananassoides*, visto a sua importância tanto ecológica, quanto ornamental (Dias et al., 2008, Dias et al., 2010; Dias et al., 2011a, 2011b; Carvalho et al., 2012, Dias et al., 2013).

Dentre os métodos de micropropagação, pode-se citar a multiplicação por estiolamento caulinar, entretanto a maioria dos trabalhos que usam esses métodos indica a utilização de reguladores de crescimento, cuja utilização pode estar associada à indução de variações somaclonais, que é indesejado quando se visa obter lotes para a conservação de uma espécie e para produção em larga escala (Tamaki et al., 2007a). No entanto, em um trabalho anterior com esta mesma espécie, observou-se a possibilidade de se propagar via estiolamento caulinar, sem o uso de reguladores de crescimento, mostrando ser possível o uso desse método (Silva e Tamaki, 2012).

Um fator importante para o estabelecimento do cultivo *in vitro*, é a seleção do meio de cultura mais adequado, para o crescimento e desenvolvimento da espécie em interesse (Bunn et al., 2011). A maioria dos meios de cultivo são formulações básicas já descritas na literatura, como por exemplo, a de Murashige e Skoog (1962) (MS-1962) que é a mais utilizada para o cultivo *in vitro* (Werner et al., 2010).

Dentre os nutrientes que compõem o meio de cultura MS-1962 destaca-se o nitrogênio (N), que é o quarto elemento mais abundante nas plantas, ocorrendo apenas em menor quantidade que os **elementos não minerais**: carbono, oxigênio e hidrogênio (Epstein e Bloom, 2006; Marschner e Marschner, 2012, Buchanan et al., 2015).

Na classificação dos **elementos minerais** essenciais, que é subdividida em macronutriente (elementos requeridos em maiores quantidades pela planta) e micronutriente (elementos requeridos em menores quantidades) o N é o elemento mineral, requerido em maior quantidade pela maioria das plantas (Epstein e Bloom, 2006; Marschner e Marschner, 2012).

O N é constituinte de diversas moléculas essenciais para o metabolismo vegetal, tais como, nucleotídeos, ácidos nucleicos, aminoácidos, proteínas, coenzimas, clorofilas, entre outros (Buchanan et al., 2015). Além de sua função estrutural, é sabido que o N nas formas inorgânicas de NO_3^- e NH_4^+ , são sinalizadores moleculares (Crawford, 1995, Garnica et al., 2010). A presença, concentração e/ou até mesmo a ausência, desses dois íons, desencadeiam a expressão de genes específicos, relacionados com a absorção, transporte e assimilação de N; (Crawford, 1995, Garnica et al., 2010, Adrews et al., 2013), assim como o balanço de produção endógena de auxinas/citocininas, que são hormônios responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento da planta (Tamaki e Marcier, 2007b)

Os íons NH_4^+ e NO_3^- são as fontes de N mais disponíveis para absorção pelas raízes das plantas na solução do solo, sendo o NO_3^- mais abundante na maioria dos solos, contudo em solos alagados e com pouca oxigenação há predomínio de NH_4^+ em relação ao NO_3^- (Epstein e Bloom, 2006; Marschner e Marschner, 2012).

Estes dois íons são absorvidos pelas raízes das plantas por meio de um sistema de transportadores de alta (HATS) e baixa afinidade (LATS) específicos para cada forma de N (Miller et al., 2007, Kraiser et al., 2011; Xu et al., 2012). Uma vez absorvidos da solução do solo, o NH_4^+ e o NO_3^- podem ser prontamente assimilados na parte radicular, ou estocados em vacúolos, ou ainda transportados via xilema para parte aérea da planta (Rennenberg et al. 2010, Braun et al., 2013, Buchanan et al., 2015)

Para entrar na via de assimilação, o N na forma de NO_3^- é reduzido a nitrito (NO_2^-) pela ação da enzima nitrato redutase (NR) no citosol da célula, que posteriormente é transportado para dentro do plastídio, onde será reduzido à NH_4^+ pela ação da enzima nitrito redutase (NiR) (Marschner e Marschner, 2012, Taiz e Zeiger, 2013). O NH_4^+ por sua vez é assimilado em glutamina (GLN) por meio da enzima

glutamina sintase (GS), que em seguida é transformada em glutamato (GLU) pela enzima glutamina oxoglutarato aminotransferase (GOGAT) (Marschner e Marschner, 2012, Taiz e Zeiger, 2013, Buchanan et al., 2015). Além disso, o NH_4^+ também pode ser convertido à GLU pela ação da enzima glutamato desidrogenase (GDH) (Andrews et al. 2013, Luo et al., 2015). Posteriormente, o GLU e a GLN serão utilizados para a biossíntese de outras formas orgânicas de N, essenciais para o metabolismo celular, promovendo o crescimento e desenvolvimento da planta (Epstein e Bloom, 2006; Marschner e Marschner, 2012; Andrews et al. 2013).

Após a obtenção *in vitro* é necessária a aclimatização das plantas antes da transferência para o campo (Grattapaglia e Machado, 1998, Berilli et al., 2011) Essa mudança para a condição *ex vitro*, implica em alterações morfológicas e fisiológicas que conferem resistência à planta para o impacto decorrente de fatores como: o aumento do fluxo transpiratório e luminoso, variações de temperatura, interação com microrganismos, entre outros (Calvete et al., 2002, Hartmann et al., 2002, Albert, 2004). A mudança súbita para essas condições pode ser um fator limitante para a propagação de algumas espécies. (Grattapaglia e Machado, 1998, Bregonci et al., 2008, Berilli et al., 2011) Fato que reforça a importância dos estudos de aclimatização.

Alguns estudos observaram que o uso de NH_4^+ e NO_3^- combinados ou separados promove o crescimento de algumas espécies (Endres e Mercier, 2001; Nievola et al., 2001; Tamaki e Mercier, 2007a; Garbin e Dillenburg, 2008; Silva et al., 2010; Andrade e Tamaki, 2016). Existem alguns trabalhos que relatam o cultivo *in vitro* de *A. comosus* var. *ananassoides* em meio MS-1962 com modificações nas concentrações de macronutrientes (Dias et al., 2008, Dias et al., 2010; Dias et al., 2011a, 2011b; Carvalho et al., 2012, Silva e Tamaki, 2012; Dias et al., 2013), cujas as fontes de N são os íons NO_3^- e NH_4^+ que são fornecidos no meio cultura, pelos sais KNO_3 e NH_4NO_3 , contudo, não foram encontrados estudos com esta espécie que avaliam a influência de diferentes fontes

inorgânicas (isoladas) de N, sobre o crescimento, assimilação de N e posterior aclimatização. Visto isso, o presente estudo visou avaliar o crescimento e desenvolvimento e a assimilação do N na bromélia *Ananas comosus* var *ananassoides* (Baker) Coppens & F. Leal cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações e formas inorgânicas de nitrogênio e a posterior aclimatização.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção dos segmentos nodais

Foram utilizados cerca de 1.000 segmentos nodais, de *Ananas comosus* var. *ananassoides* (Baker) Coppens & F. Leal colhidas na Reserva Biológica de Mogi Guaçu do Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente de São Paulo (RBMG - IBt/SMA - SP). Estas sementes, antes da germinação, foram submetidas à desinfestação superficial em frasco de 250 mL contendo álcool a 70% (v/v) por 5 minutos, sendo, após enxágue, colocadas em solução de hipoclorito de sódio a 2% (v/v), acrescida de duas gotas de Tween 20, durante uma hora. Em seguida, em câmara de fluxo de ar estéril, a solução de hipoclorito foi retirada com quatro lavagens consecutivas com água destilada esterilizada. Após a desinfestação, foram depositadas 25 sementes por placa de Petri, contendo 30 mL de meio com 0,5% (m/v) de ágar e 3% (m/v) de sacarose (pH ajustado para 5,8), após esterilização dos meios a 121 °C durante 15 minutos. Estas placas foram mantidas em sala de cultura com fotoperíodo de 12 horas, radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de 30 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de 26±2 °C até a germinação das sementes. As plântulas obtidas foram transferidas para frascos de 350 mL (5 plântulas por frasco), contendo 30 mL de meio Murashige e Skoog (1962) (MS-1962), com 50% da concentração de macronutrientes (MS/2), permanecendo nessas condições, por dois meses. As plantas geradas tiveram suas folhas cortadas, deixando cerca de 1 cm de folhas a partir da base caulinar, estas foram transferidas para frascos de 500 mL, contendo 40 mL de

meio MS/2 (5 plantas por frasco). Posteriormente, os frascos foram colocados no escuro, onde ficaram por cinco meses até a obtenção dos segmentos nodais.

2.1.1 Obtenção das plantas a partir de segmentos nodais e o crescimento *in vitro* em diferentes fontes e concentrações de N

Os segmentos nodais obtidos foram isolados e depositados (cinco segmentos) em frascos de vidro de 350 mL contendo 30 mL de meio MS/2, onde permaneceram por dois meses, sob condições assépticas, em sala de cultura com fotoperíodo de 12 horas, PAR de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e com temperatura média de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, para o surgimento de novas plantas. Após esse período, as plantas geradas foram transferidas para frascos de 350 mL contendo 30 mL de meio MS-1962 modificado com as diferentes fontes inorgânicas de nitrogênio (N), fornecidas nas formas isoladas ou combinadas de: amônio (NH_4^+), nitrato (NO_3^-) e nitrato de amônio (NH_4NO_3), cujas concentrações foram: 15 mM, 30 mM, 60 mM e 90 mM para cada forma de N (cerca de 100 plantas para cada tratamento) (Tab. 1). Após 24 horas da transferência para esses meios, um lote de plantas (seis frascos com cinco plantas cada frasco) de cada tratamento foi utilizado para a coleta de material vegetal (para análises descritas no item 2.2) e outro lote (12 frascos com cinco plantas cada frasco) permaneceu por mais sete meses *in vitro*, sob as mesmas condições controladas descritas anteriormente. Após os sete meses, as plantas foram transferidas para novos frascos de 350 mL contendo 30 mL do meio MS-1962 modificado com as diferentes fontes (NH_4^+ , NO_3^- e NH_4NO_3) e suas respectivas concentrações (15, 30, 60 e 90 mM) de N, por um período de 24 horas, antes da coleta de material vegetal, visando garantir o suprimento de N para as plantas (descrito com mais detalhes no item 2.3).

Tabela 1: Concentrações de macronutrientes em mg. L⁻¹ das formulações que foram utilizadas para cada forma de nitrogênio e suas respectivas concentrações molares.

| Formas e concentrações de nitrogênio | | | | | | | | | | | | |
|---|--------------------------------------|-------|-------|-------|-----------------------------------|-------|-------|-------|-----------------------------------|-----|-------|-------|
| Macronutrientes | mg. L ⁻¹ | | | | mg. L ⁻¹ | | | | mg. L ⁻¹ | | | |
| | NH ₄ NO ₃ (mM) | | | | NO ₃ ⁻ (mM) | | | | NH ₄ ⁺ (mM) | | | |
| | 15 | 30 | 60* | 90 | 15 | 30 | 60 | 90 | 15 | 30 | 60 | 90 |
| KNO ₃ | 505 | 1.011 | 1.900 | 2.022 | 1.516 | 2.730 | 5.763 | 8.796 | --- | --- | --- | --- |
| NH ₄ NO ₃ | 400 | 800 | 1.650 | 2.801 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| CaCl ₂ 2H ₂ O | 440 | 440 | 440 | 440 | 440 | 440 | 440 | 440 | 440 | 440 | 440 | 440 |
| MgSO ₄ 7H ₂ O | 370 | 370 | 370 | 370 | 370 | 370 | 370 | 370 | 370 | 370 | 370 | 370 |
| KH ₂ PO ₄ | 170 | 170 | 170 | 170 | 170 | 170 | 170 | 170 | 170 | 170 | 170 | 170 |
| K ₂ SO ₄ | 592 | 215 | --- | --- | 327 | --- | --- | --- | 815 | 815 | 815 | 815 |
| KCl | 512 | 186 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 697 | 697 | 697 | 697 |
| Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O | --- | --- | --- | --- | --- | 354 | 354 | 354 | --- | --- | --- | --- |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 495 | 991 | 1.982 | 2.972 |
| NH ₄ Cl | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 401 | 803 | 1.605 | 2.408 |

* Concentração do meio Murashige & Skoog (1962) original.

Após os sete meses de cultivo *in vitro* nas diferentes fontes de N (NH₄⁺, NO₃⁻ e NH₄NO₃) e suas respectivas concentrações (15, 30, 60 e 90 mM), as plantas foram aclimatizadas em bandejas (10 plantas por bandeja) contendo 600 mL de areia lavada como substrato, acondicionadas em sacos de celofane com 20 furos (feitos com agulha em cada saco) para passagem de ar, onde foram regadas, quinzenalmente com 40 mL de solução nutritiva constituída pela formulação de MS-1962 modificado sem a sacarose e o ágar e, com as fontes de N fornecidas nas formas de NH₄⁺, NO₃⁻ e NH₄NO₃, cujas concentrações de N foram 15 mM, 30 mM, 60 mM e 90 mM (para cada fonte de N), de acordo com a

concentração, na qual as plantas tinham sido cultivadas anteriormente *in vitro*. Estas permaneceram em sala de cultura sob as mesmas condições controladas descritas anteriormente por um período de três meses. Ressalta-se que a última rega das plantas foi feita 24 horas antes da coleta (de material vegetal) em todos os tratamentos.

2.2. Coleta do material vegetal delineamento experimental e parâmetros analisados

As coletas de material vegetal para todas as análises foram feitas nos seguintes períodos do experimento:

Tempo inicial (TI) - plantas cultivadas *in vitro* (por dois meses) em MS/2, após 24 horas de transferência para o meio MS-1962 modificado com as diferentes fontes (NH_4^+ , NO_3^- e NH_4NO_3) e concentrações (15, 30, 60 e 90 mM) de N;

Tempo final (TF) - plantas cultivadas (por sete meses) em MS-1962 modificado com as diferentes fontes e concentrações de N, após 24 horas de transferência para novos meios contendo as mesmas fontes e concentrações de N, cujas plantas foram anteriormente cultivadas;

Tempo aclimatização (TA) - plantas cultivadas (por três meses) em bandejas e, regadas com solução MS-1962 modificado com as diferentes fontes e concentrações de N, após 24 horas à última rega.

As coletas de material vegetal no TI, TF e TA foram feitas após três horas do início do período luminoso da sala de cultura. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3x4, constituído de três diferentes fontes de nitrogênio (NH_4^+ , NO_3^- e NH_4NO_3) e quatro concentrações de N (15, 30, 60 e 90 mM), assim cada tratamento foi constituído de uma concentração em uma fonte de N (totalizando 12 tratamentos).

No TI e TF a parcela experimental foi constituída por dois frascos (cinco plantas por frasco) com três repetições para cada tratamento, totalizando seis frascos por tratamento. Já em TA cada parcela experimental foi constituída de uma bandeja (10 plantas por bandeja) com três repetições, totalizando três bandejas por tratamento.

Os parâmetros analisados no TI, TF e TA foram: comprimentos das partes aérea e radicular, número de folha e raiz, massas fresca e seca das partes aérea e radicular, quantidade de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b* e carotenoides). Além destes, também foram avaliados no TI e TF: conteúdo de NH_4^+ e NO_3^- endógenos, atividades das enzimas nitrato redutase (NR), glutamina sintase (GS) e glutamato desidrogenase dependente de NADH (GDH-NADH).

Ressalta-se que foram utilizadas 20 plantas para análise dos parâmetros: comprimentos das partes aérea e radicular, número de folha e raiz e massas fresca e seca das partes aérea e radicular. Quanto às atividades das enzimas NR, GS e GDH, foram realizados ensaios para a padronização da melhor quantidade de massa vegetal, quantidade de substrato, volume da solução de incubação, tempo de incubação e horário da coleta de material vegetal. Os demais procedimentos e parâmetros serão descritos com mais detalhes nos itens a seguir.

2.3. Ensaio da enzima nitrato redutase (NR)

A atividade da NR *in vivo* foi determinada de acordo com o método descrito por Jaworski (1971) modificado por Nievola e Mercier (2001) com as seguintes alterações. As folhas (de 10 plantas) foram coletadas e picadas em pequenos fragmentos de aproximadamente 1 a 2 mm de largura, formando uma mistura composta de material fresco. Estas foram depositadas em porções de 0,35 g por tubo tipo borel (três tubos), aos quais foram adicionados 5 ml da solução de incubação constituída por 0,1 M de tampão fosfato (pH 7,5), 1% de propanol (v/v) e 0,1 M de KNO_3 . Em seguida, o tecido vegetal mantido submerso nessa solução (dentro dos tubos) foi submetido a cinco sessões de vácuo para facilitar a infiltração da solução nos tecidos, após esse procedimento, 1 mL de cada tubo foi aliqotado em microtubo tipo eppendorf para quantificação do tempo zero (T0) (correspondente a quantidade endógena de nitrito nas amostras antes da incubação), e os tubos colocados para incubar por 30 minutos à temperatura de 30 °C, na ausência de luz. Decorrido o período de incubação, a quantidade de nitrito (NO_2^-) liberada no meio de infiltração foi determinada em

alíquotas de 1 mL acrescidas de 0,3 mL de sulfanilamida a 1% (m/v) em 3 M de HCl e 0,3 mL de N-naftil-etileno-diamino a 0,2 % (m/v). A determinação do NO_2^- produzido ocorreu 30 minutos após a adição desses reagentes às alíquotas (tempo de reação). Após esse período, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro a 540 nm. O valor da absorbância de T0 foi descontado do valor da absorbância obtido para aqueles tubos que permanecerão sob incubação. Esse procedimento foi realizado em triplicata e a atividade da enzima foi expressa em μmol de nitrito produzido por hora por grama de massa seca ($\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MS}$)

2.4. Extração enzimática para análise da glutamina sintase (GS) glutamato desidrogenase dependente de NADH (GDH-NADH)

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

Para cada um dos tratamentos, foram utilizadas 0,25 g de massa fresca foliar proveniente de uma amostra composta de pequenos pedaços de folhas obtidos de 10 plantas. As amostras foram trituradas em almofariz com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino e, então, transferidas para microtubos tipo eppendorf, previamente resfriados, aos quais foram acrescentados 1,5 ml de uma solução composta por 0,05 M de tampão imidazol com pH 7,9 e 0,005 M de ditioneitol. Estas amostras foram submetidas à centrifugação de 21.000 RCF (força centrífuga relativa ou força g) à temperatura de 4 °C por 1 hora. O sobrenadante foi mantido a 4 °C e utilizado para a determinação das atividades de GS e GDH. Esse procedimento foi realizado em triplicata.

2.4.1. Ensaio enzimático da GS

O volume total da reação enzimática foi de 0,5 ml, constituído por: 0,1 mM de tampão imidazol, cujo pH foi 7,5, 49 mM de hidroxilamina, 40 mM de MgCl_2 , 160 mM de glutamato

e 35 mM de ATP. A reação foi iniciada com a adição de 50 µL do extrato enzimático e, incubação à temperatura de 35 °C por 1 hora. Após esse período a reação foi interrompida com a adição de 1 mL da solução de parada, constituído por: 0,123 M de cloreto férrico, 0,25 M de HCl e 0,1225 M de ácido tricloroacético (¹TCA). Foram preparados microtubos correspondentes ao tempo zero (T0), ou seja, neste a adição da solução de parada ocorreu em seguida à deposição do extrato, interrompendo, assim, a reação. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 540nm. O valor da absorbância de T0 foi descontado do valor da absorbância obtido para aqueles microtubos que permaneceram sob incubação. A atividade da enzima foi expressa em mmol gama glutamil hidroxamato por hora por grama de massa seca ($\text{mmol } \gamma\text{GH} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MS}$).

2.4.2. Ensaio enzimático da GDH-NADH

Para análise desta enzima o extrato bruto (obtido na extração descrita no item 2.2.2) de cada amostra foi previamente dessalinizado em coluna PD10 - Sephadex (G-25), antes do início do ensaio enzimático. A atividade da GDH-NADH foi quantificada por meio do consumo de NADH gasto na reação, cujo o volume total foi de 1 ml, constituído por tampão 0,1 M de TRIS com pH 8,2, 13,3 mM de 2-oxoglutarato, 0,1 M de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, 0,16 mM de NADH. Todos os reagentes foram mantidos à temperatura de 30 °C por 10 minutos antes de começar a reação enzimática, iniciada pela adição de 0,25 mL de extrato enzimático e, imediatamente lido em espectrofotômetro a 340 nm. O delta de decaimento (slope) foi calculado utilizando a faixa linear das absorbâncias anotadas dentro de um período de cinco minutos. A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar (ϵ 340) de $6,22 \times 10^6 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e a atividade expressa em µmol de NADH consumido por minuto por grama de massa seca ($\mu\text{mol NADH} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MS}$).

2.5. Determinação do conteúdo endógeno de amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-)

2.5.1. Preparação do extrato vegetal

As folhas, provenientes de 10 plantas foram cortadas em pequenos fragmentos formando uma mistura heterogênea. Amostras de 0,1 g de massa fresca foram trituradas com nitrogênio líquido e, posteriormente, foram transferidas para microtubos tipo eppendorf, aos quais foram acrescentados 1 ml de água ultra-purificada. Essas amostras foram centrifugadas a 22.000 RCF, 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e utilizado nas quantificações de amônio e nitrato endógeno. Este procedimento foi realizado em triplicata.

2.5.2. Determinação do conteúdo endógeno de NH_4^+

O conteúdo endógeno de NH_4^+ foi determinado de acordo com a reação conhecida como fenol-hipoclorito (Weatherburn, 1967; McCullough, 1967), nesta reação foram empregados dois reagentes, o primeiro constituído por 1% (m/v) de fenol e 0,005% (m/v) nitroprusside e, o segundo constituído por 5,37 % (m/v) de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1% (v/v) de hipoclorito de sódio (10-14% Cl_2) e 0,5% (m/v) de NaOH. Em microtubos tipo eppendorf, foram aliqotados 100 μl do extrato vegetal de cada amostra e, adicionado 0,5 ml do primeiro reagente e 0,5 ml do segundo reagente. Após uma vigorosa agitação, a mistura permaneceu em banho-maria a 35°C por 30 minutos. Decorrido o período, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 625 nm. Microtubos contendo de 0,002 a 0,03 μmol de NH_4^+ ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) em 0,1 mL foram utilizados na constituição da curva padrão, nestes também foram acrescentados os dois reagentes e, permaneceram sob as mesmas condições que as amostras, até a leitura em espectrofotômetro. A dosagem de amônio endógeno foi expressa em μmol de amônio por grama de massa seca ($\mu\text{mol NH}_4^+ \cdot \text{g}^{-1} \text{MS}$)

2.5.3. Determinação do conteúdo endógeno de nitrato NO_3^-

A quantificação de NO_3^- foi realizada de acordo com o método descrito por Cataldo et al. (1975). Uma alíquota de 10 μL de extrato (de cada amostra) foi pipetada em microtubo tipo eppendorf, ao qual foi adicionado 40 μL da solução de ácido salicílico a 5% (m/v) diluído em H_2SO_4 concentrado. Após vigorosa agitação, os microtubos permaneceram a temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, foi adicionado lentamente 0,95 mL de NaOH a 2 N para elevar o pH a 12. Posteriormente as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 410 nm. Microtubos contendo de 0,003 a 0,2 μmol de NO_3^- (KNO_3) em 10 μL foram utilizados na constituição da curva padrão, nestes também foram acrescentados 40 μL da solução de ácido salicílico a 5% (m/v) diluído em H_2SO_4 concentrado e, permaneceram sob as mesmas condições que as amostras, até a leitura em espectrofotômetro. A dosagem de nitrato endógeno foi expressa em μmol de nitrato por grama de massa seca ($\mu\text{mol. NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ MS}$)

2.6. Determinação do conteúdo de pigmentos fotossintéticos

As clorofilas *a*, *b* e carotenoides foram extraídos das folhas de cada amostra de acordo com o método descrito por Munné-Bosch e Lalueza (2007), com modificações. As folhas de 10 plantas foram coletadas e picadas em pequenos fragmentos de, aproximadamente, 1 a 2 mm de largura, formando uma mistura composta de material fresco. Estas foram trituradas em nitrogênio líquido e 0,1 g foi homogeneizado em 1 mL de acetona a 100% (v/v). Estes permaneceram em banho ultrassônico a 4 °C por 30 minutos, decorrido o período, as amostras foram centrifugadas 22.000 RCF, 4 °C por 20 minutos e o sobrenadante foi coletado. Esse procedimento foi realizado duas vezes com a mesma amostra e posteriormente os dois sobrenadantes de foram combinados para a leitura em espectrofotômetro. Os comprimentos de ondas para a leitura em espectrofotômetro, assim como as equações para o cálculo de conteúdo de pigmentos fotossintéticos foram utilizados de acordo com o descrito por Lichtenthaler e Buschmann (2001) e expresso em miligrama de pigmento por grama de massa seca ($\text{mg. g}^{-1} \text{ MS}$)

2.7. Análises estatísticas dos resultados

As médias foram calculadas e submetidas à análise de variância (ANOVA múltipla), sendo comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Obtenção das plantas *in vitro* a partir de segmentos nodais

Após dois meses de cultivo *in vitro* em MS/2 verificou-se que, do total de segmentos nodais utilizados, 69% dos segmentos geraram novas plantas que foram utilizadas na montagem com os diferentes tratamentos com N, tanto para o tempo inicial (TI) quanto para o tempo final (TF). Estas plantas no TI apresentaram $7,30 \pm 0,48$ folhas medindo $3,1 \pm 0,11$ cm de comprimento com $0,1655 \pm 0,0162$ g e $0,0169 \pm 0,0012$ g de massa fresca e seca, respectivamente, e $3,4 \pm 0,70$ raízes medindo $4,02 \pm 0,48$ cm com $0,0075 \pm 0,0011$ g de massa fresca e $0,0021 \pm 0,0003$ g de massa seca. Assim como no presente estudo, Tamaki et al. (2007) relataram ser possível a micropropagação de *Ananas comosus* (L.) Merrill cultivar ‘Smooth Cayenne’, a partir de segmentos nodais, sem a utilização de fitorreguladores. Muitos estudos relacionam o uso destas substâncias com a indução de variações somaclonais nos tecidos vegetais (Rakoczy-Trojanowska, 2002; Joyce et al., 2003; Bairu et al., 2006, Bairu et al., 2011, Jain et al, 2013; Krishna et al., 2016) Essas alterações não são pertinentes quando se visa obter lotes homogêneos de plantas com fenótipos selecionados, nem quando se visa a conservação de uma espécie (Tamaki et al., 2007a). A utilização de plantas clonadas para estudos fisiológicos apresenta vantagem em relação à utilização de plantas obtidas a partir de sementes, devido à uniformidade de resposta dos indivíduos dentro da população estudada (Santos et al, 2009, Krishna e Singh, 2013).

3.2. Crescimento nas diferentes fontes e concentrações de N

As plantas cultivadas por sete meses nas fontes de NO_3^- e $\text{NH}_4 \text{NO}_3$ obtiveram 100% de sobrevivência (em todas as concentrações utilizadas) e apresentaram aspecto saudável, se

comparadas às plantas mantidas nas diferentes concentrações NH_4^+ , cujas folhas tinham aparência pálida e atrofiada (Fig. 1). Além disso, as plantas cultivadas em 15, 30, 60 e 90 mM de NH_4^+ , apresentaram sobrevivência de 55%, 56%, 57% e 65%, respectivamente.

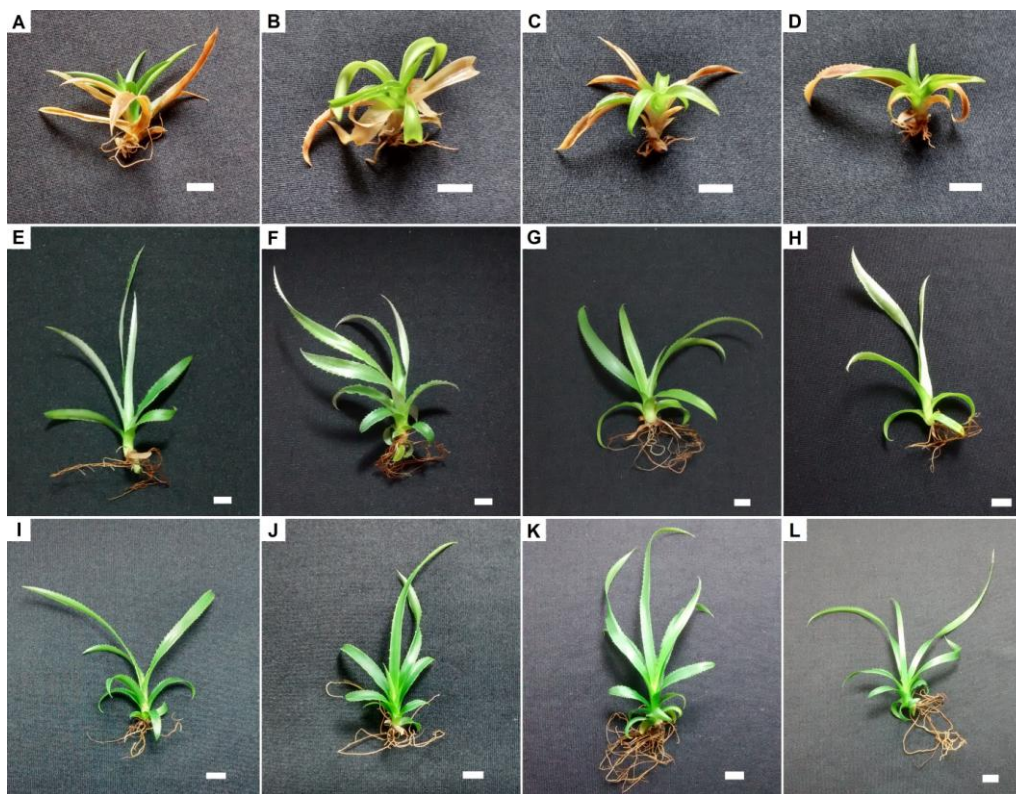


Figura 1: Aspecto geral das plantas de *Ananas comosus* var. *ananassoides* cultivadas *in vitro* em meio MS-1962 modificado com as diferentes fontes (NH_4^+ , NO_3^- e NH_4NO_3) e concentrações (15, 30, 60 e 90 mM) de N, por sete meses. A, B, C e D - plantas cultivadas em 15 mM, 30 mM, 60 mM e 90 mM de NH_4^+ , respectivamente. E, F, G e H - plantas cultivadas em 15 mM, 30 mM, 60 mM e 90 mM de NO_3^- , respectivamente. I, J, K e L - plantas cultivadas em 15 mM, 30 mM, 60 mM e 90 mM de NH_4NO_3 , respectivamente. Barra de escala corresponde a 1 cm. Foto: Priscila P. A. Silva.

A comparação do comprimento da parte aérea nas plantas cultivadas em diferentes concentrações e fonte de N, confirmaram a redução de tamanho nas plantas mantidas em todas as concentrações de NH_4^+ (Fig. 2 -B). Alguns autores descrevem que a diminuição no tamanho das folhas em plantas suplementadas com excesso de NH_4^+ pode ser atribuída principalmente à diminuição da absorção de cátions essenciais como o potássio (K^+), o magnésio (Mg^{2+}) e o

Cálcio (Ca^{2+}) (Andrews et al., 2013) refletindo, negativamente, na regulação osmótica, que é importante para expansão celular (Guo et al., 2007). Além disso, altas doses de NH_4^+ provocam alterações na produção e fluxo de hormônios que regulam o crescimento e desenvolvimento da planta (Garnica et al., 2010).

Mesmo com a redução do crescimento, *A. comosus* var. *ananassoides* mostrou ser tolerante às altas concentrações de NH_4^+ , visto que após sete meses de cultivo nas diferentes concentrações de NH_4^+ , as plantas apresentaram quantidades de folhas significativamente semelhantes às plantas cultivadas nas fontes de NO_3^- e NH_4NO_3 , na maioria das concentrações utilizadas (Fig. 2 - A). Todavia, as plantas crescidas em NO_3^- e NH_4NO_3 não apresentaram folhas mortas (FM), ao contrário das plantas cultivadas em NH_4^+ que exibiram as seguintes porcentagens de FM: $25,86 \pm 8,49\%$ em 15 mM, $17,56 \pm 7,46\%$ em 30 mM, $31,18 \pm 4,76\%$ em 60 mM e $34,04 \pm 4,19\%$ em 90 mM. Alguns trabalhos correlacionam o acúmulo NH_4^+ nos tecidos com a senescência foliar (Chen et al., 1997, Mattsson e Schjoerring, 2003) devido ao aumento da sensibilidade do tecido vegetal a sinalização do etileno (Chen et al., 1997), hormônio responsável principalmente pela abscisão foliar (Buchanan et al., 2015), e também ao acúmulo de altos níveis de ácido abscísico nos tecidos (Rahayu et al., 2005, Garnica et al., 2010), o que provavelmente deve ter ocasionado a morte das folhas nas plantas cultivadas nestes tratamentos.

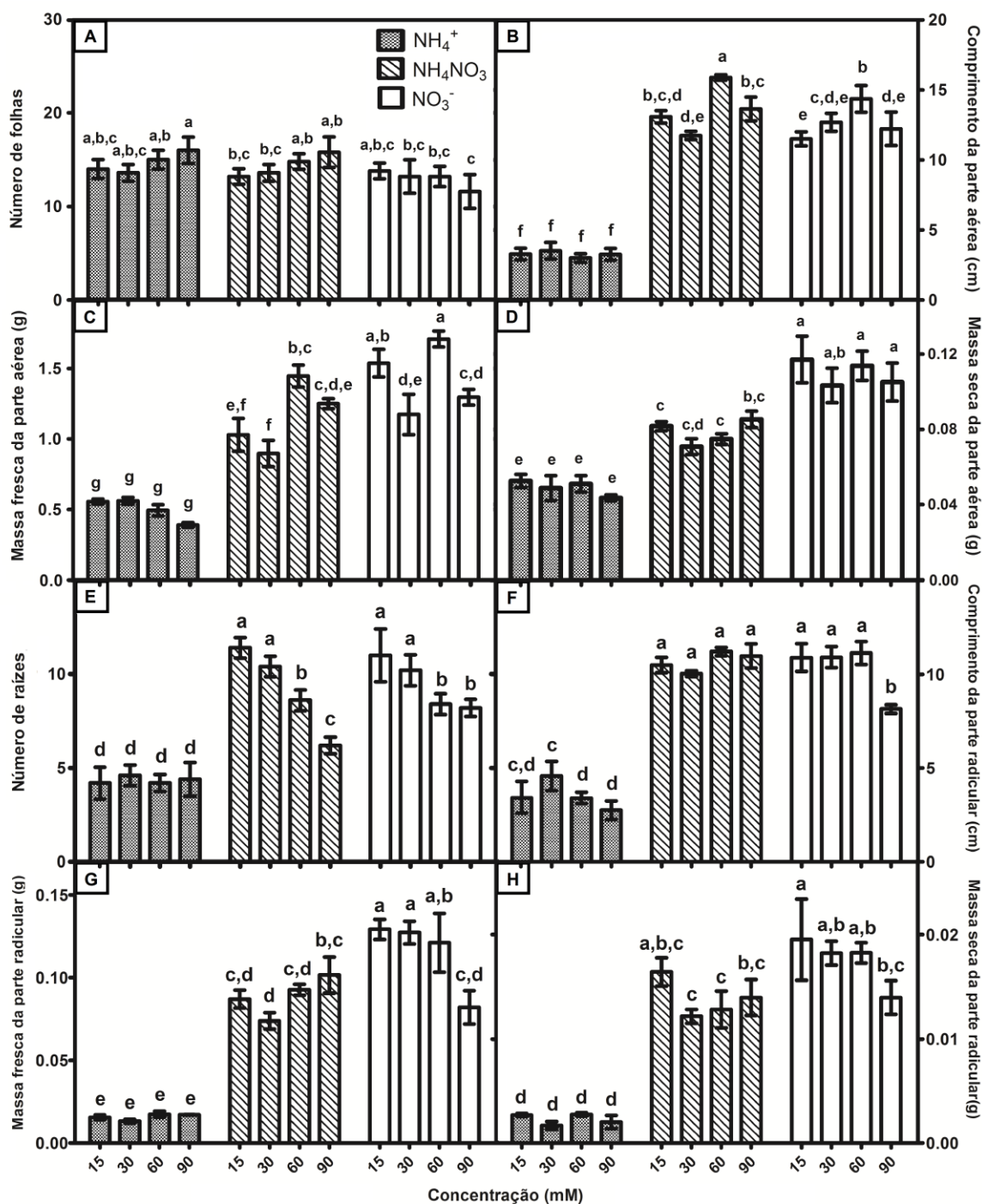


Figura 2: Parâmetros (biométricos e de massas) analisados da parte aérea e radicular de *A. comosus* var. *ananassoides* cultivado *in vitro* por sete meses, em meio MS-1962 modificado com as diferentes fontes (NH_4^+ , NO_3^- e NH_4NO_3) e concentrações (15, 30, 60 e 90 mM) de N. A) Número de folhas, B) comprimento da parte aérea (cm), C) quantidade de massa fresca (g) da parte aérea por planta, D) quantidade de massa seca (g) da parte aérea por planta, E) número de raízes, F) comprimento da parte radicular (cm), G) quantidade de massa fresca (g) da parte radicular por planta, H) quantidade de massa seca (g) da parte radicular por planta. Letras minúsculas distintas, acima de cada coluna, indicam diferença significativa em $P < 0,05$ de acordo com o teste de Tukey (ANOVA, múltipla).

Ao contrário dos resultados obtidos em NH_4^+ para variável comprimento da parte aérea, as plantas cultivadas nas fontes de NO_3^- e NH_4NO_3 apresentaram as maiores médias e foram significativamente semelhantes na maioria das concentrações utilizadas, com exceção das plantas crescidas em 60 mM de NH_4NO_3 que alcançaram a maior média ($15,88 \pm 0,19$ cm) (Figura 2 - B). Resultado semelhante foi observado por Kurita (2015) trabalhando com a bromélia *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms cultivada em diferentes fontes (NH_4^+ , NO_3^- e NH_4NO_3) e concentrações de N (5, 15, 30 e 60 mM), obteve os maiores comprimentos das partes aéreas nas plantas cultivada em 30 e 60 mM de NH_4NO_3 . Outros trabalhos também observaram maior crescimento quando essas duas fontes foram usadas combinadas, ao invés de separadas (Lukkanen, 1997, Walch-Liu et al., 2000, Nievola et al., 2001, Guo et al, 2002, Cruz et al., 2006). Esse efeito benéfico da absorção das duas fontes juntas pode ser atribuído: à homeostase no pH fisiológico (Babourina et al., 2007), à manutenção dos níveis apropriados de carboxilação (Feng et al., 1998) e ao balanço de hormônios (citocininas/auxinas) responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento vegetal (Chen et al., 1998, Tamaki e Mercier, 2007b) Todavia, os mecanismos bioquímicos e fisiológicos responsáveis pelo benefício desta utilização conjunta ainda não estão completamente esclarecidos (Garnica et al., 2010).

Em relação aos parâmetros de massa fresca e massa seca da parte aérea, as menores médias foram novamente obtidas nas plantas cultivadas nas diferentes concentrações de NH_4^+ , corroborando os resultados de comprimento da parte aérea (Fig. 2 - B,C). Endres e Mercier (2001) compararam o crescimento de *Ananas comosus* (L.) Merrill e *Vriesea gigantea* Gaudich. cultivados em diferentes concentrações de NH_4^+ e ureia, verificando que *A. comosus* apresentou maior crescimento em NH_4^+ , contudo mesmo tendo preferência pela fonte inorgânica de N, concentrações acima de 10 mM mostrou-se desfavorável para o crescimento desta espécie, observado pela diminuição de biomassa. Assim como foi observada a diminuição da biomassa no presente trabalho para *Ananas comosus* var.

ananassoides, em todas as concentrações de NH_4^+ utilizadas. Muitos estudos descrevem a toxicidade do NH_4^+ para a maioria das plantas, quando este é fornecido como única fonte de N (Roosta e Schejoerring, 2007, Marschner e Marschner, 2012, Buchanan et al., 2015). No entanto, alguns pontos sobre o mecanismo da toxicidade do NH_4^+ não estão totalmente elucidados (Britto e Kronzucker 2002, Li et al., 2014). Todavia, a toxicidade do excesso de NH_4^+ nos tecidos, pode ser atribuída a fatores como: desacoplamento da fosforilação, distúrbio no balanço do pH celular (Li et al, 2011, Li et al, 2014), elevado consumo de carbono nos tecidos, síntese de etileno atuando em resposta ao estresse por NH_4^+ (Britto e Kronzucker, 2002), e acúmulo de ácido abscísico e putrecinas livres nos tecidos (Garnica et al. 2010). Além disso, alguns autores descrevem que a presença de NO_3^- é necessária para manter a biossíntese e o fluxo de citocininas em nível suficiente para mediar a normal morfogênese (Andrews et al., 2013) Visto isto, é provável que a diminuição da biomassa nas plantas cultivadas na fonte de NH_4^+ tenha relação com alguns dos fatores anteriormente mencionados.

Antagônico ao resultado de massa seca obtido em NH_4^+ , as plantas cultivadas em NO_3^- obtiveram as maiores médias. Esse aumento da massa seca em plantas cultivadas com NO_3^- também foi observado para *Cucumis sativus* L. (Roosta e Schjoerring, 2007) e para *Triticum aestivum* L.cv Amarok (Garnica et al., 2010) Os íons NO_3^- e NH_4^+ são as fontes de N mais disponíveis para absorção pelas raízes das plantas na maioria dos solos, todavia a preferência pela absorção de um determinado íon ou outro ou ambos, dependerá da espécie vegetal e suas características fisiológicas, assim como a disponibilidade destes no solo (ou substrato) (Epstein e Bloom, 2006, Marschners e Marschners, 2012, Buchanan et al., 2015). No entanto é sabido que o NO_3^- desempenha papel de sinalizador celular para expressão de genes relacionados com a captação, transporte e assimilação de N (Crawford, 1995, Miller et al., 2007), e para a síntese de citocininas, hormônios responsáveis pela regulação do crescimento (divisão e multiplicação celular) e desenvolvimento (expansão celular) das

plantas (Garnica et al., 2010, Andrews et al., 2013, Buchanan et al., 2015). O que poderia justificar o maior acúmulo de biomassa nas plantas cultivadas em NO_3^- no presente trabalho.

No que se refere aos parâmetros analisados da parte radicular, para todas as variáveis analisadas, os menores valores foram obtidos nas plantas crescidas em NH_4^+ (Fig. 2 - E, F, G e H). De acordo com Li e Shi (2007) a diminuição da parte radicular é uma característica em plantas com estresse por excesso de NH_4^+ . Essa redução pode ser atribuída à diversos fatores bioquímicos e fisiológicos, que já foram mencionados anteriormente para parte aérea e que também influenciam a parte radicular, além disso, alguns autores relataram que o NH_4^+ reprime a atividade de enzimas (GDP manose pirofosforilase - GMPase e GDP manose) necessárias para a biossíntese de L-ácido ascórbico e N-glicoproteínas (Barth et al. 2010), sendo que a falha no processo da N -glicosilação, implica em deformações na membrana e na parede celular que compromete o ciclo celular, provocando a morte da célula e por consequência inibindo o crescimento radicular (Qin et al, 2008, Kempinski et al 2011) Em relação ao alongamento radicular, foi observado que o excesso de NH_4^+ , diminui o gravitropismo nas raízes de *Arabidopsis* sp. por meio da redistribuição de auxina, implicando na redução do comprimento das raízes (Zou et al., 2012). Sendo assim, infere-se que esses distúrbios tenham influenciado negativamente o crescimento e desenvolvimento radicular em *A. comosus* var. *ananassoides*.

Ainda em relação aos parâmetros analisados na parte radicular, para variável número de raízes, as plantas cultivadas em 15 mM e 30 mM de NO_3^- e de NH_4NO_3 (Fig. 2 - E), apresentaram as maiores médias, no entanto foi observada uma tendência na diminuição da quantidade de raízes conforme o aumento da concentração de N. Alguns autores descrevem que para a maioria das plantas a alta suplementação de N suprime a ramificação radicular, enquanto que, a limitação de N acelera a ramificação e o crescimento (Kiba et al., 2011) Esta modulação no crescimento e desenvolvimento radicular em relação a alta ou baixa disponibilidade de N, é mediada principalmente pela sinalização dos fitohormônios auxina

(AIA) e ácido abscísico (ABA), além destes, foi visto que o NO_3^- também apresenta função de sinalizador molecular para o crescimento radicular (Kiba et al., 2011, Vidal et al. 2013). A AIA sinaliza para indução do alongamento celular e as raízes são mais sensíveis à esta sinalização (Tamaki e Mercier, 2007b, Buchanan et al., 2015). Estudos demonstraram que a diminuição da disponibilidade de N pode promover o acúmulo de AIA nas raízes e, por consequência, levar ao alongamento radicular (Walch-Liu et al., 2006; Tamaki e Mercier, 2007b, Tian et al., 2008). Ademais foi observado que a AIA também é responsável pela indução do desenvolvimento de **raízes laterais** (RL) em resposta à baixa suplementação de N (Fukaki e Tasaka 2009, Ma et al. 2014).

Outro hormônio que induz o crescimento de RL é o ABA (Cheng et al. 2002, Zhang et al., 2007; Zhao et al. 2015). Todavia, altas concentrações ABA têm efeito supressor no desenvolvimento de RL (Liang et al. 2007, Guo et al., 2009; Zhang et al., 2009, Zhao et al. 2015). Alguns trabalhos descrevem que plantas suplementadas com as altas concentrações de N, apresentam maior produção de ABA, resultando na inibição do crescimento de RL (Signora et al. 2001, Zhang et al. 2009, Yendrek et al. 2010). Visto isto, é possível inferir que estes fatores tenham influenciado o número de raízes nas plantas cultivadas em NO_3^- e NH_4NO_3 . Contudo, em relação ao comprimento da parte radicular, não foram observadas diferenças significativas nas plantas crescidas na maioria das concentrações, nestas duas fontes (NO_3^- e de NH_4NO_3), exceto em 90 mM de NO_3^- , que apresentou uma redução no comprimento (Fig. 2 - F).

Em relação às massas fresca e seca da parte radicular, foi observada uma tendência de aumento nas plantas cultivadas em 15 mM, 30 mM e 60 mM de NO_3^- (Fig. 2 - G, H). Assim como foi mencionado anteriormente, o NO_3^- é um sinalizador molecular para diversas funções na célula, entre elas a biossíntese de citocininas (Garnica et al., 2010, Andrews et al., 2013). Alguns autores observaram que a citocinina regula a distribuição da AIA no meristema apical radicular e também promove a divisão celular no centro quiescente do meristema apical

radicular, que geralmente é mitoticamente inativo (Ruzicka et al, 2009, Zhang et al., 2011, Zhang et al, 2013) Esse aumento na divisão celular induzida pela citocinina poderia explicar o aumento da biomassa da parte radicular nas plantas cultivadas em NO_3^- em relação aos demais tratamentos.

Quanto aos resultados de pigmentos fotossintéticos, os maiores valores foram obtidos nas plantas cultivadas em todas as concentrações de NH_4NO_3 , sendo que a maior média foi alcançada nas plantas cultivadas em 60 mM de NH_4NO_3 (Fig. 3). Esse aumento no conteúdo de pigmentos fotossintéticos também foi observado para *A. imperialis* cultivadas nas concentrações de 15, 30 e 60 mM de NH_4NO_3 , que apresentaram os maiores valores, se comparadas às médias alcançadas nestas mesmas concentrações em NO_3^- (Kurita, 2015). Geiger et al., (1999) também observaram resultado semelhante para *Nicotiana tabacum* L., cv. SamsunNN. Alguns autores descrevem que plantas suplementadas com NH_4^+ (com níveis não tóxicos), apresentam maior conteúdo de clorofila por unidade de área foliar (Raab e Tarry, 1994, Claussen e Lenz, 1999) O que explica a maior quantidade de pigmentos nas plantas cultivadas nas diferentes concentrações de NH_4NO_3 em relação as plantas de NO_3^- . Todavia, não foram encontrados na literatura estudos que esclarecem esse aumento do conteúdo de pigmentos fotossintéticos, em relação ao suplemento de diferentes fontes inorgânicas de N. Alguns autores relataram que para a maioria das plantas o NH_4^+ é preferencialmente assimilado nas raízes (visto que o seu acúmulo nos tecidos pode ser tóxico), sendo que este processo demanda grandes quantidades de esqueletos de carbono originados (do ciclo do ácido cítrico) na parte aérea da planta (Epstein e Bloom, 2006, Marschners e Marschner, 2012, Buchanan et al, 2015). De acordo com Raab e Tarry (1994) esse requerimento de carboidratos pode influenciar a toxicidade do NH_4^+ na planta, visto que quanto mais rápido o NH_4^+ absorvido for assimilado, menores serão os danos causados pela sua possível toxicidade. Diante destes fatos, poderia se inferir que o aumento do conteúdo de pigmentos fotossintéticos em *A. comosus* var. *ananassoides* cultivadas nas diferentes concentrações de NH_4NO_3 ,

poderia estar relacionada com a necessidade do suprimento da demanda de esqueletos de carbono na parte radicular, para assimilação do NH_4^+ absorvido.

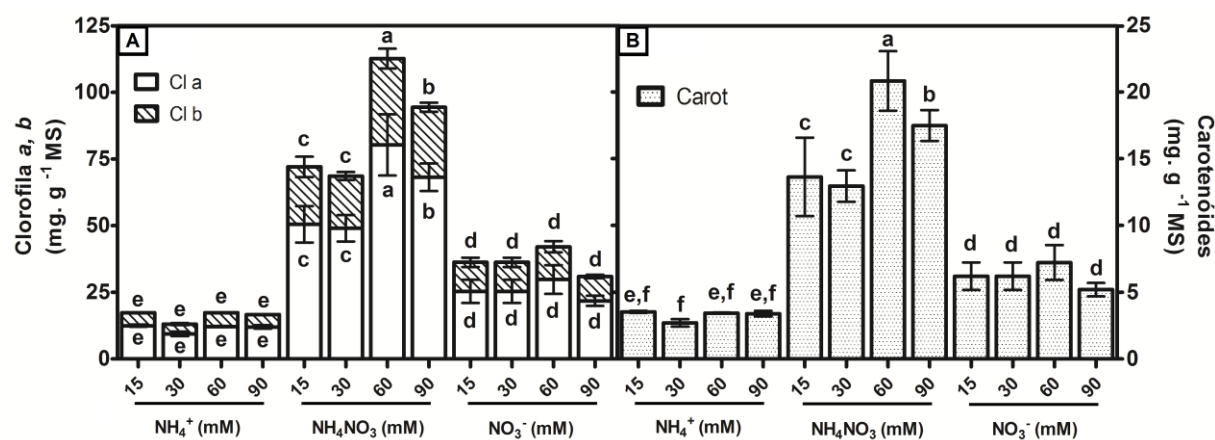


Figura 3: Conteúdo de pigmentos fotossintéticos (mg) (clorofila *a*, *b* e carotenoides) por grama de massa seca de *A. comosus* var. *ananassoides* cultivado *in vitro* por sete meses, em meio MS-1962 modificado com as diferentes fontes (NH_4^+ , NO_3^- e NH_4NO_3) e concentrações (15, 30, 60 e 90 mM) de N. A) Clorofilas *a* e *b*. B) Carotenoides. Letras minúsculas distintas, acima (Cl *b* e Carot) ou dentro (Cl *a*) de cada coluna, indicam diferença significativa em $P < 0,05$ de acordo com o teste de Tukey (ANOVA, múltipla), que compara as médias de cada tratamento em relação a um tipo de pigmento (Clorofila *a* ou *b* ou carotenoides).

3.3. Assimilação de N na parte aérea de plantas cultivadas *in vitro* em diferentes formas e concentrações de N

Para as plantas cultivadas nas diferentes concentrações de NH_4^+ , a **atividade da enzima nitrato redutase (ANR)** e o **conteúdo de nitrato endógeno (CNE)** estavam abaixo dos níveis de detecção dos métodos utilizados para estas análises, não sendo possível fazer as quantificações para esses tratamentos.

Em relação à ANR, comparando-se as médias obtidas nas plantas mantidas nas fontes de NO_3^- e NH_4NO_3 no **tempo inicial (TI)**, os maiores valores foram apresentados nas plantas cultivadas em 60 mM e 90 mM de N, tanto na forma de NO_3^- , quanto na forma de NH_4NO_3 (Fig. 4 - A). Ainda foi observado que nestas duas concentrações independentemente da forma de N utilizada, a ANR alcançou um valor máximo, visto que mesmo com a provável maior disponibilidade na concentração de 90 mM de N, a ANR apresentou valores

significativamente semelhantes aos obtidos em 60 mM de N. Outros trabalhos também verificaram essa positiva relação entre a maior disponibilidade de NO_3^- e o aumento da ANR (Claussen e Lenz, 1999, Horchani et al., 2010), e também que concentrações muito elevadas podem apresentar uma diminuição da ANR (Chen et al., 2004, Silva et al, 2011), sugerindo que a concentração de 90 mM de N, possui quantidade N a mais do que é necessário para o crescimento e desenvolvimento *in vitro* de *A. comosus* var *ananassoides*.

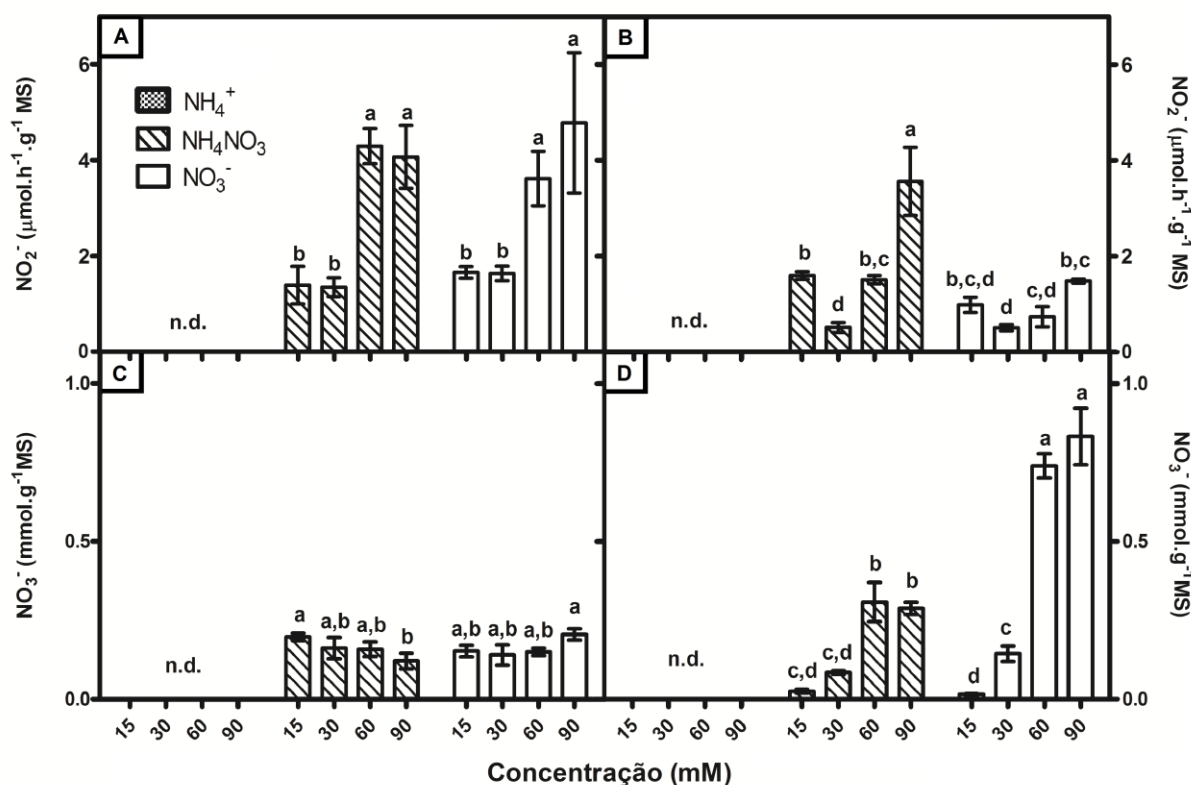


Figura 4: Atividade da enzima nitrato redutase - NR (A, B) e conteúdo de NO_3^- (C, D) na parte aérea de *A. comosus* var. *ananassoides*, 24 após transferência para o meio MS-1962 modificado com as concentrações de 15, 30, 60 e 90 mM de N, nas formas de NH_4^+ , NO_3^- e NH_4NO_3 . A, C) Tempo Inicial: plantas crescidas em MS/2 por dois meses. B, D) Tempo final: plantas cultivadas por sete meses nas diferentes concentrações e formas de N. Letras minúsculas distintas, acima de cada coluna, indicam diferença significativa em $P < 0,05$ de acordo com o teste de Tukey (ANOVA).

Quanto a ANR nas plantas do **tempo final** (TF), a maior média foi obtida nas plantas crescidas em 90 mM de NH_4NO_3 , todavia observou-se uma tendência de aumento da ANR nas plantas cultivadas em 60 e 90 mM de NH_4NO_3 se comparadas às mesmas concentrações

em NO_3^- , fato que possivelmente está relacionado com o CNE nas plantas cultivadas em 60 e 90 mM de NO_3^- ser maior do que as de NH_4NO_3 nestas mesmas concentrações (Fig. 4 - D).

Em relação ao CNE nas plantas do TI não houve diferenças significativas entre os tratamentos. Contudo, comparando-se as médias brutas da ANR nas plantas do TI e do TF, principalmente nos tratamentos com as maiores concentrações de N (60 e 90 mM), observa-se maior atividade nas plantas do TI (Fig. 4 - A, B), já em relação ao CNE, as maiores médias brutas foram apresentadas nas plantas do TF, assim como era esperado, visto que estas plantas permaneceram por mais tempo nestas concentrações se comparadas às plantas do TI (Fig. 4 - C, D). Na maioria das plantas o NO_3^- absorvido pode ser reduzido imediatamente na raiz ou transportado via xilema para parte aérea, onde é estocado no vacúolo para posterior redução conforme a necessidade da planta (Cárdenas-Navarro e Adamowicz, 1999). O NO_3^- armazenado é importante para o balanço osmótico celular, além de ser uma fonte reserva de N, em períodos onde há escassez de N (Chen et al., 2004, Miller et al., 2007).

Quanto à **atividade da glutamina sintase (AGS)**, no TI não houve diferença significativa entre os tratamentos utilizados (Fig. 5 - A). Todavia, no TF foi observado que as plantas cultivadas nas concentrações 15, 30, 60 e 90 mM de NH_4NO_3 , apresentaram as maiores AGS, se comparadas com as mesmas concentrações utilizadas nas outras duas fontes (NH_4^+ e NO_3^-) (Fig. 5 - B). Alguns estudos relataram que a AGS não é afetada pelo fornecimento de diferentes formas de N, para *Solanum lycopersicum* L. e *Zea mays* L. (Magalhães e Huber, 1991) e, também, para *Vaccinium corymbosum* L., *Rubus idaeus* L. e *Fragaria ananassa* Duch. (Claussen e Lenz, 1999). Todavia existem trabalhos que obtiveram maior AGS em plantas cultivadas em NH_4NO_3 ou NH_4^+ , quando comparadas às cultivadas em NO_3^- , tanto em *Oryza* sp. (Magalhães e Huber, 1999), quanto em *Catsetum fimbriatum* (Morren) Lindl. (Majerowicz et al., 2000) e, também, para *Solanum lycopersicum* L. cv. Rio Grande (Horchani et al., 2010). Diante destes fatos, verifica-se que a resposta da AGS em relação à fonte fornecida pode variar conforme a espécie estudada.

A assimilação do NH_4^+ em glutamina e glutamato, realizada pelas enzimas glutamina sintase (GS) e glutamina oxoglutarato aminotransferase (GOGAT), é considerada a principal via de assimilação (Miflin e Habash, 2002, Bernard e Habash, 2009, Rennenberg et al. 2010, Xu et al., 2012) e desintoxicação do NH_4^+ , sobre condições normais de crescimento da planta (Magalhães e Huber, 1991, Lea e Miflin, 2003, Guo et al., 2007). Devido a isto, infere-se que *A. comosus* var. *ananassoides* apresentou maior AGS quando cultivado em diferentes concentrações de NH_4NO_3 no TF, para evitar a toxicidade do NH_4^+ absorvido.

No entanto, a menor AGS nas plantas cultivadas nas diferentes concentrações de NH_4^+ , junto com os demais parâmetros anteriormente analisados (biométricos e de massas), indicam que provavelmente estas plantas estavam em processo de senescência. Alguns autores verificaram que folhas em processo de senescência apresentam baixas AGS (Peeters e Van Laere, 1992, Chen et al., 1997). Fato, provavelmente, relacionado com a alta degradação das proteínas no estroma do cloroplasto (por meio de proteases), tais como a ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (RuBisCo), GS plastídica e GOGAT plastídica, durante o processo de senescência foliar (Palatnik et al., 1999, Parry et al. 2003, Kato et al., 2005, Masclaux-Daubresse et al., 2010). O que poderia ter influenciado a baixa AGS nas plantas cultivadas em NH_4^+ no presente trabalho.

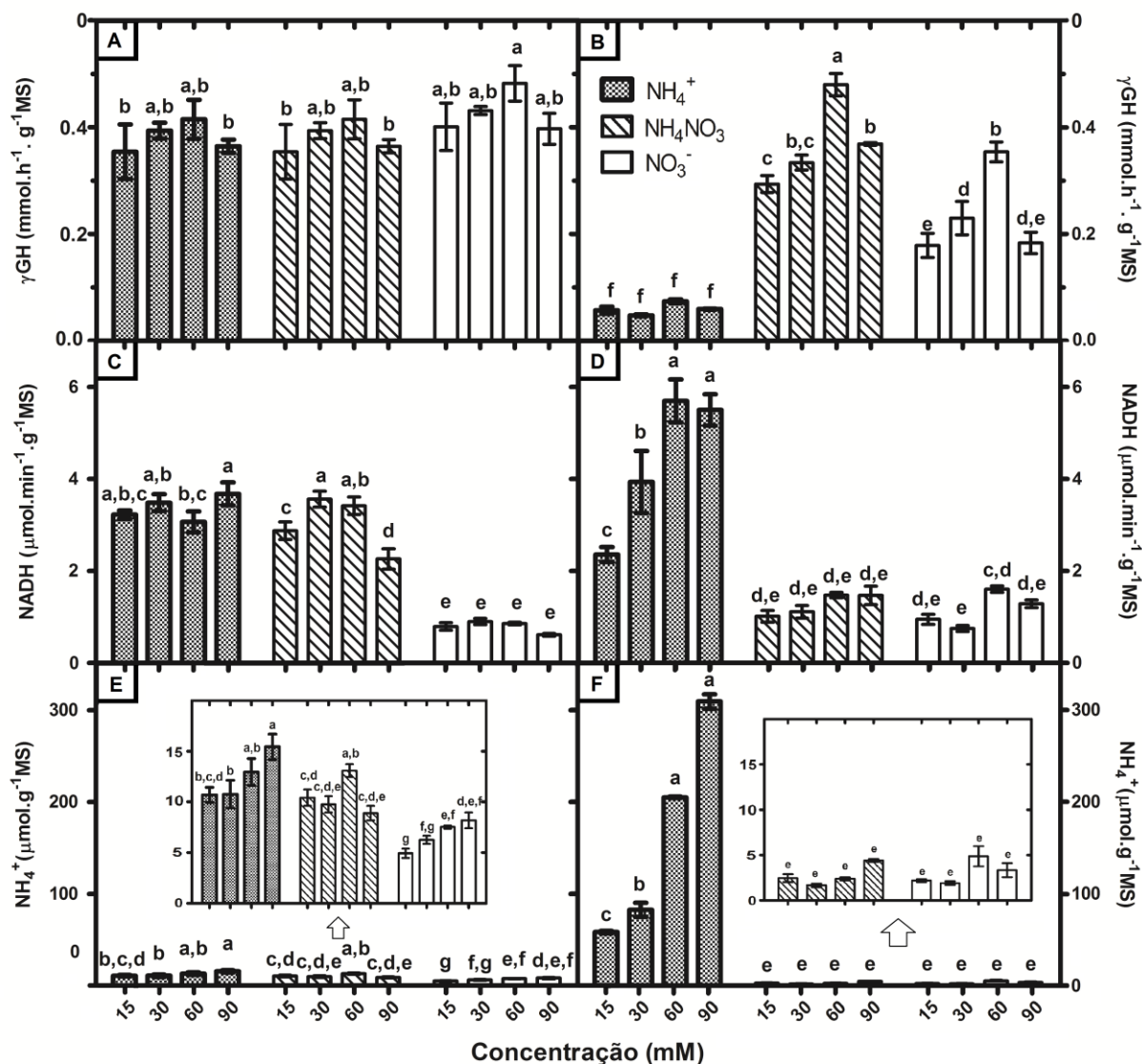


Figura 5: Atividade da glutamina sintase - GS (A, B), atividade da glutamato desidrogenase - GDH (C, D) e conteúdo de NH_4^+ (E, F) na parte aérea de *A. comosus* var. *ananassoides*, 24 após transferência para o meio MS-1962 modificado com as concentrações de 15, 30, 60 e 90 mM de N, nas formas de NH_4^+ , NO_3^- e NH_4NO_3 . A, C, E) Tempo Inicial: plantas crescidas em MS/2 por dois meses. B, D, F) Tempo final: plantas cultivadas por sete meses nas diferentes concentrações e fontes de N. Letras minúsculas distintas, acima de cada coluna, indicam diferença significativa em $P < 0,05$ de acordo com o teste de Tukey (ANOVA).

Além disso, foi observado que as plantas cultivadas em NH_4^+ no TF, apresentaram os maiores **conteúdos de amônio endógeno** (CAE) (Fig. 5 - F), sendo este mais um indício que as plantas estavam em processo de senescência. Alguns estudos relataram sobre a positiva relação entre a senescência e acúmulo de NH_4^+ nas folhas (Chen et al., 1997, Masclaux et al.,

2000, Mattsson e Schjoerring, 2003). Esse acúmulo é devido à alta proteólise que ocorre no processo de senescência, liberando grande quantidade de aminoácidos que são catabolizados pelas enzimas glutamato desidrogenase (GDH) e asparaginases (Bernad e Habash, 2009). A GDH pode catalisar tanto a aminação do 2-oxoglutarato (2-OG) quanto à desaminação do glutamato (Glu) (Lea e Miflin, 2003, Forde e Lea, 2007). Todavia, alguns autores sugerem que a principal atividade catalítica *in vivo* desta enzima seja a desaminação do Glu, liberando NH_4^+ e 2-OG, além de gerar NADH (Miflin e Habash, 2002, Lea e Miflin, 2003, Masclau-Daubresse et al., 2010). Esse processo ocorre como um desvio para assegurar que assimilação do N não diminua excessivamente a quantidade de 2-OG na mitocôndria, visto que este é um intermediário no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) (Robison et al, 1991, Miflin e Habash, 2002, Lea e Miflin, 2003). Diante do exposto, é possível inferir que a maior atividade de GDH em *A. comosus* var. *ananassoides* cultivadas em NH_4^+ está relacionada com o catabolismo do Glu, para gerar tanto o 2-OG para o ciclo TCA, quanto o NADH, necessário para outros processos metabólicos na célula.

Já em relação a maior atividade da GDH nas plantas cultivadas em NH_4^+ e NH_4NO_3 , no TI, provavelmente, esteja relacionada com atividade de aminação do Glu, visto que alguns trabalhos também sugerem que a GDH possui importante papel na assimilação de N (Magalhães e Huber, 1991, Skopelitis et al., 2006, Li et al., 2011).

3.4. Aclimatização das plantas obtidas *in vitro* nas diferentes concentrações e fontes de N

Após três meses da transferência para as condições *ex vitro*, não houve mortalidade nas plantas cultivadas nas diferentes concentrações de NO_3^- e NH_4NO_3 , apresentando aspecto saudável em todas as concentrações utilizadas (Fig. 6). Entretanto, 100% das plantas cultivadas nas diferentes concentrações de NH_4^+ não sobreviveram sob esta condição.

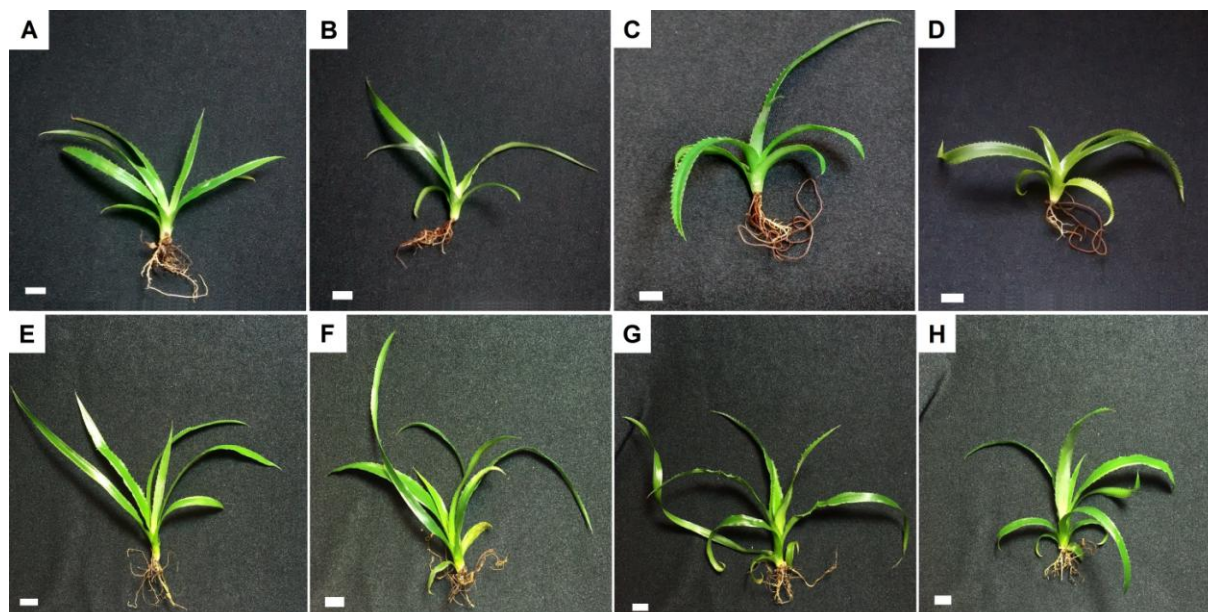


Figura 6: Aspecto geral das plantas de *Ananas comosus* var. *ananassoides* cultivadas *ex vitro* por três meses, adubadas com solução nutritiva composta pela formulação de MS-1962 modificado com as diferentes fontes (NO_3^- e NH_4NO_3) e concentrações (15, 30, 60 e 90 mM) de N, por sete meses. A, B, C e D - plantas cultivadas em 15 mM, 30 mM, 60 mM e 90 mM de NO_3^- , respectivamente. E, F, G e H - plantas cultivadas em 15 mM, 30 mM, 60 mM e 90 mM de NH_4NO_3 , respectivamente. Barra de escala corresponde a 1 cm. Foto: Priscila P. A. Silva.

Em relação ao crescimento e desenvolvimento da parte aérea, as plantas cultivadas em 30, 60 e 90 mM de NH_4NO_3 , apresentaram as maiores médias brutas, se comparadas aos demais tratamentos utilizados, na maioria dos parâmetros analisados (Fig. 7 - A, B, C, D). Quanto aos parâmetros da parte radicular em todas as variáveis analisadas (Fig. 7 - E, F, G, H).

Não foram encontrados na literatura trabalhos que avaliam a aclimatização de plantas cultivadas *in vitro*, sob a adubação de diferentes fontes e concentrações de N. Todavia, Kurita (2015) verificou que a bromélia *A. imperialis* cultivada em ambiente controlado, apresentou maior crescimento quando cultivada sob adubação de NO_3^- , em comparação às adubadas com NH_4^+ e NH_4NO_3 . Diferente do observado para *A. comosus* var. *ananassoides*.

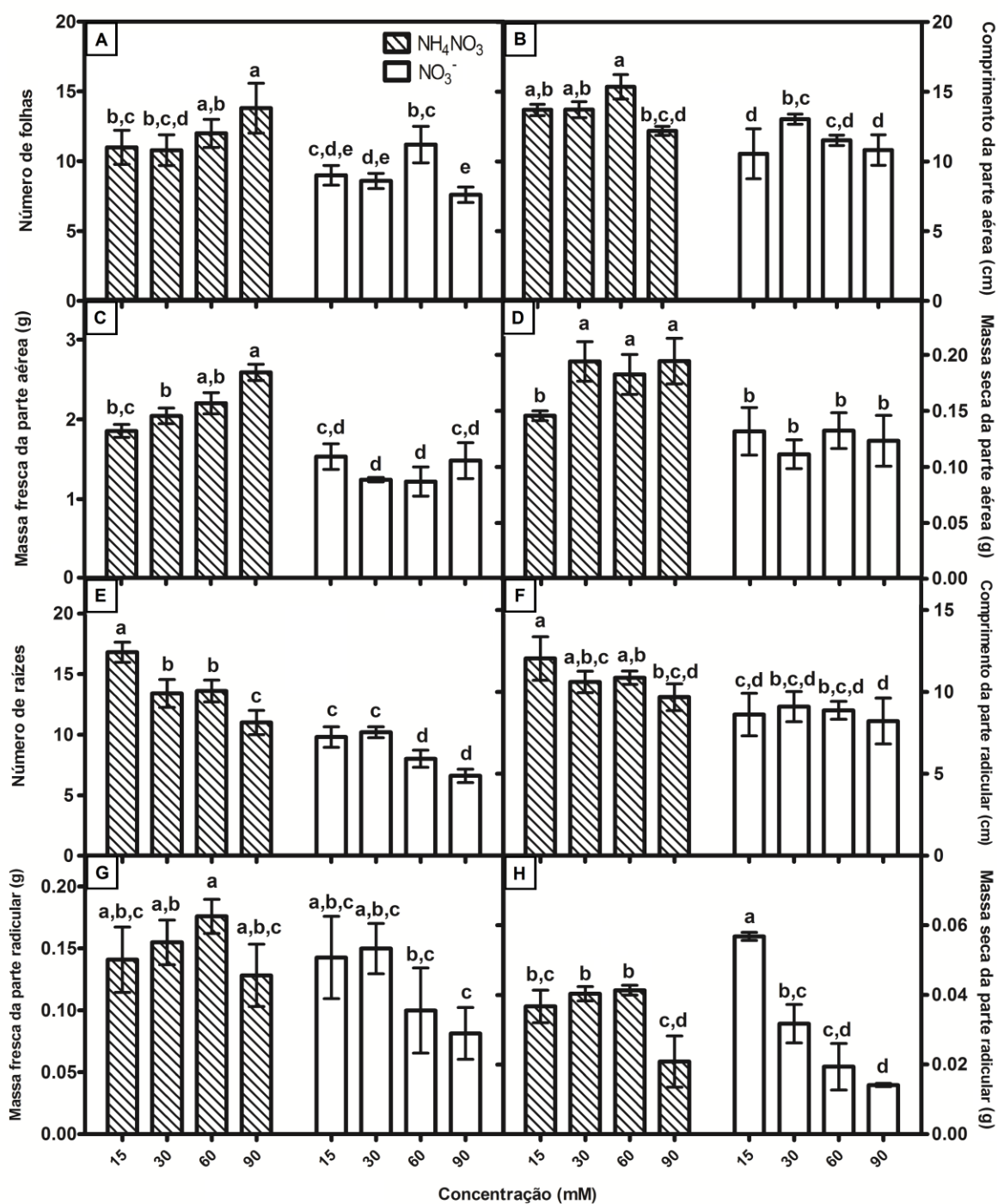


Figura 7: Parâmetros (biométricos e de massas) analisados da parte aérea e radicular de *A. comosus* var. *ananassoides* cultivado *ex vitro* por três meses, adubado com solução nutritiva composta pela formulação de MS-1962 modificado com as diferentes fontes (NH₄⁺, NO₃⁻ e NH₄NO₃) e concentrações (15, 30, 60 e 90 mM) de N. A) Número de folhas, B) comprimento da parte aérea (cm), C) quantidade de massa fresca (g) da parte aérea por planta, D) quantidade de massa seca (g) da parte aérea por planta, E) número de raízes, F) comprimento da parte radicular (cm), G) quantidade de massa fresca (g) da parte radicular por planta, H) quantidade de massa seca (g) da parte radicular por planta. Letras minúsculas distintas, acima de cada coluna, indicam diferença significativa em $P < 0,05$ de acordo com o teste de Tukey (ANOVA, múltipla).

Em relação ao conteúdo de pigmentos fotossintéticos os maiores valores foram obtidos nas plantas adubadas com as diferentes concentrações de NH_4NO_3 , sendo a maior média atingida nas plantas cultivadas com 60 mM de NH_4NO_3 (Fig. 8) corroborando os resultados de pigmentos fotossintéticos anteriormente obtidos nas plantas cultivadas *in vitro*.

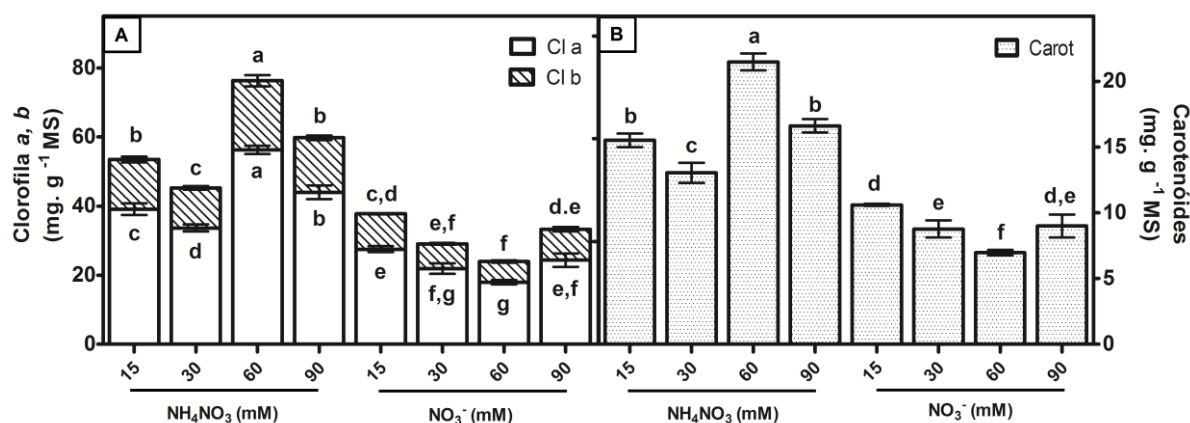


Figura 8: Conteúdo de pigmentos fotossintéticos (mg) (clorofila *a*, *b* e carotenoides) por grama de massa seca de *A. comosus* var. *ananassoides* cultivado *ex vitro* por três meses, adubado com solução nutritiva composta pela formulação de MS-1962 modificado com as diferentes fontes (NH_4^+ , NO_3^- e NH_4NO_3) e concentrações (15, 30, 60 e 90 mM) de N. A) Clorofilas *a* e *b*. B) Carotenoides. Letras minúsculas distintas, acima (Cl *b* e Carot) ou dentro (Cl *a*) de cada coluna, indicam diferença significativa em $P < 0,05$ de acordo com o teste de Tukey (ANOVA, múltipla), que compara as médias de cada tratamento em relação a um tipo de pigmento (Clorofila *a* ou *b* ou carotenoides).

É sabido que durante a passagem do cultivo *in vitro* para as condições *ex vitro*, mudanças em fatores como: aumento da taxa de transpiração, aumento da luminosidade, substituição de uma condição heterotrófica para outra autotrófica, dentre outros, podem ser fatores limitantes para a propagação de algumas espécies (Grattapaglia e Machado, 1998, Hartmann et al., 2002, Bregonci et al., 2008, Berilli et al., 2011). Visto isso, e comparando os resultados de crescimento e pigmentos fotossintéticos, nas plantas cultivadas *in vitro* e *ex vitro*, verifica-se que mesmo apresentando uma tendência de maior acúmulo de biomassa, nas plantas cultivadas *in vitro* em 15 e 60 mM de NO_3^- , a passagem para as condições *ex vitro*, mostrou-se mais favorável para o crescimento e desenvolvimento das plantas cultivadas nas

maiores contrações de NH_4NO_3 , o que provavelmente deve estar relacionado com o maior conteúdo de pigmento fotossintético nestas plantas e, que já tinha sido anteriormente observado na condição *in vitro*, podendo se inferir que estas foram capazes de assimilar mais carbono, resultando no maior crescimento e desenvolvimento *ex vitro*.

Em suma, as plantas cultivadas *in vitro* na concentração de 60 mM de NH_4NO_3 e de NO_3^- , apresentaram uma tendência de maior crescimento em relação aos demais tratamentos utilizados. Todavia as plantas cultivadas em 60 mM de NO_3^- , obtiveram maior acúmulo de biomassa. Contudo a ANR foi maior em 60 mM de NH_4NO_3 , provavelmente em razão do menor CNE nestas plantas, em comparação ao CNE nas plantas cultivadas em NO_3^- nesta mesma concentração. Além disso, a AGS também foi maior nas plantas cultivadas em 60 mM de NH_4NO_3 , possivelmente em virtude da absorção do íon NH_4^+ , cujo acúmulo nos tecidos pode ser prejudicial para a planta. Em relação à atividade da GDH os maiores valores foram obtidos em NH_4^+ , cujas plantas apresentaram sintomas de senescência, observado por fatores como: aspecto atrofiado das plantas, presença de mortalidade, menores valores biométricos e de massas, menores conteúdos de pigmentos fotossintéticos e maiores valores de CAE, indicando que a atividade desta enzima *in vivo* nestas plantas estaria catabolizando os aminoácidos, gerados pela proteólise de proteínas. Em relação à aclimatização, as plantas cultivadas em 30, 60 e 90 mM de NH_4NO_3 apresentaram uma tendência de maior crescimento em comparação aos demais tratamentos, possivelmente devido a maior quantidade de pigmentos fotossintéticos nas plantas cultivadas nestas concentrações.

4. CONCLUSÃO

As formas e concentrações de nitrogênio podem influenciar o crescimento, desenvolvimento e assimilação de N em *A. comosus* var. *ananassoides*. Recomenda-se cultivar esta bromélia *in vitro* e *ex vitro* com 60 mM de NH_4NO_3 .

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudo concedida à Silva, P. P. A. (processo: 155255/2014-2).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, S. V. e Tamaki, V. 2016. In Vitro Growth of *Nidularium Minutum* Mez (Bromeliaceae) in Different Concentrations of Nitrogen , Phosphorus , Potassium , and Calcium. *Journal of Plant Nutrition* 1-34.
- Andrews, M., Raven, J. A. e Lea, P. J. Do plants need nitrate ? The mechanisms by which nitrogen form affects plants. *Annals of Applied Biology* 1-26.
- Azevedo, B. M. de; et al. 2008. Aclimatização *ex vitro* de abacaxizeiro ornamental com diferentes lâminas de irrigação. *Irriga* 13(3): 298-0309.
- Albert, L. H. B. 2004. Aspectos morfoanatômicos de mudas de abacaxizeiro ‘Smooth Cayenne’ micropropagadas Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras.
- Babourina, O., Voltchanskii, K., McGann, B., Newman I. e Rengel Z. 2007. Nitrate supply affects ammonium transport in canola roots. *Journal of experimental botany* 58:651–658.
- Bairu, M.W., Fennell, C.W. e van Staden, J. 2006. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in *Cavendish banana* (Musa AAA cv. ‘Zelig’). *Sci Hortic* 108: 347–351.
- Bairu, M.W., Aremu, A.O. e Staden, J.V. 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regul* 63: 147–173.
- Barth, C., Gouzd, Z. A., Steelt, H. P. e Imperio, R. M. 2010. A mutation in GDP-mannose pyrophosphorylase causes conditional hypersen- sitivity to ammonium, resulting in

- Arabidopsis* root growth inhibition, altered ammonium metabolism, and hormone homeostasis. *J Exp Bot* 61: 379–394.
- Bullen, W. A. 1956. The isolation and characterization of glutamic dehydrogenase from corn leaves. *Archives Biochemistry and Biophysics* 62: 173-183.
- Berilli, S. S., Carvalho, A. J. C., Freitas, S. J., Faria, D. C. e Marinho., C. S. 2011. Avaliação do desenvolvimento de diferentes tamanhos de mudas micropropagadas de abacaxizeiro, após aclimação. *Revista Brasileira de Fruticultura* 33(1): 208-214.
- Bernard, S. M. e Habash, D. Z. 2009. The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. *New Phytologist* 182: 608–620.
- Bomfim, G. V. do et al. 2007a. Aclimação de mudas micropropagadas de abacaxizeiro ornamental em diferentes volumes de substrato. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental* 13(2): 121-128.
- Bomfim, G. V. do et al. 2007b. Aclimação *ex vitro* de abacaxizeiro ornamental em substrato à base de pó-de-coco. *Plant Cell Culture & Micropropagation* 3(1): 41-48.
- Bomfim, G. V. do et al. 2011. Aclimação *ex vitro* de abacaxizeiro ornamental com diferentes frequências de irrigação. *Irriga* 16(1): 104-114.
- Borges, N. S. S. et al. 2003. Influência do meio bifásico na multiplicação de gemas e no alongamento de brotos *in vitro* de *Ananas lucidus* Miller. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental* 9(1): 37-44.
- Braun, H., Coelho, S. F., Silva, M. C. C., Fontes, P. C. R., Cecon, P. R. e Busato, C. 2013. Absorção, metabolismo e diagnóstico do estado de nitrogênio em plantas de batata. *Revista de Ciências Agrárias* 56(3): 185-195.

- Bregonc, S. I.; Reis, E. S.; Almeida, G. D.; Brum, V. J. e Zucoloto, M. 2008. Avaliação do crescimento foliar e radicular de mudas micropropagadas do abacaxizeiro cv. Gold em aclimação. *Idesia* 26(3): 87-96.
- Britto, D.T. e Kronzucker, H.J. 2002. NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. *Journal of Plant Physiology* 159: 567– 584.
- Buchanan, B. B.; Gruissen, W. e Jones, R. L. 2006. *Biochemistry & molecular biology of plants*. 2 ed. American Society of Plants Biologists.
- Bunn, Eric. et al. 2011 Biotechnology for saving rare and threatened florain a biodiversity hotspot. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 47(1) 188-200.
- Calvete, E. O.; Azevedo, M.; Bordignon, M. H. e Suzin, M. 2002 Análises anatômicas e da biomassa em plantas de morangueiro cultivadas *in vitro* e *ex vitro*. *Horticultura Brasileira* 20(4): 649-653.
- Cárdenas-Navarro, R., Adamowicz, S. e Robin, P. 1999. Nitrate accumulation in plants: a role for water. *J. Exp. Bot* 50: 613–624.
- Carvalho, A. C. P. P. et al. 2009. Multiplicação in vitro de abacaxi ornamental por estiolamento e regeneração de brotações. *Horticultura Brasileira* 27(1): 103-108.
- Carvalho, A. C. P. P. de et al. 2012. *Estiolamento In Vitro de Plantas: Alternativa para a Produção de Mudas Micropropagadas de Abacaxizeiro Ornamental*. Embrapa Agroindústria Tropical, Circular Técnica 42: 1-12.
- Cataldo, D. A. et al. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 6(1): 71-80.
- Chen, S., Hung, K. e Kao, C. 1997. Ammonium accumulation is associated with senescence of rice leaves. *Plant Growth Regulation* 21: 195–201.

- Chen, J. G., Cheng, S. H., Cao, W. e Zhou, X. 1998. Involvement of endogenous plant hormones in the effect of mixed nitrogen source on growth and tillering of wheat. *J Plant Nutr* 21: 87–97.
- Cheng, W. H., Endo, A., Zhou. L., Penney, J., Chen, H. C. , Arroyo, A., Leon, P., Nambara, E., Asami, T., Seo, M., Koshiba, T. e Sheen, J. 2002 A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *Plant Cell* 14:1–21.
- Chen, B. M., Wang, Z. H., Li, S. X., Wang, G. X., Song, H. X. e Wang, X. N. 2004. Effects of nitrate supply on plant growth, nitrate accumulation, metabolic nitrate concentration and nitrate reductase activity in three leafy vegetables. *Plant Sci* 167: 635–643.
- Claussen, W. e Lenz, F. 1999. Effect of ammonium or nitrate nutrition on net photosynthesis, growth, and activity of the enzymes nitrate reductase and glutamine synthetase in blueberry, raspberry and strawberry. *Plant Soil* 208(1) 95-102.
- Correia, D. et al. 2009. Growth of micropropagated *Ananas comosus* var. *erectifolius* plantlets in different substrates under greenhouse conditions. *Acta Horticulturae* 822: 85-89.
- Costa, T. e Zaffari, G. R. 2005. Micropropagação de *Ananas bracteatus* (Shultz) cv. *estriatus* *Hort. Revista Brasileira de Horticultura Ornamental* 11(2): 109-113.
- Crawford, N. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *The Plant cell* 7: 859-868.
- Cruz, J. L., Pelacani, C. R. e 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.
- Dias, G. de M. G. et al. 2008. Micropropagação de abacaxi ornamental (*Ananas comosus* var. *ananassoides*) por estiolamento e regeneração de plântulas. *Plant Cell Culture & Micropropagation* 4(1): 1-7.

- Dias, Márcia M. et al. 2010. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização de plantas micropropagadas de abacaxizeiro ornamental. *Tecnologia & Ciência Agropecuária* 4(2): 29-33.
- Dias, Márcia M. et al. 2011a. Reguladores de crescimento na propagação in vitro de abacaxizeiro ornamental. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* 6(3): 383-390.
- Dias, Márcia M. et al. 2011b. Concentrações de reguladores vegetais no estiolamento in vitro de ananás do campo. *Semina: Ciências Agrárias* 32(2): 513-520.
- Dias, Márcia M. et al. 2013. Concentrações de NPK no cultivo in vitro de abacaxizeiro ornamental. *Tecnologia & Ciência Agropecuária* 7(4): 1-6.
- Endres, L. e Mercier, H. 2001. Ammonium and urea as nitrogen sources for bromeliads. *Journal of Plant Physiology* 158: 205-212.
- Epstein, E. e Bloom, A. J. 2006. *Nutrição Mineral de Plantas: Princípios e Perspectivas*. 2 ed. Trad. Editora Planta.
- Farnden, K.J.S. e Robertson, J.G. 1980. Methods for studying enzyme involved in metabolism related to nitrogenase. In: *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation* eds Bergsen, F. J., pp. 279-286. John Wiley & Sons Ltda.
- Feng J, Volk RJ, Jackson WA. 1998. Source and magnitude of ammonium generation in maize roots. *Plant Physiol* 118: 835–841.
- Forde, B. G. e Lea, P. J. 2007. Glutamate in plants: metabolism, regulation and signalling. *Journal of Experimental Biology* 58: 2339–2358.
- Fukaki, H., e Tasaka, M. 2009. Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Mol. Biol* 69: 437–449.

- Garbin, M. L. e Dillenburg, L. R. 2008. Effects of different nitrogen sources on growth , chlorophyll concentration, nitrate reductase activity and carbon and nitrogen distribution in *Araucaria angustifolia*. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 20(4): 295-303.
- Garnica, M.; Houdusse, F.; Zamarreno, A. M. e Garcia-Mina, J. M. 2010. The signal effect of nitrate supply enhances active forms of cytokinins and indole acetic content and reduces abscisic acid in wheat plants grown with ammonium. *Journal of Plant Physiology* 167: 1264–1272.
- Geiger, M., Haake, V., Ludewig, F., Sonnewald, U. e Stitt, M. 1999. The nitrate and ammonium nitrate supply have a major influence on the response of photosynthesis, carbon metabolism, nitrogen metabolism and growth to elevated carbon dioxide in tobacco. *Plant, Cell and Environment* 22: 1177–1199.
- Grattapaglia, D. e Machado, M. A. 1998. Micropropagação. In: *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*, eds. Torres, A.C., Caldas, L.S., Buso, J. A. 1. ed. pp.183-260. Brasília: Embrapa- CNPH.
- Guo, S., Brueck, H., e Sattelmacher, B. 2002. Effects of supplied nitrogen form on growth and water uptake of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. *Plant and Soil* 239: 267–275.
- Guo, S., Chen, G., Zhou, Y. e Shen, Q. 2007. Ammonium nutrition increases photosynthesis rate under water stress at early develop- ment stage of rice (*Oryza sativa* L.) *Plant Soil* 269: 115–124.
- Guo, D., Liang J. e Li, L. 2009. Absciscic acid (ABA) inhibition of lateral root formation involves endogenous ABA biosynthesis in *Arachis hypogaea* L. *Plant Growth Regul* 58:173–179.
- Hartmann, H. T. et al. 2002 *Plant propagation: Principles and Practices*. New York: Englewood Clippis.

- Horchani, F., Aschi-Smiti, S. e Brouquisse, R. 2010. Involvement of nitrate reductase in the tolerance of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants to prolonged root hypoxia. *Acta Physiol Plant* 32: 1113-1123.
- Jain, S. M., Brar, D. S., Ahloowalia, B. S. 2013. *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement*. Springer Science & Business Media.
- Jaworski, E. 1971. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 43(6): 1274-1279.
- Joyce, S.M., Cassells, A.C. e Jain, M. 2003. Stress and aberrant phenotypes *in vitro* culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 103-121.
- Kato, Y., Yamamoto, Y., Murakami, S. e Sato, F. 2005. Post-translational regulation of CND41 protease activity in senescent tobacco leaves. *Planta* 222: 643–651.
- Kempinski, C.F. et al. 2013. The novel *Arabidopsis thaliana* svt2 suppressor of the ascorbic acid-deficient mutant vtc1-1 exhibits phenotypic and genotypic instability. *F1000Research* 2, 6.
- Kiba, T., Kudo, T., Kojima, M., Sakakibara, H. 2011. Hormonal control of nitrogen acquisition: roles of auxin, abscisic acid, and cytokinin. *J Exp Bot* 62:1399–1409.
- Kurita, F.M.K. 2015. Assimilation of different nitrogen sources in the induction of the multiplication of bromeliad *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms cultivated in vitro. Masters Thesis. Institute of Botany - Secretary of the Environment of São Paulo State.
- Kraiser, T., Gras, D. E., Gutierrez, A. G., Gonzalez, B. e Gutierrez, R. A. 2011. A holistic view of nitrogen acquisition in plants. *Journal of Experimental Botany* 62: 1455–1466.
- Krishna, H. e Singh, D. 2013. Micropropagation of lasora (*Cordia myxa* Roxb.). *Indian J Hort* 70:323–327.

- Krishna, H., Alizadeh, M., Singh, D., Singh, U., Chauhan, N., Eftekhari, M. e Sadh, R. K. 2016. Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. *3 Biotech.* 6: 54.
- Laukkanen, Hanna. et al. Effect of different nitrogen nutrients on the viability, protein synthesis and tannin production of Scots pine callus. *Physiologia Plantarum.* v. 100, n. 4, ago. 1997.
- Lea, P. J. e Mifflin, B.J. 2003. Glutamate synthase and the synthesis of glutamate in plants. *Plant Physiol Biochem* 41: 555–564.
- Liang, Y., Mitchell, D. M. e Harris, J. M. 2007. Absciscic acid rescues the root meristem defects of the *Medicago truncatula* latd mutant. *Dev Biol* 304: 297–307.
- Li, B., Li, G., Kronzucker, H. J., Balusca, F. e Shi, W. 2014. Ammonium stress in *Arabidopsis*: Signaling, genetic loci, and physiological targets. *Trends in Plant Science* 19(2): 107-114.
- Li, B. H. e Shi, W. M. 2007. Effect of elevated NH_4^+ on *Arabidopsis* seedlings different in accessions. *Acta Pedol Sin* 44(3): 508–515.
- Li, B. et al. 2011. The differing responses of two *Arabidopsis* ecotypes to ammonium are modulated by the photoperiod regime. *Acta Physiol. Plant.* 33: 325–334.
- Lichtenthaler, H. K. e Buschmann, C. 2001. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* F4.3.1-F4.1–8.
- Luo, J., Zhou, J., Li, H., Shi, W., Polle, A., Lu, M., Sun, X. e Luo, Z. B. 2015. Global poplar root and leaf transcriptomes reveal links between growth and stress responses under nitrogen starvation and excess. *Tree Physiology* 35: 1283–1302.

- Magalhães, J. R. e Huber, D. M. 1991. Response of ammonium assimilation enzymes to nitrogen form treatments in different plant species. *Journal of Plant Nutrition* 14: 175-185.
- Majerowicz, N., Kerbaudy, G. B., Nievola, C. C., Suzuki, R. M. 2000. Growth and nitrogen metabolism of *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae) grown with different nitrogen sources. *Environ Exp Bot* 44: 195–206.
- Marschner, Horst e Marschner, Petra. 2012. *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. 3 ed. London: Academic Press.
- Masclaux, C., Valadier, M-H., Brugière, N., Morot-Gaudry, J-F. e Hirel, B. 2000. Characterisation of sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta* 211: 510–518.
- Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L. e Suzuki, A. 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilisation in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany* 105: 1141–1158.
- Mattsson, M. e Schjoerring, J. K. 2003. Senescence-induced changes in apoplastic and bulk tissue ammonia concentrations of ryegrass leaves. *New Phytologist* 160: 489–499.
- Ma, W., Li, J., Qu. B., He, X., Zhao, X., Li, B., Fu, X. e Tong, Y. 2014. Auxin biosyn- thetic gene TAR2 is involved in low nitrogen-mediated reprogramming of root architecture in *Arabidopsis*. *Plant J* 78:70–79.
- McCullough, Helen. 1967. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clinica Chimica Acta* 17(2): 297-304.
- Mercier, H. e Kerbaudy, G. B. 1993. Micropropagation Of *Dyckia Macedoi* And Endangered Endemic Brazilian Bromeliad. *Botanical gardens micropropagation news* 1(6): 70-72.

- Mercier, H. e Kerbaux, G. B. 1994. In Vitro Culture Of *Vriesea Hieroglyphica*, An Endangered Bromeliad From The Brazilian Atlantic Forest. *Journal of the bromeliad society* 44: 120-124.
- Mercier, H. e Kerbaux, G. B. 1995. Importance Of Tissue Culture Technique For Conservation Of Endangered Brazilian Bromeliads From Atlantic Rain Forest Canopy. *Selbyana* 16: 147-149.
- Mercier, H. e Kerbaux, G. B. 1996 Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). In: *Biotechnology in agriculture and forestry, high-tech and micropropagation* eds Bajaj Y. P. S. pp. 43-57. Berlim: Springer-Verlag.
- Miflin, B. J. e 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.
- Miller, A. J., Fan, X., Orsel, M., Smith, S. J., e Wells, D. M. 2007. Nitrate transport and signalling *Journal of Experimental Botany* 58(9): 2297–2306.
- Moreira, C. M. et al. 2011. Indução de brotação in vitro em curauá: sistema de cultivo e concentrações de BAP. *Horticultura Brasileira* 29(2): 58-66.
- Munné-Bosch, S. e Lalueza, P. 2007. Age-related changes in oxidative stress markers and abscisic acid levels in a drought-tolerant shrub, *Cistus clusii* grown under Mediterranean field conditions. *Planta* 225: 1039–1049.
- Murashige, T. e Skoog, F. 1962 A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3): 473-497.
- Myers, N. et al. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Nievola, C. C., Mercier, H., Majerowicz, N. 2001. Levels of nitrogen assimilation in bromeliads with different growth habits. *Journal of plant nutrition* 24(9): 1387-1387.

- Oliveira, M. K. T. de et al. 2007. Propagação in vitro da cultura do abacaxizeiro ornamental (*Ananas lucidus* Miller). *Caatinga* 20(3): 167-171.
- Oliveira, Y. de et al. 2010. Pré-aclimatização in vitro de abacaxi ornamental. *Ciência e Agrotecnologia* 34: 1647-1653.
- Orme, C. D. R. et al. 2005. Global *hotspots* of species richness are not congruent with endemism or threat. *Nature* 436(7053): 1016-1019.
- Palatnik, J. F., Carillo, N. e Valle, E. M. 1999. The role of photosynthetic electron transport in the oxidative degradation of chloroplastic glutamine synthetase. *Plant Physiology* 121: 471–478.
- Parry, M. A., Andralojc, P.J., Mitchell, R. A., Madgwick, P. J. e Keys, A. J. 2003. Manipulation of Rubisco: the amount, activity, function and regulation. *J. Exp. Bot.* 54: 1321–33.
- Pasqual M et al. 2008. Micropropagação do abacaxizeiro ornamental. *Horticultura Brasileira* 26: 45-49.
- Peeters, K. M. U. e Van Laere, A. J. 1992. Ammonium and amino acid metabolism in excised leaves of wheat (*Triticum aestivum*) senescing in the dark. *Physiologia Plantarum* 84: 243–249.
- Pereira, F. D. et al. 2006 Proliferação in vitro de brotos de curauá utilizando diferentes volumes de meio de cultura. *Plant Cell Culture & Micropropagation* 2(2): 102-106.
- Proença, S. L. e SAJO, M. G. 2007. Anatomia foliar de bromélias ocorrentes em áreas de cerrado do Estado de São Paulo, Brasil. *Acta Botânica Brasílica* 21(3): 657-673.
- Qin, C., Qian, W., Wang, W., Wu, Y., Yu, C., Jiang, X., Wang, D. e Wu, P. 2008. GDP-mannose pyrophosphorylase is a genetic determinant of ammonium sensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci* 105: 18308–18313.

- Raab, T. K. e Terry, N. 1994 Nitrogen-source regulation of growth and photosynthesis in *Beta vulgaris* L. *Plant Physiology*.105: 1159–1166.
- Rahayu, Y.S. , Walch-Liu, P., Neumann, G., Römheld, V., Von Wirén, N. e Bangerth, F. 2005. Root- derived cytokinins as long-distance signals for NO_3^- -induced stimulation of leaf growth. *J Exp Bot* 56:1143–52.
- Rakoczy-Trojanowska, M. 2002. The effects of growth regulators on somaclonal variation in rye (*Secale cereale* L.) and selection of somaclonal variants with increased agronomic traits. *Cell Mol Biol Let.* 7:111–120.
- Rennenberg, H., Wildhagen, H. e Ehrling, B. 2010. Nitrogen nutrition of pop- lar trees. *Plant Biol* 12:275–291.
- Robinson, S. A., Slade, A. P., Fox, G. G. Phillips, R., Ratcliffe, R. G. e Stewart, G. R. 1991. The Role of Glutamate Dehydrogenase in Plant Nitrogen Metabolism. *Plant Physiol* 95: 509-516.
- Roosta, H. R. e Schjoerring, J.K. 2007. Effects of ammonium toxicity on nitrogen metabolism and elemental profile of cucumber plants. *J Plant Nutr* 30:1933–1951
- Ruzicka, K., Simaskova, M., Duclercq, J., Petrasek, J., Zazimalova, E., Simon, S., Friml, J., Van Montagu, M. C. E., and Benkova, E. 2009. Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106: 4284–4289.
- Santos, M. do D. M. et al. 2008. Brotações adventícias de abacaxizeiro ornamental sob efeito de benzilaminopurina, ácido naftalenoacético e períodos de subcultivo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43(9): 1115-1120.
- Signora, L, De Smet, I., Foyer. C. H. e Zhang, H. 2001. ABA plays a central role in mediating the regulatory effects of nitrate on root branching in *Arabidopsis*. *Plant J: Cell Mol Biol* 28:655–62.

- Silva, P., Couto, J. e Santos, A. 2010. Absorção dos íons amônio e nitrato e seus efeitos no desenvolvimento do girassol em solução nutritiva. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*.10(2): 97-104.
- Silva, K. J. D., Souza, V. A. B. e Gomes, R. L. F. G. 2008. Efeito da altura de mudas na adaptação pós-cultivo in vitro de abacaxizeiro ornamental. *Ceres* 55(6): 551-555.
- Silva, S. M., Oliveira, L. J., Faria, F. P. Reis, E. F., Carneiro, M. A. C. e Silva, S. M. 2011. Atividade da enzima nitrato redutase em milho cultivado sob diferentes níveis de adubação nitrogenada e potássica. *Ciência Rural* 41(11): 1931-1937.
- Silva, P. P. A. e Tamaki, V. 2012. Micropropagação da bromélia *Ananas ananassoides* (Baker) L.B. Sm. In: XVI Encontro de Iniciação Científica do Instituto de Botânica. pp22-22: Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente.
- Skopelitis, D. S., Paranychanakis, N. V., Paschalidis, K. A., Plia- konis, E. D., Delis, I. D., Yakoumakis, D. I., Kouvarakis, A., Papa- dakis, A. K., Stephanou, E. G. e Roubelakis- Angelakisa, K. A. 2006. Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. *Plant Cell* 18: 2767–2781.
- Souza, F. V. D. Et al. 2009 Micropropagação do abacaxizeiro e outras bromeliáceas. In: *Aspectos práticos da micropropagação de plantas* eds. Junghas, T. G. e Souza, A. S, pp. 177-205. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical.
- Souza, F. V. D. et al. 2012. O abacaxi ornamental. In: *Produção de flores de corte*. eds. Paiva, P. D. O. e Almeida, E. F. A. C., pp. 18-39 Lavras: UFLA.
- Taiz, L; Zeiger, E. 2013. *Fisiologia Vegetal*. 5 ed. Artmed.
- Tamaki, V. et al. 2007a Cultivo in vitro de clones de *Ananas comosus* (L.) Merrill cultivar Smooth Cayene em diferentes concentrações de macronutrientes. *Hoehnea* 34(1): 67-73.

- Tamaki, V. e Mercier, H. 2007b. Cytokinins and auxin communicate nitrogen availability as long-distance signal molecules in pineapple (*Ananas comosus*). *Journal of Plant Physiology* 164(11): 1543-1547.
- Tian, Q., Chen, F., Liu, J., Zhang, F. e Mi, G. 2008 Inhibition of maize root growth by high nitrate supply is correlated with reduced IAA levels in roots. *J Plant Physiol* 165:942–951.
- Walch-Liu, P., Neumann, G., Bangerth, F. e Engels, C. 2000. Rapid effects of nitrogen form on leaf morphogenesis in tobacco. *J Exp Bot* 343: 227–237.
- Walch-Liu, P., Ivanov, I., Filleur, S., Gan, Y., Remans, T. e Forde, B. G. 2006. Nitrogen regulation of root branching. *Annals of Botany* 97: 875–881.
- Weatherburn, M. W. 1967. Phenol-Hypochlorite Reaction for Determination of ammonia. *Analytical Chemistry* 39(8): 971-974.
- Werner, Elias Terra et al. 2010. Meios de cultura, reguladores de crescimento e fontes de nitrogênio na regulação da calogênese do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) *Acta Botânica Brasílica* 24(4): 1046-1051.
- Yendrek, C. R., Lee, Y. C. e Morris, V. 2010. A putative transporter is essential for integrating nutrient and hormone signaling with lateral root growth and nodule development in *Medicago truncatula*. *The Plant Journal* 62: 100–112.
- Vidal, E. A., Moyano, T. C., Riveras, E., Contreras-Lopez, O. e Gutierrez, R. A. 2013. Systems approaches map regulatory networks downstream of the auxin receptor AFB3 in the nitrate response of *Arabidopsis thaliana* roots. *Proc Natl Acad Sci* 10:12840–12845.
- Vieira, R. F. et al. 2006 Frutas nativas da região Centro-Oeste. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

- Xu, G., Fan, X. e Miller, A. J. 2012. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annual Review of Plant Biology* 63: 153–182.
- Zhang, H., Rong, H. e Pilbeam, D. 2007. Signalling mechanisms underlying the morphological responses of the root system to nitrogen in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 58: 2329–2338.
- Zhang, S., Cai, Z. e Wang, X. 2009. The primary signaling outputs of brassinosteroids are regulated by abscisic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci* 06: 4543–4548.
- Zhang, W., To, J. P. C., Cheng, C.-Y., Schaller, G. E., e Kieber, J. J. 2011. Type-A response regulators are required for proper root apical meristem function through post-transcriptional regulation of PIN auxin efflux carriers. *Plant J.* 68: 1–10.
- Zhang, W., Swarup, R., Bennett, M., Schaller, G. E. e Kieber, J. J. 2013. Cytokinin induces cell division in the quiescent center of the arabidopsis root apical meristem. *Current Biology* 23: 1979–1989.
- Zhao, F. Y., Cai, F. X., Gao, H. J., Zhang, S. Y., Kai, W., Liu, T. e Wang, X. 2015. ABA plays essential roles in regulating root growth by interacting with auxin and MAPK signaling (pathways and cell-cycle machinery in rice seedlings. *Plant Growth Regulation* 75(2): 535-547.
- Zou, N., Li, B., Dong, G., Kronzucker, H. J. e Shi W. M. 2012. Ammonium-induced loss of root gravitropism is related to auxin distribution and TRH1 function, and is uncoupled from the inhibition of root elongation in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 63: 3777–3788.

CAPITULO 2

Artigo elaborado para submissão ao periódico Journal of Plant Nutrition

Nitrogen assimilation in bromeliad *Ananas comosus* var. *Ananas* (Baker) & Coppins F.Leal from seeds or nodal segments cultured *in vitro* in the presence of nitrate or ammonium nitrate

Assimilação do nitrogênio na bromélia *Ananas comosus* var. *ananassoides* (Baker) Coppins & F.Leal provenientes de sementes ou segmentos nodais cultivadas *in vitro* na presença de nitrato ou nitrato de amônio

Priscila Primo Andrade Silva ^a, Ivomar Aparecido Medina ^b and Vívian Tamaki ^c

^a Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica SMA/SP, 04301-902, São Paulo, SP, Brazil;

^{b,c} Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais, Instituto de Botânica SMA/SP, 04301-902, São Paulo, SP, Brazil.

Corresponding author: Vívian Tamaki- vtamaki@gmail.com

RESUMO

A bromélia ornamental *Ananas comosus* var. *ananassoides* é nativa do cerrado bioma pertencente aos 34 *hotspot*, fortalecendo a importância dos estudos de suas espécies. Os estudos de micropropagação podem contribuir para conservação de espécies endêmicas, raras ou ameaçadas de extinção. A propagação *in vitro* pode ser iniciada através segmentos nodais ou sementes, sendo este último o mais indicado para posterior reintrodução dos indivíduos na natureza. Dentre os nutrientes do meio de cultura o nitrogênio é importante e requerido em maiores quantidades, sendo absorvido na forma de nitrato e amônio, que posteriormente serão assimilados em compostos orgânicos. Poucos são os estudos sobre a propagação desta espécie e nenhum avalia a influência de diferentes fontes nitrogenadas sobre o crescimento de plantas de origem embrionária somática e zigótica. Assim, este estudo visou avaliar o crescimento e a assimilação de nitrogênio nesta espécie obtida a partir de semente e de segmento nodal, cultivada em diferentes fontes de nitrogênio. Plantas obtidas de segmentos nodais e sementes foram cultivadas por sete meses em meio de cultura modificado com 60 mM de N nas formas de nitrato e nitrato de amônio, verificando semelhanças nos comportamentos de crescimento e assimilação nas plantas em ambas as origens embrionárias.

Palavras-chave: Bromeliaceae, cultivo *in vitro*, nitrogênio, segmento nodal, semente.

1. INTRODUÇÃO

A bromélia *Ananas comosus* var. *ananassoides* (Baker) Coppens & F.Leal, é muito utilizada na ornamentação, tendo sua inflorescência exportada para países europeus (Paula; Silva, 2004; Carvalho et al., 2009, Carvalho, 2012, Souza et al., 2012). Esta espécie, conhecida popularmente como “ananás-do campo” é nativa do cerrado (Vieira et al., 2006, Proença e Sajo, 2007). Bioma que se encontra ameaçado de extinção, estando entre os 34 *hotspots* globais de biodiversidade (Myers et al., 2000, Orme et al., 2005). Fortalecendo a importância de estudos e medidas de conservação de suas espécies.

Uma forma de se conservar uma espécie pode ser por meio dos estudos de propagação e o cultivo *in vitro* é um dos métodos utilizados para o crescimento e multiplicação de espécies ameaçadas de extinção (Mercier e Kerbaudy, 1993, 1994, 1995, 1996, Mercier e Nievola, 2003, Suzuki et al., 2008, Andrade e Tamaki et al., 2016) e também para a produção comercial de plantas (Engelmann, 1991; Fay, 1994; Sarasam et al., 2006; Carvalho et al., 2012), além de ser utilizado em diversos estudos de cultivo de bromélias (Souza et al, 2009; Carvalho et al., 2012, Dias et al., 2013) mostrando ser uma ferramenta importante nas pesquisas biotecnológicas (Engelmann, 1991; Fay, 1994; Sarasam et al., 2006; Carvalho et al., 2012) e nos estudos fisiológicos relacionados ao desenvolvimento vegetal (Suzuki et al., 2010).

Um fator importante para o estabelecimento do cultivo *in vitro* é a seleção do tipo de explante que dará origem a novas plantas, estes podem ser células, tecidos ou órgãos vegetais (Grattapaglia e Machado, 1998). Além destes, existem muitos estudos de propagação *in vitro* que utilizam sementes (Suzuki et al., 2009, Silva et al., 2012, Kurita e Tamaki, 2013, Kurita et al., 2014, Andrade e Tamaki, 2016) Outro fator relevante é a seleção do meio de cultura que será utilizado (Grattapaglia e Machado, 1998, Bunn et al., Pinhal et al., 2011, Su et al., 2012), uma vez que a nutrição mineral implica no crescimento e desenvolvimento das plantas (Epstein e Bloom, 2006; Marschner e Marschner, 2012). Sendo a composição descrita

por Murashige e Skoog (MS-1962) a mais utilizada para o cultivo *in vitro* de plantas (MS-1962) (Werner et al., 2010). Dos nutrientes que constituem o meio de cultura, o nitrogênio (N), pode ser considerado um dos mais importantes, visto sua função estrutural em diversas moléculas essenciais para o crescimento e desenvolvimento vegetal, tais como: nucleotídeos, ácidos nucleicos, aminoácidos, proteínas, coenzimas, clorofilas, entre outros (Epstein e Bloom, 2006; Marschner e Marschner, 2012, Buchanan et al., 2015).

O N nas formas inorgânicas de amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-) são as fontes de N mais acessíveis para absorção pelas raízes das plantas na maioria dos solos (Epstein e Bloom, 2006; Marschner e Marschner, 2012). O N absorvido na forma de NO_3^- é reduzido a nitrito (NO_2^-) pela enzima nitrato redutase (NR), que posteriormente será reduzido a NH_4^+ , por intermédio da enzima nitrito redutase (NiR), este último por sua vez será assimilado em glutamina e glutamato, pela ação das enzimas glutamina sintase (GS) e glutamato sintase (GOGAT), respectivamente (Xu et al. 2012, Andrews et al, 2013, Buchanan et al., 2015). Além destas, a mitocondrial glutamato desidrogenase dependente de NADH (GDH-NADH), alternativamente também pode contribuir na assimilação do NH_4^+ (Magalhães e Huber, 1991, Skopelitis et al., 2006, Li et al., 2011).

Alguns estudos relataram sobre a oscilação diária das enzimas e metabólitos relacionados com metabolismo de N (Fernández-Conde et al. 1995, Nievola e Mercier, 2000, Wang et al., 2011) Essas variações influenciam o balanço de N e carbono (C) e são importantes para o crescimento e desenvolvimento da planta (Masclaux-Daubresse et al., 2002, Stitt et al., 2002). Além da influência dos fatores intrínsecos da planta, condições abióticas tais como: temperatura, luminosidade, concentração de CO_2 , estresse hídrico, fornecimento de açúcar e de N, também podem induzir as atividades destas enzimas (Crawford, 1995, Geiger et al., 1998, Masclaux-Daubresse, 2002).

Em um trabalho anterior Silva et al. (capítulo 1), estudaram o crescimento e a assimilação de N em plantas de *A. comosus* var. *ananassoides* cultivadas em diferentes fontes e concentrações de N, verificando que a concentração de 60 mM de NH_4NO_3 e de NO_3^- foram as mais indicadas para o crescimento *in vitro* desta espécie. Todavia estes autores utilizaram clones obtidos de segmentos nodais para micropropagar estas plantas, cujo método permite avaliar melhor os dados fisiológicos, devido à uniformidade da população de clones estudada, sendo indicado quando o cultivo visa à produção de mudas (Carvalho et al., 2009, Carvalho et al, 2012, Krishna e Singh, 2013). Todavia, quando o objetivo é a posterior reintrodução no ambiente natural, é sugerido que a propagação *in vitro* seja feita a partir de sementes, devido a maior variabilidade genética dos exemplares (Mello et al., 1998). Contudo não foram encontrados trabalhos com esta espécie que avaliam a influência de diferentes fontes de N, sobre o crescimento e a assimilação de N em plantas de origem zigótica ou somática. Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o crescimento e a assimilação de N em plantas de *Ananas comosus* var. *ananassoides* (Baker) Coppens & F. Leal provenientes de sementes e segmentos nodais cultivadas *in vitro* em diferentes fontes de N.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção das plantas a partir de sementes

O experimental foi realizado no NPPO do IBt/SMA-SP e as sementes de *Ananas comosus* var. *ananassoides* (Baker) Coppens & F. Leal. utilizadas nos experimentos foram obtidas de frutos coletados na Reserva Biológica de Mogi Guaçu do IBt/SMA-SP. Posteriormente ao beneficiamento dos frutos para obtenção das sementes, estas foram acondicionadas em sacos de papel pardo e armazenadas em condições de refrigeração a 10 °C.

As plantas de *A. comosus* var. *ananassoides* utilizadas no experimento, foram obtidas da germinação de cerca de 2.000 sementes em placas de Petri contendo 30 mL de

meio constituído por 3% de sacarose (m/v) e 0,5% ágar (m/v). As plântulas geradas, permaneceram sob condições controladas em sala de cultura com fotoperíodo de 12 horas, radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de $26 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 127 dias após a germinação, até o esgotamento das reservas das sementes, do mesmo modo como descrito por Araujo et al. (2012).

2.2. Obtenção das plantas a partir de segmentos nodais

Já para a obtenção dos segmentos nodais, (cerca de 1.000) sementes de *A. comosus* var. *ananassoides* foram germinadas (nas mesmas condições descritas anteriormente) e transferidas para frascos de 350 mL contendo 30 mL do meio Murashige & Skoog (1962) (MS-1962) com 50% da concentração de macronutrientes (MS/2), por dois meses em sala de cultura, sob as mesmas condições controladas. Após esse período as plantas tiveram suas folhas cortadas e foram transferidas para frascos de 500 mL contendo 40 mL do meio MS/2, que foram colocados no escuro, onde permaneceram por cinco meses, visando o estiolamento do eixo caulinar das plantas. Posteriormente, as plantas estioladas tiveram os segmentos nodais isolados.

2.3. Transferência das plantas para as diferentes fontes de N

As plantas e os segmentos nodais obtidos *in vitro* (descritos nos itens 2 e 2.1), foram transferidos para frascos de 350 mL contendo 30 mL do meio MS/2, onde permaneceram por dois meses em sala de cultura sob condições controladas, visando uniformizar nutricionalmente os dois lotes. Posteriormente, as plantas foram transferidas para frascos de 350 mL contendo 30 mL do meio MS-1962 modificado por Silva et al. (capítulo 1) com as diferentes fontes de N inorgânico NO_3^- e NH_4NO_3 , na concentração de 60 mM (para cada fonte de N), permanecendo por sete meses sob as mesmas condições controladas.

As plantas cultivadas por dois meses em meio MS/2, assim como as plantas cultivadas por sete meses em meio MS-1962 modificado com as diferentes fontes (NH_4^+ ,

NO_3^- e NH_4NO_3) de N, foram transferidas para novos frascos de 350 mL contendo 30 mL de meio MS modificado com as diferentes fontes e concentrações de N, antes de 24 horas das coletas de material vegetal para as análises (descritas no item 2.4), visando garantir o suprimento de N para as plantas.

2.4. Coleta de material vegetal, delineamento experimental e parâmetros analisados.

As coletas de material vegetal para todas as análises foram feitas nos seguintes períodos do experimento (Fig. 5):

- Tempo inicial (TI): plantas cultivadas (por dois meses) em MS/2, após 24 horas de transferência para meios contendo MS-1962 modificado com as diferentes fontes (NH_4^+ , NO_3^- e NH_4NO_3) de N.

- Tempo final (TF): plantas cultivadas (por sete meses) em MS-1962 modificado com as diferentes fontes de N, após 24 horas de transferência para novos meios contendo as mesmas fontes e concentrações de N, cujas plantas foram anteriormente cultivadas.

As coletas de material vegetal no TI e TF foram feitas em intervalos de quatro horas até completar um ciclo de 24 horas, obtendo-se o total de sete pontos de coleta em 24 horas, sendo a primeira coleta feita após três horas início do período luminoso da sala e cultura.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial $2 \times 2 \times 1$, constituído de dois tipos de material vegetal (semente e segmento nodal), duas formas de nitrogênio (NO_3^- e NH_4NO_3) e uma concentração de N (60 mM). No TI e TF para cada ponto da coleta de 24 horas (sete pontos no total) a parcela experimental foi constituída por dois frascos (cinco plantas por frasco) com três repetições, ou seja, seis frascos por ponto de coleta para cada tratamento, totalizando 42 frascos por tratamento (210 plantas) em uma coleta de 24 horas.

Os parâmetros analisados foram: comprimentos das partes aérea e radicular, número de folha e raiz, massas fresca e seca das partes aérea e radicular, quantidade de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b* e carotenoides), conteúdo de NH_4^+ e NO_3^- endógenos, atividade

das enzimas nitrato redutase (NR), glutamina sintase (GS) e glutamato desidrogenase dependente de NADH (GDH-NADH).

Ressalta-se que foram utilizadas 20 plantas para análise dos parâmetros: comprimentos das partes aérea e radicular, número de folha e raiz e massas fresca e seca das partes aérea e radicular. Quanto as atividades das enzimas NR, GS e GDH, foram realizados ensaios para a padronização da melhor quantidade de massa vegetal, quantidade de substrato, volume da solução de incubação, tempo de incubação e horário da coleta de material vegetal, de acordo como descrito por Silva et al. (Capítulo 1). Os demais procedimentos e parâmetros serão descritos com mais detalhes nos itens a seguir.

2.5. Ensaio das enzimas nitrato redutase (NR) glutamina sintase (GS) e glutamato desidrogenase dependente de NADH (GDH-NADH)

A atividade da NR *in vivo* foi determinada de acordo com o método descrito por Jaworski (1971) modificado por Nievola e Mercier (2001) e adaptado por Silva et al. (Capítulo 1).

A atividade da GS foi determinada de acordo com o método *in vitro* descrito por Elliott (1955) apud Farnden e Robertson (1980) adaptado por Silva et al. (Capítulo 1).

Para a GDH-NADH a determinação foi realizada com base no método descrito por Bulen (1956) adaptado por Silva et al. (Capítulo 1).

2.6. Determinação do conteúdo endógeno de amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-)

2.6.1. Preparação do extrato vegetal

As folhas, provenientes de 10 plantas foram cortadas em pequenos fragmentos formando uma mistura heterogênea. Amostras de 0,1 g de massa fresca foram trituradas com nitrogênio líquido e, posteriormente, foram transferidas para microtubos tipo eppendorf, aos quais foram acrescentados 1 ml de água ultra-purificada. Essas amostras foram centrifugadas

a 22.000 RCF, 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e utilizado nas quantificações de amônio e nitrato endógeno. Esse procedimento foi realizado em triplicata.

2.6.2. Determinação do conteúdo endógeno de NH_4^+

O conteúdo de NH_4^+ foi determinado de acordo com a reação conhecida como fenol-hipoclorito (Weatherburn, 1967; McCullough, 1967), nesta reação foram empregados dois reagentes, o primeiro constituído por 1% (m/v) de fenol e 0,005% (m/v) nitroprusside e, o segundo constituído por 5,37 % (m/v) de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1% (v/v) de hipoclorito de sódio (10-14% Cl_2) e 0,5% (m/v) de NaOH. Em microtubos tipo eppendorf, foram aliqotados 100 μL do extrato vegetal de cada amostra e, adicionado 0,5 ml do primeiro reagente e 0,5 ml do segundo reagente. Após uma vigorosa agitação, a mistura permaneceu em banho-maria a 35°C por 30 minutos. Decorrido o período, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 625 nm. Microtubos contendo de 0,002 a 0,03 μmol de NH_4^+ ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) em 0,1 mL foram utilizados na constituição da curva padrão, nestes também foram acrescentados os dois reagentes e, permaneceram sob as mesmas condições que as amostras, até a leitura em espectrofotômetro. A dosagem de amônio endógeno foi expressa em μmol de amônio por grama de massa seca ($\mu\text{mol NH}_4^+ \cdot \text{g}^{-1} \text{MS}$).

2.6.3. Determinação do conteúdo endógeno de NO_3^-

A quantificação de NO_3^- foi realizada de acordo com o método descrito por Cataldo et al. (1975). Uma alíquota de 10 μL de extrato (de cada amostra) foi pipetada em microtubo tipo eppendorf, ao qual foi adicionado 40 μL da solução de ácido salicílico a 5% (m/v) diluído em H_2SO_4 concentrado. Após vigorosa agitação, os microtubos permaneceram a temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, foi adicionado lentamente 0,95 mL de NaOH a 2 N para elevar o pH a 12. Posteriormente as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 410 nm. Microtubos contendo de 0,003 a 0,2 μmol de NO_3^- (KNO_3) em 10 μL foram utilizados na constituição da curva padrão, nestes também foram acrescentados 40 μL da solução de ácido

salicílico a 5% (m/v) diluído em H₂SO₄ concentrado e, permaneceram sob as mesmas condições que as amostras, até a leitura em espectrofotômetro. A dosagem de nitrato endógeno foi expressa em μmol de nitrato por grama de massa seca ($\mu\text{mol. NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ MS}$).

2.7. Determinação do conteúdo de pigmentos fotossintéticos

As clorofilas *a*, *b* e carotenoides foram extraídos das folhas de cada amostra de acordo com o método descrito por Munné-Bosch e Lalueza (2007) com modificações. As folhas de 10 plantas foram coletadas e picadas em pequenos fragmentos de, aproximadamente, 1 a 2 mm de largura, formando uma mistura composta de material fresco. Estas foram trituradas em nitrogênio líquido e 0,1 g foi homogeneizado em 1 mL de acetona a 100% (v/v). Estes permaneceram em banho ultrassônico a 4 °C por 30 minutos, decorrido o período, as amostras foram centrifugadas 22.000 RCF, 4 °C por 20 minutos e o sobrenadante foi coletado. Esse procedimento foi realizado duas vezes com a mesma amostra e, posteriormente, os dois sobrenadantes de foram combinados para a leitura em espectrofotômetro. Os comprimentos de ondas para a leitura em espectrofotômetro, assim como as equações para o cálculo de conteúdo de pigmentos fotossintéticos foram utilizados de acordo com o descrito por Lichtenthaler e Buschmann (2001) e expresso em miligrama de pigmento por grama de massa seca ($\text{mg. g}^{-1} \text{ MS}$)

2.8. Análises estatísticas dos resultados

As médias foram calculadas e submetidas à análise de variância (ANOVA múltipla), sendo comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização das plantas obtidas *in vitro* a partir de sementes e segmentos nodais utilizadas nos tratamentos

Após dois meses de cultivo *in vitro* em MS/2, não houve registro de mortalidade nas plantas obtidas a partir de semente, além disso, 69% dos segmentos nodais geraram novas plantas, que apresentaram aspecto saudável (Fig. 1) e, posteriormente, foram utilizadas na montagem com os diferentes tratamentos com N.

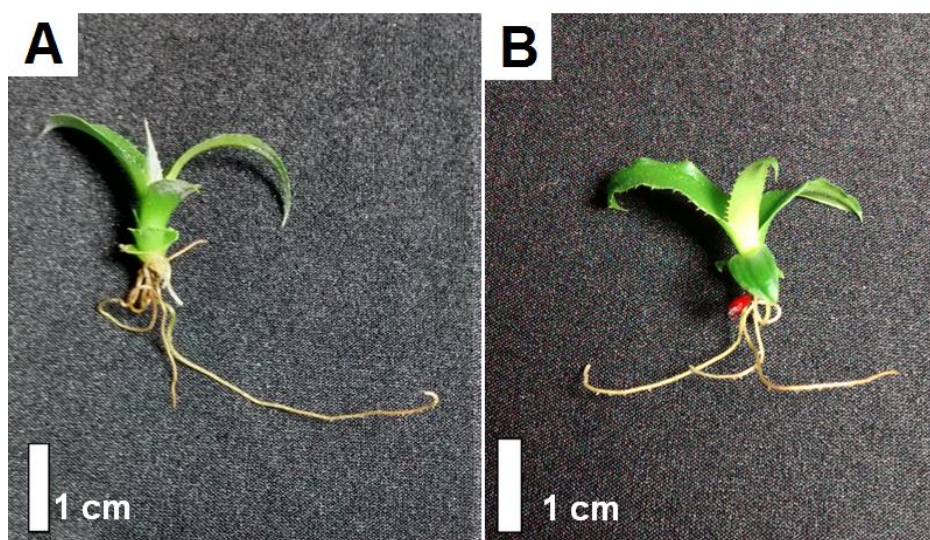


Figura 1: Aspecto geral das plantas de *Ananas comosus* var. *ananassoides* obtidas a partir de semente e de segmento nodal, cultivadas *in vitro* por dois meses em meio MS-1962 com 50% da concentração de macronutriente. A - planta obtida a partir de segmento nodal. B – planta obtida a partir de semente. Barra de escala corresponde a 1 cm. Foto: Priscila P. A. Silva.

Muitos autores descrevem que a propagação *in vitro* a partir de segmentos nodais apresentam vantagens como: grande número de indivíduos em um curto período de tempo, seleção de genótipo, uniformidade nos lotes dos indivíduos, entre outros (Dias et al., 2011a, 2011b; Dias et al. 2013), que são importantes quando o objetivo o cultivo é a produção comercial (Mercier e Kerbaudy 1996, Tamaki e Mercier 2007, Pinhal et al., 2011 Carvalho et al., 2012).

Todavia quando o propósito é a reintrodução no ambiente natural, sugere-se que o cultivo seja a partir de sementes devido à maior variabilidade genética dos indivíduos (Pickens et al. 2003; Droste et al. 2005; Toledo-Aceves e Wolf 2008). Além disso, a maioria dos estudos de micropropagação de segmentos nodais sugerem o uso de reguladores de crescimentos (fitormônio) (Bertoni et al., 2006, Oliveira et al., 2007, Carvalho et al., 2009, Dias et al. 2008, Dias et al., 2011), cuja utilização está associada com variações somaclonais nos tecidos, que não são pertinentes quando se visa a conservação da espécie (Joyce et al. 2003, Tamaki et al., 2007, Bairu et al., 2006, Bairu et al., 2011, Jain et al., 2013). Contudo alguns estudos verificaram a possibilidade do uso desse método de propagação sem a necessidade do uso destas substâncias (Tamaki et al., 2007, Santos et al., 2010, Silva et al., Capítulo 1), assim como observado no presente estudo.

Em relação ao crescimento e desenvolvimento da parte aérea, não houve diferenças significativas nas plantas geradas a partir de sementes e de segmentos nodais, para a maioria dos parâmetros analisados, exceto quanto à massa seca, cuja média foi maior nas plantas de segmentos nodais. (Fig. 2 - A, B, C, D). Quanto aos parâmetros da parte radicular as plantas obtidas de sementes apresentaram maior número de raízes. Todavia, as plantas geradas de segmentos nodais apresentaram maior comprimento radicular. Contudo, em relação às massas fresca e seca das raízes não houve diferença significativa entre as plantas de ambas as origens (zigótica e somática) (Fig. 2 - E, F, G, H).

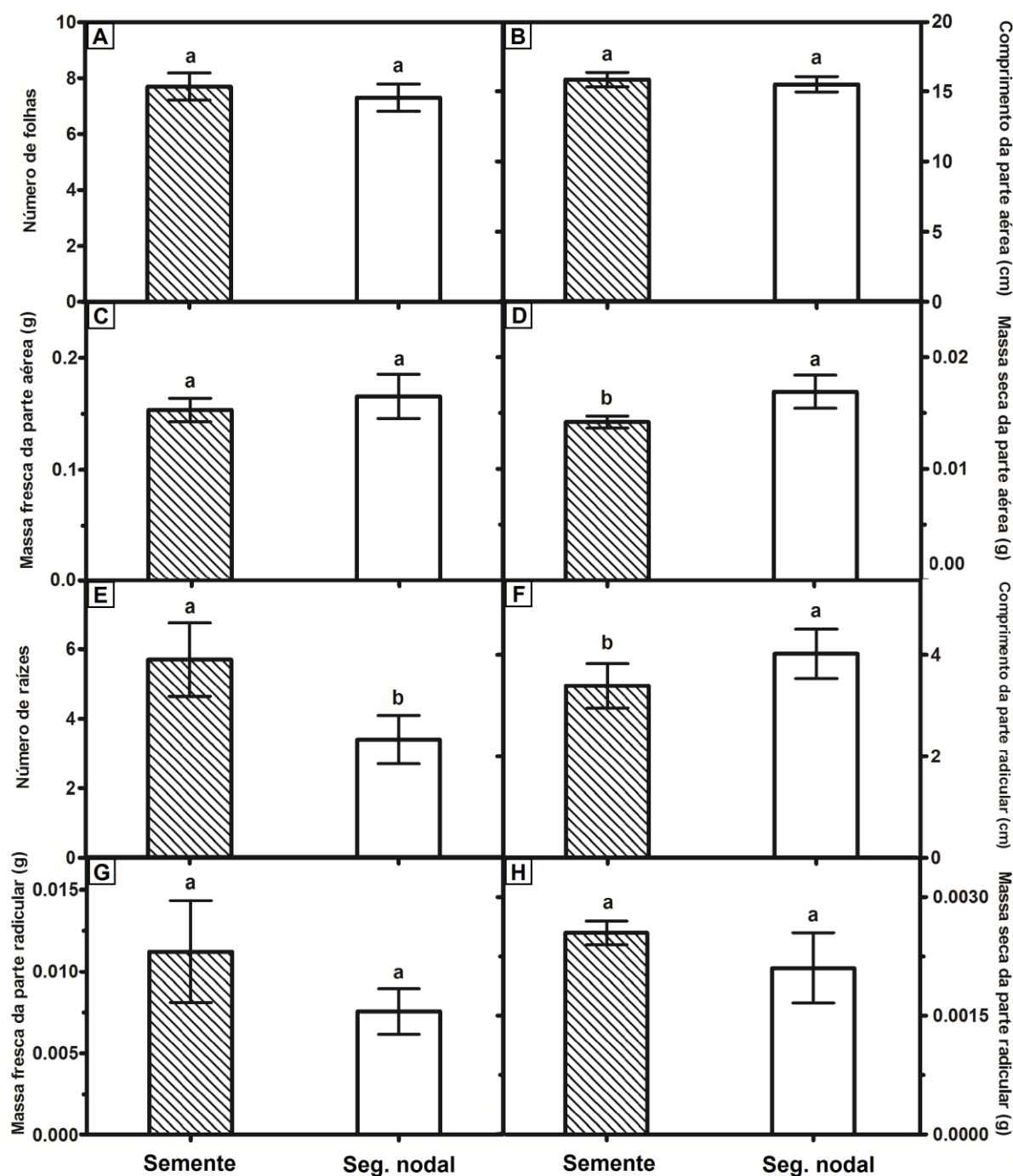


Figura 2: Parâmetros (biométricos e de massas) analisados da parte aérea e radicular das plantas de *A. comosus* var. *ananassoides* obtidas a partir de semente e de segmentos nodal, cultivadas *in vitro* por dois meses, em meio MS-1962 com 50% da concentração de macronutriente. A) número de folhas, B) comprimento da parte aérea (cm), C) quantidade de massa fresca (g) da parte aérea por planta, D) quantidade de massa seca (g) da parte aérea por planta, E) número de raízes, F) comprimento da parte radicular (cm), G) quantidade de massa fresca (g) da parte radicular por planta, H) quantidade de massa seca (g) da parte radicular por planta. Letras minúsculas distintas, acima de cada coluna, indicam diferença significativa em $P < 0,05$ de acordo com o teste de Tukey (ANOVA).

Para a variável pigmentos sintéticos, também não houve diferenças significativas entre as plantas das duas origens (Figura 3).

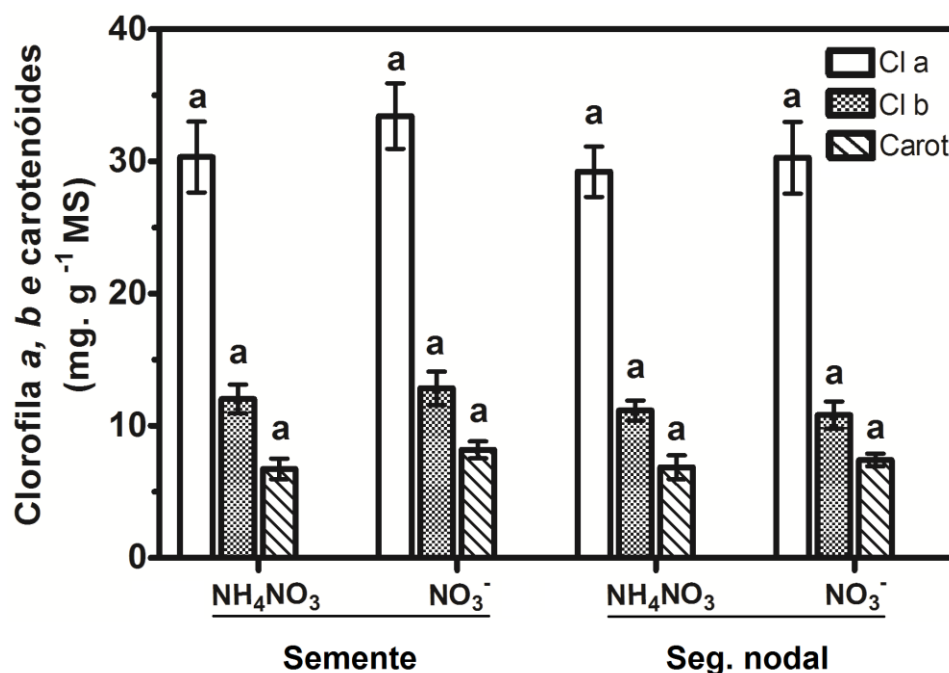


Figura 3: Conteúdo de pigmentos fotossintéticos (mg) (clorofila *a*, *b* e carotenoides) por grama de massa seca de *A. comosus* var. *ananassoides* cultivado *in vitro* por dois meses, em meio MS-1962 com 50% da concentração de macronutriente, obtido a partir de semente e de segmento nodal. A) Clorofilas *a* e *b*. B) Carotenoides. Letras minúsculas distintas, acima de cada coluna, indicam diferença significativa em $P < 0,05$ de acordo com o teste de Tukey (ANOVA, múltipla), que compara as médias de cada tratamento em relação a um tipo de pigmento (Clorofila *a* ou *b* ou carotenoides).

Embora existam muitos estudos sobre a micropropagação por meio de segmentos nodais com diversas espécies de plantas (Bertoni et al. 2006, Oliveira et al., 2007, Carvalho et al., 2009, Santos et al., 2010, Dias et al., 2011), poucos são os estudos que comparam o crescimento e desenvolvimento de plantas geradas a partir de embriões zigóticos com plantas de origem somática (Zimmermann, 1993). Todavia, os resultados avaliados nesta primeira parte do trabalho indicam que as plantas de ambas as origens apresentaram semelhanças na maioria dos parâmetros analisados.

3.2. Crescimento das plantas originadas de sementes e de segmentos nodais nas diferentes fontes de N

As plantas cultivadas por sete meses nas fontes de NO_3^- e NH_4NO_3 obtiveram 100% de sobrevivência, apresentando aspecto saudável em todos os tratamentos utilizados (Fig. 4).

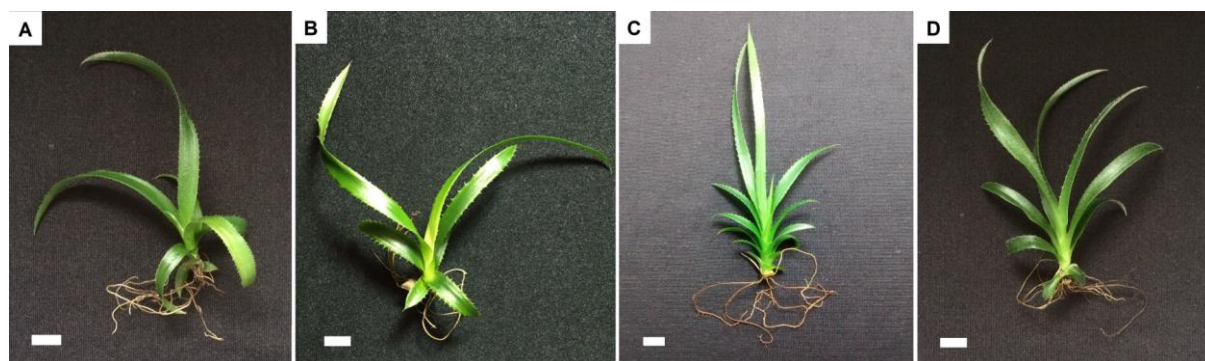


Figura 4: Aspecto geral das plantas de *Ananas comosus* var. *ananassoides* cultivadas *in vitro* por sete meses em MS-1962 modificado com as diferentes fontes (NO_3^- e NH_4NO_3) de N. A - planta obtida a partir de semente cultivada em NH_4NO_3 . B - planta obtida a partir de semente cultivada em NO_3^- . C - planta obtida a partir de segmento nodal cultivada em NH_4NO_3 . D - planta obtida a partir de segmento nodal cultivada em NO_3^- . Barra de escala corresponde a 1 cm. Foto: Priscila P. A. Silva.

Em relação à parte aérea para os parâmetros número de folhas e comprimento da parte aérea, as plantas de semente cultivadas em NH_4NO_3 apresentaram uma tendência de diminuição nos valores, em relação aos demais tratamentos (Fig. 5 - A, B). Quanto aos valores de massa fresca, as maiores médias foram alcançadas nas plantas obtidas de segmentos nodais nas duas fontes de N utilizadas (Fig. 5 - C). Todavia para massa seca, as plantas de ambas as origens obtiveram semelhantes resposta sobre a influência da forma de N (Fig. 5 - D), verificando o aumento da biomassa nas plantas crescidas na fonte de NO_3^- . No que se refere à parte radicular, não houve diferença significativa entre os tratamentos para a variável número de raízes (Fig. 5 - E). Contudo, as plantas geradas de segmentos nodais apresentaram os maiores comprimentos da parte radicular (Fig. 5 - F). Quanto aos parâmetros de massa fresca e seca da parte radicular, a mesma tendência de acúmulo de biomassa nas plantas cultivadas em NO_3^- foi mantida. (Fig. 5 - G, H).

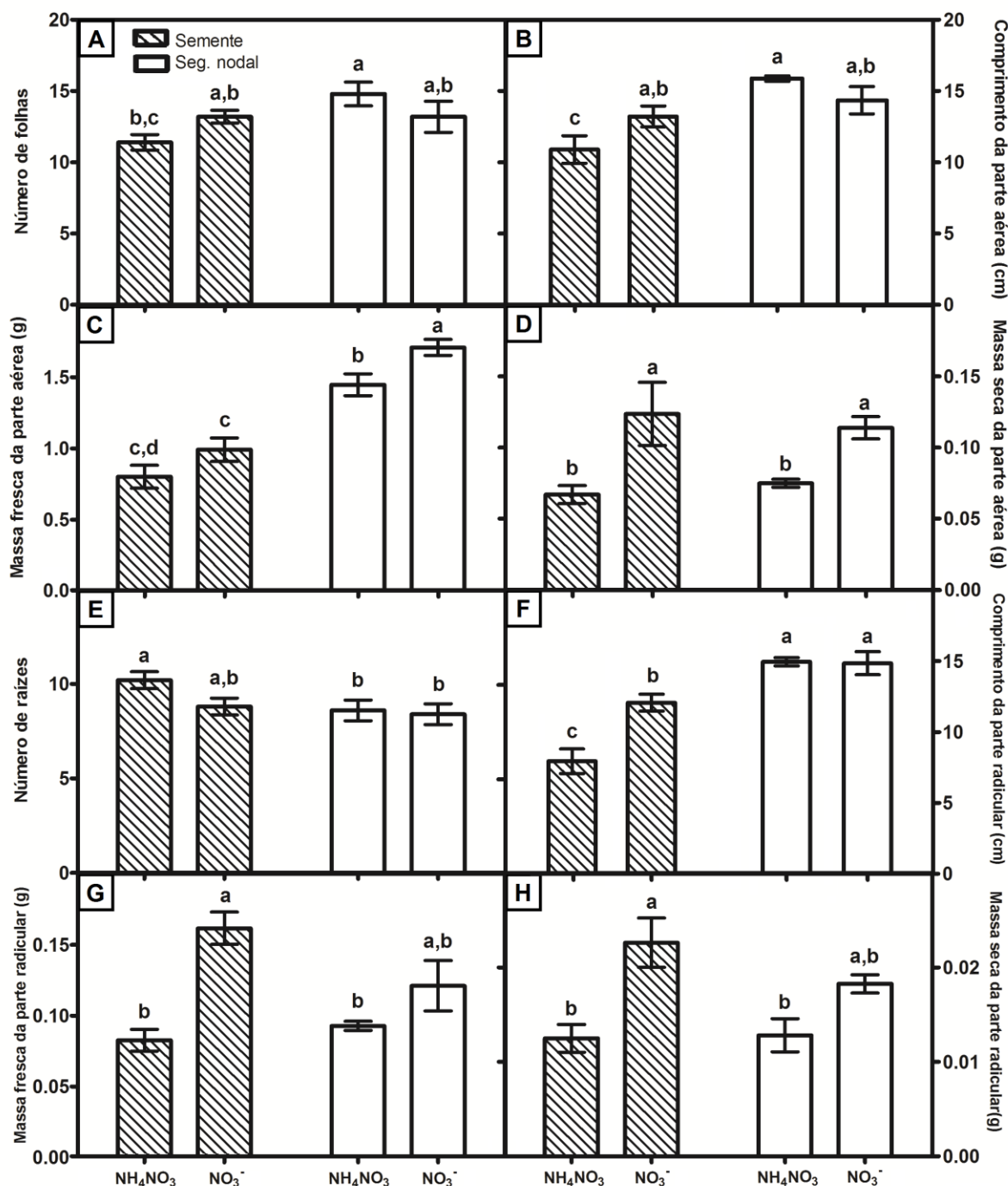


Figura 5: Parâmetros (biométricos e de massas) analisados da parte aérea e radicular de *A. comosus* var. *ananassoides* cultivado *in vitro* por sete meses, em meio MS-1962 modificado com as diferentes fontes (NO_3^- e NH_4NO_3) de N, obtido a partir de semente e segmento nodal. A) Número de folhas, B) comprimento da parte aérea (cm), C) quantidade de massa fresca (g) da parte aérea por planta, D) quantidade de massa seca (g) da parte aérea por planta, E) número de raízes, F) comprimento da parte radicular (cm), G) quantidade de massa fresca (g) da parte radicular por planta, H) quantidade de massa seca (g) da parte radicular por planta. Letras minúsculas distintas, acima de cada coluna, indicam diferença significativa em $P < 0,05$ de acordo com o teste de Tukey (ANOVA, múltipla).

Esse maior acúmulo de massa seca em plantas cultivadas com NO_3^- também foi observado por Silva et al., (capítulo 1) trabalhando com esta mesma espécie, assim como para *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms (Kurita, 2015) e para *Cucumis sativus* L. (Roosta e Schjoerring, 2007). Sabe-se que o NO_3^- é sinalizador primário que induz a síntese de citocininas, hormônios responsáveis pela multiplicação e desenvolvimento celular (Garnica et al., 2010, Andrews et al., 2013) sendo assim, é provável que o acúmulo de massa seca nesta plantas esteja relacionado com a maior disponibilidade de NO_3^- , implicando na produção desses hormônios que estão relacionados com o crescimento vegetal, tanto nas plantas geradas a partir de sementes quanto nas plantas de segmentos nodais.

Com relação ao conteúdo de pigmentos fotossintéticos, as plantas obtidas a partir de ambas as origens (zigótica e somática) também apresentaram maior acúmulo de pigmentos quando cultivadas na fonte de NH_4NO_3 , entretanto, as plantas originadas de segmentos nodais alcançaram a maior média (Fig. 6). Os íons NH_4^+ e NO_3^- são absorvidos pelas raízes das plantas por meio de transportadores de alta (HATS) e baixa (LATS) específicos para cada forma de inorgânica de N (Miller et al., 2007, Xu et al., 2012, Andrews et al., 2013). Depois da absorção ambos os íons podem ser assimilados ou transportados para outras partes das plantas ou ainda serem armazenados em vacúolos, todavia o acúmulo de NH_4^+ nos tecidos, pode ser tóxico para plantas, sendo este, preferencialmente, assimilado nas raízes (Skopelitis et al., 2006, Masclaux-Daubresse et al., 2010). Essa alta atividade de assimilação de NH_4^+ na parte radicular, demanda grandes quantidades de esqueletos de carbono, que são originados da assimilação de carbono na parte aérea da planta (Cramer and Lewis, 1993, Majerowicz e Kerbaudy, 2002, Xu et al. 2012).

Diante destes fatos, infere-se que a alta necessidade de esqueletos de carbono, para prontamente assimilar o NH_4^+ absorvido, implicaria em uma maior produção de pigmentos fotossintéticos nestas plantas, quando comparadas às de NO_3^- . Pois alguns autores sugerem que grande parte do NO_3^- absorvido não é imediatamente assimilado, sendo transportado pelo

xilema para parte aérea da planta onde será estocado no vacúolo para posterior utilização (Stitt et al., 2002, Miller et al., 2007). Todavia, essa possível resposta fisiológica, poderia ser uma vantagem para estas plantas, que quando transferidas para um ambiente sem o fornecimento de carbono, poderiam apresentar maiores taxas fotossintéticas implicando em um maior crescimento. Resultados semelhantes também foram observados por Silva et al. (Capítulo 1).

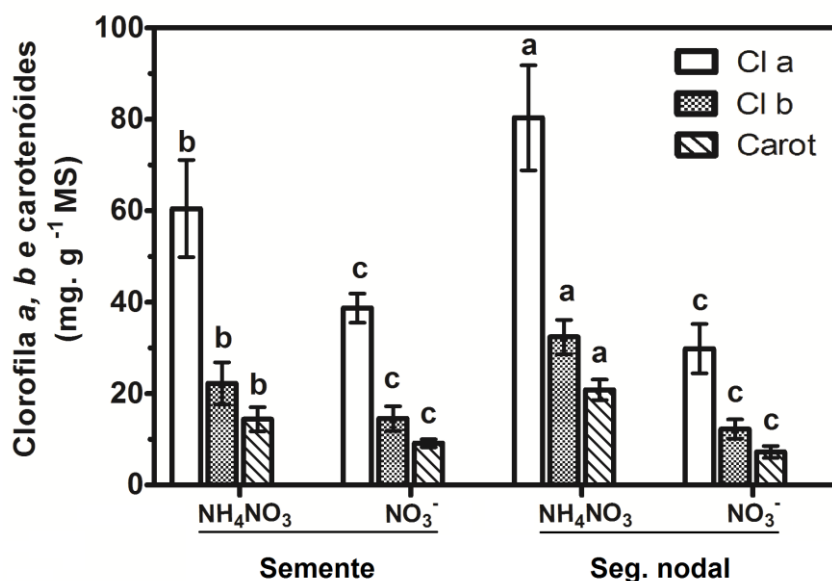


Figura 6: Conteúdo de pigmentos fotossintéticos (mg) (clorofila *a*, *b* e carotenoides) por grama de massa seca de *A. comosus* var. *ananassoides* cultivado *in vitro* por sete meses, em meio MS-1962 modificado com as diferentes fontes (NO₃⁻ e NH₄NO₃) de N, obtido a partir de semente e segmento nodal. A) Clorofilas *a* e *b*. B) Carotenoides. Letras minúsculas distintas, acima de cada coluna, indicam diferença significativa em $P < 0,05$ de acordo com o teste de Tukey (ANOVA, múltipla), que compara as médias de cada tratamento em relação a um tipo de pigmento (Clorofila *a* ou *b* ou carotenoides).

3.3. Assimilação de N na parte aérea de plantas obtidas a partir de sementes e segmentos nodais cultivadas *in vitro* em diferentes fontes de N

Para melhor análise dos resultados as comparações entre os tratamentos em todos os parâmetros avaliados (que serão descritos a seguir) foram realizadas no ponto de 48 horas após a transferência para novos meios com as mesmas concentrações, nas quais as plantas foram cultivadas anteriormente, todavia foram mantidos todos os pontos coletados nos gráficos para melhor visualização das respostas fisiológicas das plantas.

Em relação à **atividade da enzima nitrato redutase (ANR)** no **tempo inicial (TI)** os maiores valores significativos foram obtidos nas plantas de segmentos nodais em ambas as fontes de N, após 48 horas de transferência para novos meios (Fig. 7 - A). Todavia no **tempo final (TF)**, tanto as plantas obtidas a partir de sementes, quanto às de segmentos nodais, apresentaram maior atividade quando cultivadas na forma de NH_4NO_3 (Fig. 7 - B). Provavelmente, isso deve ter relação com o menor **conteúdo de nitrato endógeno (CNE)** apresentado nestas mesmas plantas (Fig. 7 - D). Quanto ao CNE no TI, não houve diferenças significativas entre os tratamentos, fato que já era esperado devido ao curto tempo de permanência destas plantas nesses tratamentos (Fig. 7 - C).

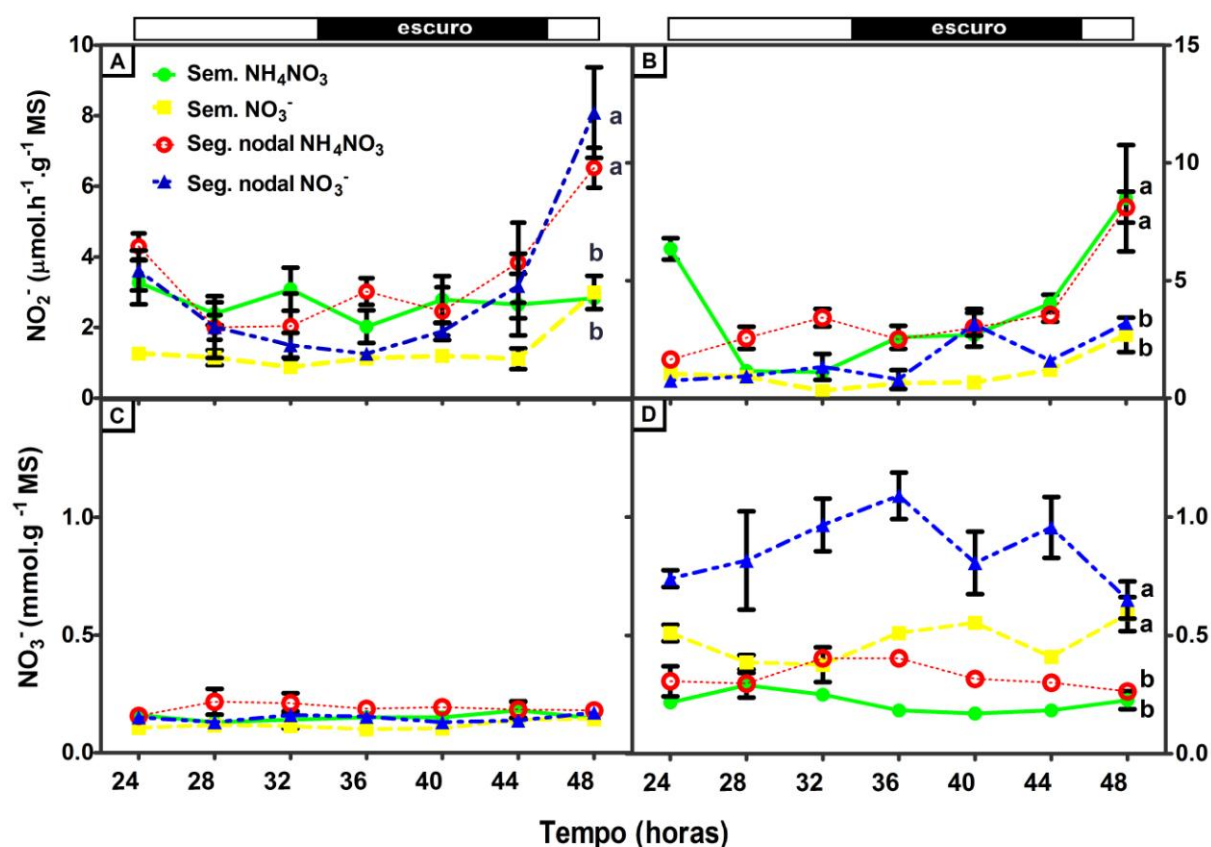


Figura 7: Atividade da enzima nitrato redutase (NR) (A, B) e conteúdo endógeno de NO_3^- (C, B) na parte aérea de *A. comosus* var. *ananassoides* em 24, 28, 32, 36, 40, 44 e 48 horas após a transferência para o meio MS-1962 modificado com a concentração de 60 mM de N nas formas de NO_3^- e NH_4NO_3 . A, C - Tempo Inicial (TI): plantas obtidas a partir de sementes e segmentos nodais crescidas em MS/2 por dois meses. B, D - Tempo final (TF): plantas obtidas a partir de sementes e segmentos nodais cultivadas por sete meses na concentração de 60

mM de N, nas formas de NO_3^- e NH_4NO_3 . Letras maiúsculas e minúsculas distintas ao lado de cada ponto, indicam diferença significativa em $P < 0,05$ de acordo com o teste de Tukey (ANOVA, múltipla). Letras maiúsculas comparam as médias em um único ponto de hora (48 horas) nos diferentes tratamentos utilizados.

Fazendo uma explanação sobre ARN no TI e no TF, nas plantas das duas origens, ao longo dos pontos coletados, observou-se que esta enzima apresentou uma tendência de maior atividade no começo do período luminoso (Fig. 7). Resultados semelhantes foram observados por Nievola e Mercier (2001) ao estudarem as variações diurnas da ANR em *Ananas comosus* (L. Merr.) micropropagadas a partir de segmentos nodais, observando que as folhas desta bromélia apresentaram maior atividade no período de luz, se comparados aos períodos de escuro.

Outros estudos também relataram maiores ARN durante o período luminoso (Lillo et al., 2001; Stitt et al., 2002, Yang e Midmore, 2005). Sabe-se que ARN é altamente responsiva à luz, todavia, fatores como: temperatura, citocininas, concentração de CO_2 , sacarose, ritmo circadiano, NO_3^- , entre outros, também podem influenciar a atividade desta enzima (Crawford, 1995, Masclaux-Daubresse, 2002, Freschi et al. 2009). Contudo, a maior ANR diurna está relacionada com a disponibilidade de ATP, provenientes da fotossíntese e também da respiração celular (Masclaux-Daubresse et al., 2010). Em relação ao CNE no TF, houve uma propensão no acúmulo de NO_3^- nos períodos noturnos na maioria dos tratamentos utilizados, coincidido com a baixa ANR nestes mesmos pontos, inferindo-se uma possível correlação.

No que se refere à **atividade da glutamina sintase (AGS)** no TI, as plantas exibiram atividades significativamente semelhantes nos diferentes tratamentos utilizados (Fig. 8 - A). Todavia no TF, tanto as plantas de sementes quanto às de segmentos nodais apresentaram maiores AGS em NH_4NO_3 quando comparadas às de NO_3^- (Fig. 8 - B). Diversos autores relatam que a principal via de assimilação do NH_4^+ é por meio das enzimas glutamina sintase (GS) e glutamato sintase (GS) (Lea e Mifflin, 2003, Bernard e Habash, 2009, Rennenberg et al.

2010, Xu et al., 2012). Além disso, como já foi mencionado anteriormente o NH_4^+ é potencialmente tóxico devendo ser rapidamente assimilado, o que poderia explicar as maiores AGS nas plantas de ambas as origens (embrionária e somática) cultivadas em NH_4NO_3 .

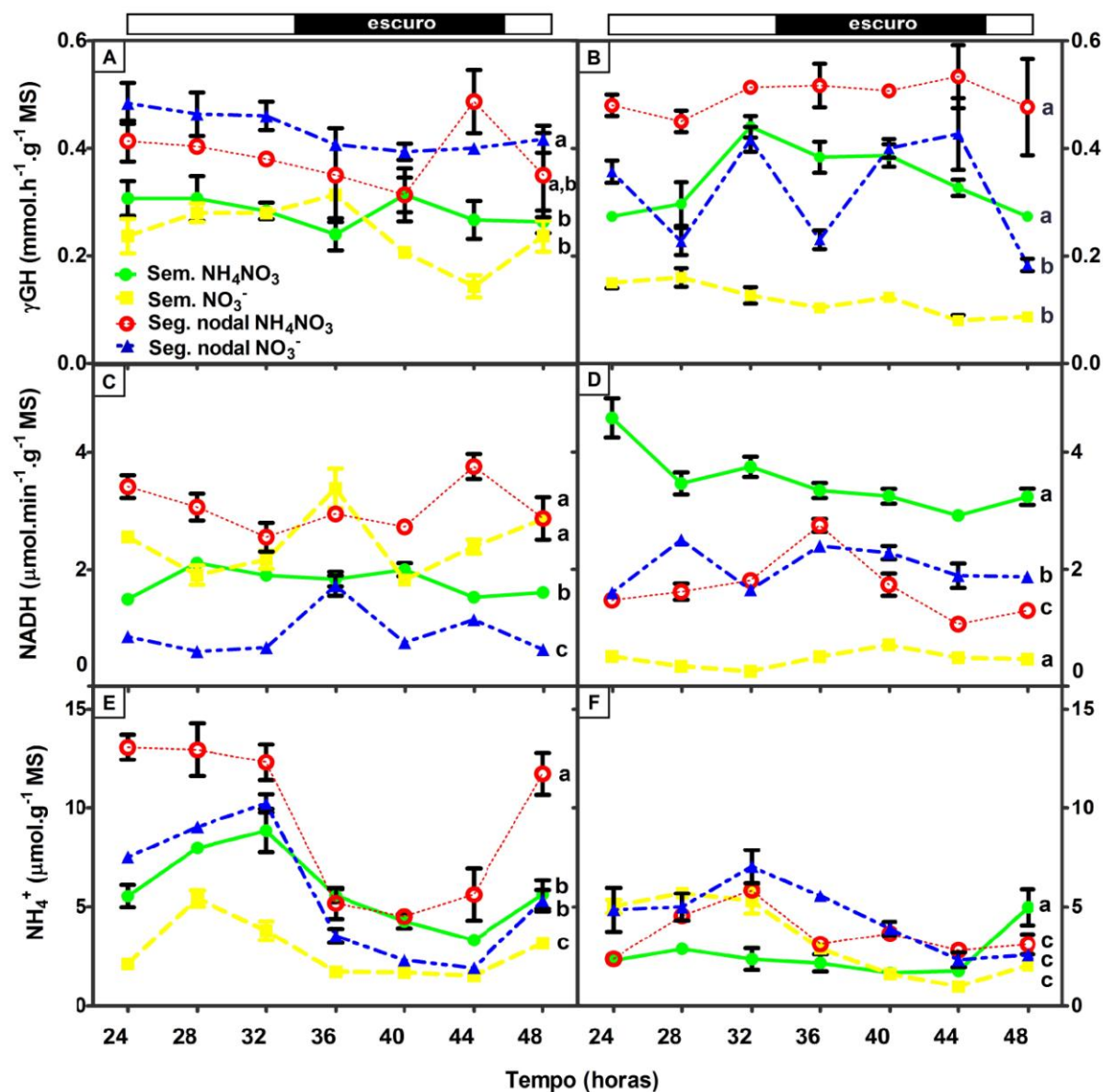


Figura 8: A, B) Atividade da glutamina sintase (GS), C, D) atividade da glutamato desidrogenase (GDH) e E, F) conteúdo endógeno de NH_4^+ na parte aérea de *A. comosus* var. *ananassoides* em 24, 28, 32, 36, 40, 44 e 48 horas após a transferência para o meio MS-1962 modificado com a concentração de 60 mM de N nas formas de NO_3^- e NH_4NO_3 . A, C - Tempo Inicial (TI): plantas obtidas a partir de sementes e segmentos nodais crescidas em MS/2 por dois meses. B, D - Tempo final (TF): plantas obtidas a partir de sementes e segmentos nodais cultivadas por sete meses na concentração de 60 mM de N, nas formas de NO_3^- e NH_4NO_3 . Letras maiúsculas e minúsculas distintas ao lado de cada ponto indicam diferença significativa em $P < 0,05$ de acordo com o teste de Tukey

(ANOVA, múltipla). Letras maiúsculas comparam as médias em um único ponto de hora (48 horas) nos diferentes tratamentos utilizados.

Observando os dados ao longo dos pontos coletados para maioria dos tratamentos no TF, foi verificado que esta enzima exibe oscilações ao longo do dia, apresentando uma tendência de aumento nos períodos em que ANR é menor. Já as plantas do TI não apresentaram esta tendência. Em relação à atividade da glutamato desidrogenase (AGDH) no TI, foi observado que as plantas de segmentos nodais obtiveram os maiores valores nas plantas cultivadas em NH_4NO_3 , o contrário do observado nas plantas de sementes que apresentaram maiores AGDH em NO_3^- . Todavia no TF, foi verificado o inverso, as plantas de sementes apresentaram as maiores AGDH quanto cultivadas em NH_4NO_3 , e as plantas de segmentos nodais apresentaram maiores AGDH quando cultivadas em NO_3^- .

Alguns estudos sugerem que a GDH pode contribuir na assimilação do NH_4^+ principalmente sob condições de estresse por excesso desse íon (Magalhães e Huber, 1991, Skopelitis et al., 2006, Li et al., 2011). Todavia existem autores que descrevem que a principal atividade catalítica desta enzima *in vivo* seja a desaminação do glutamato (Mifflin & Habash, 2002, Lea & Mifflin, 2003, Masclau-Daubresse et al., 2010). Avaliando o aspecto geral da AGDH ao longo dos pontos de horas coletados no TI, observou-se uma tendência de aumento nas plantas de segmentos nodais cultivadas em NH_4NO_3 , contudo no TF as plantas de sementes crescidas em amônio NH_4NO_3 apresentaram os maiores valores. Podendo se inferir que a maior AGDH nestas plantas seja no sentido de assimilar o NH_4^+ que foi fornecido pela troca para novos meios.

Quanto ao **conteúdo de amônio endógeno** (CAE) no TI, a maior média foi alcançada nas plantas de segmentos nodais cultivadas em NH_4NO_3 . Todavia no TF as plantas de sementes cultivadas em NH_4NO_3 , apresentaram a maior média. Contudo observando o ritmo dos valores do CAE ao longo do dia, é possível inferir-se que estes estão relacionados com a variação diurna ANR e AGS, visto que, os maiores valores CAE coincidem com os

maiores valores de ANR e se mantém até 8 horas depois e posteriormente com a diminuição da atividade desta enzima e o aumento da AGS ocorre uma tendência de diminuição no valores de CAE.

Em síntese, comparando os dados biométricos, de massas e de pigmentos fotossintéticos, foram observadas muitas semelhanças entre as plantas de origem somática e de origem zigótica antes da transferência para as diferentes fontes nitrogenadas. Todavia, após a transferência para os tratamentos as plantas de ambas as origens (somática e zigótica) apresentaram maior acúmulo de biomassa quando cultivadas em NO_3^- . No entanto as plantas de ambas as origens obtiveram os maiores conteúdos de pigmentos fotossintéticos, quando cultivadas em NH_4NO_3 . Em relação à ANR os maiores valores foram obtidos nas plantas de NH_4NO_3 , independe da origem, fato provavelmente relacionado com a menor quantidade de CNE apresentadas nestas plantas. Quanto à AGS os maiores valores foram apresentados nas plantas cultivadas em NH_4NO_3 tanto nas plantas originadas de sementes quanto as de segmentos nodais. No que se refere à AGDH e ao CAE as maiores medias foram apresentadas nas plantas de sementes cultivadas em NH_4NO_3 .

4. CONCLUSÃO

Ananas comosus var *ananassoides* obtidas de segmentos nodais e sementes podem apresentar resultados semelhantes sobre o crescimento e assimilação de N em 60 mM de NH_4NO_3 . e de NO_3^- por um período de sete meses.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudo concedida à Silva, P. P. A. (processo: 155255/2014-2).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, S. V. e Tamaki, V. 2016. In Vitro Growth of *Nidularium Minutum* Mez (Bromeliaceae) in Different Concentrations of Nitrogen , Phosphorus , Potassium , and Calcium. *Journal of Plant Nutrition* 1-34.
- Andrews, M., Raven, J. A. e Lea, P. J. Do plants need nitrate ? The mechanisms by which nitrogen form affects plants. *Annals of Applied Biology* 1-26.
- Araujo, Nathalia et al. 2012. Nutritional reserves in seeds of bromeliad species. *Communications in Plant Sciences* 2(3-4): 57-59.
- Bairu, M.W., Fennell, C.W. e van Staden, J. 2006. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in *Cavendish banana* (Musa AAA cv. ‘Zelig’). *Sci Hortic* 108: 347–351.
- Bairu, M.W., Aremu, A.O. e Staden, J.V. 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regul* 63: 147–173.
- Bernard, S. M. e Habash, D. Z. 2009. The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. *New Phytologist* 182: 608–620.
- Bertoni, B.W., Damião-Filho, C. F., Moro, J., Franca, S. e Pereria, A. 2006. Micropropagação de *Calendula officinalis* L. *Rev. Bras. Pl. Med.* 8(2):.48-54.
- Bullen, W. A. 1956. The isolation and characterization of glutamic dehydrogenase from corn leaves. *Archives Biochemistry and Biophysics* 62: 173-183.
- Bunn, Eric. et at. 2011 Biotechnology for saving rare and threatened florain a biodiversity hotspot. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 47(1) 188-200.
- Carvalho, A. C. P. P. et al. 2009. Multiplicação in vitro de abacaxi ornamental por estiolamento e regeneração de brotações. *Horticultura Brasileira* 27(1): 103-108.

- Carvalho, A. C. P. P. et al. 2012. *Estiolamento In Vitro de Plantas: Alternativa para a Produção de Mudas Micropropagadas de Abacaxizeiro Ornamental*. Embrapa Agroindústria Tropical: Circular Técnica 42, Fortaleza, p. 1-12.
- Cataldo, D. A. et al. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 6(1): 71-80.
- Cramer, M. D. e Lewis, O. A. M. 1993. The influence of nitrate and ammonium nutrition on the growth of wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) plants. *Ann Bot* 72: 359–365.
- Crawford, N. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *The Plant cell* 7: 859-868.
- Dias, G. de M. G. et al. 2008. Micropropagação de abacaxi ornamental (*Ananas comosus* var. *ananassoides*) por estiolamento e regeneração de plântulas. *Plant Cell Culture & Micropropagation* 4(1): 1-7.
- Dias, M. M. et al. 2011a. Reguladores de crescimento na propagação in vitro de abacaxizeiro ornamental. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* 6(3): 383-390.
- Dias, M. M. et al. 2011b. Concentrações de reguladores vegetais no estiolamento in vitro de ananás do campo. *Semina: Ciências Agrárias* 32(2): 513-520.
- Dias, M. M. et al. 2013. Concentrações de NPK no cultivo in vitro de abacaxizeiro ornamental. *Tecnologia & Ciência Agropecuária* 7(4): 1-6.
- Droste, A., Silva, A. M. e Matos A. V.; Alameida J. W. 2005. In vitro culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: two vulnerable bromeliads native to Southern Brazil. *Braz. Arch. Biol. Tech* 48: 717–722.
- Engelmann, F. 1991. In vitro conservation of tropical plant germplasm: a review. *Euphytica* 57: 227-243.

- Epstein, E. e Bloom, A. J. 2006. *Nutrição Mineral de Plantas: Princípios e Perspectivas*. 2 ed. Trad. Editora Planta.
- Fay, Michael F. 1994. In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservation? *Biodiversity and Conservation* 3(2): 176-183.
- Farnden, K.J.S. e Robertson, J.G. 1980. Methods for studying enzyme involved in metabolism related to nitrogenase. In: *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation* eds Bergsen, F. J., pp. 279-286. John Wiley & Sons Ltda.
- Fernández-Conde, M. E. Haba, P. e Maldonado, J. M. 1995. Rhythmic Variations of Ferredoxin-Glutamate Synthase Activity in Sunflower (*Helianthus annuus*) Leaves. *Journal of Plant Physiology*. 145: 682-685
- Freschi, L., Nievola, C. C., Rodrigues, M. A., Dominguesa, D. S., Van Sluysa, M-A e Mercier, H. 2009. Thermoperiod affects the diurnal cycle of nitrate reductase expression and activity in pineapple plants by modulating the endogenous levels of cytokinins. *Physiologia Plantarum* 137: 201–212.
- Garnica, M.; Houdusse, F.; Zamarreno, A. M. e Garcia-Mina, J. M. 2010. The signal effect of nitrate supply enhances active forms of cytokinins and indole acetic content and reduces abscisic acid in wheat plants grown with ammonium. *Journal of Plant Physiology* 167: 1264–1272.
- Geiger M, Walch-Liu P, Engels C, Harnecker J, Schulze ED, Ludewig F, Sonnewald U, Scheible WR, Stitt M. 1998. Enhanced carbon dioxide leads to a modified diurnal rhythm of nitrate reductase activity in older plants, and a large stimulation of nitrate reductase activity and higher levels of amino acids in young tobacco plants. *Plant, Cell and Environment* 21, 253–268.

- Grattapaglia, D. e Machado, M. A. 1998. Micropropagação. In: *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*, eds. Torres, A.C., Caldas, L.S., Buso, J. A. 1. ed. pp.183-260. Brasília: Embrapa- CNPH.
- Guerra, M. P., Torres, A. C. e Teixeira, J. B. 1998. Micropropagação. In: *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*, eds. Torres, A.C., Caldas, L.S., Buso, J. A. 1. ed. pp.533-568. Brasília: Embrapa- CNPH.
- Jain, S. M., Brar, D. S., Ahloowalia, B. S. 2013. *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement*. Springer Science & Business Media.
- Jaworski, E. 1971. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 43(6): 1274-1279.
- Joyce, S.M., Cassells, A.C. e Jain, M. 2003. Stress and aberrant phenotypes *in vitro* culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 103-121.
- Krishna, H. e Singh, D. 2013. Micropropagation of lasora (*Cordia myxa* Roxb.). *Indian J Horti* 70:323–327.
- Kurita, F. M. K., Machado, B. M., Teixeira, N.B., César, C. G. A., Nievola, C. C. e 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. e Tamaki, V. 2014. *In vitro* growth of bromeliad *Alcantarea imperialis* with different concentrations of nitrogen. *Acta Scientiarum. Biological Science* 26(3): 279-285.
- Kurita, F.M.K. 2015. Assimilation of different nitrogen sources in the induction of the mutiplication of bromeliad *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms cultivated *in vitro*. Masters Thesis. Institute of Botany - Secretary of the Environment of São Paulo State.

- Lea, P. J. e Mifflin, B.J. 2003. Glutamate synthase and the synthesis of glutamate in plants. *Plant Physiol Biochem* 41: 555–564.
- Li, B. et al. 2011. The differing responses of two *Arabidopsis* ecotypes to ammonium are modulated by the photoperiod regime. *Acta Physiol. Plant.* 33: 325–334.
- Lichtenthaler, H. K. e Buschmann, C. 2001. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* F4.3.1-F4.1–8.
- Lillo, C., Meyer, C. e Ruoff, P. 2001. The nitrate reductase circadian system. The central clock dogma contra multiple oscillatory feedback loops. *Plant Physiology* 125: 1554–1557.
- Magalhães, J. R. e Huber, D. M. 1991. Response of ammonium assimilation enzymes to nitrogen form treatments in different plant species. *Journal of Plant Nutrition* 14: 175-185.
- Majerowicz, N. e Kerbaudy, G. B. 2002. Effects of nitrogen forms on dry matter partitioning and nitrogen metabolism in two contrasting genotypes of *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae). *Environmental and Experimental Botany* 47, 249–258. Makino.
- Marschner, Horst e Marschner, Petra. 2012. *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. 3 ed. London: Academic Press.
- Masclaux-Daubresse, C.; Valadier, M.H.; Carayol, E.; Reisdorf-Cren, M. e Hirel, B. 2002. Diurnal changes in the expression of glutamate dehydrogenase and nitrate reductase are involved in the C/N balance of tobacco source leaves. *Plant Cell Environ.* 25: 1451-1462.
- Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L. e Suzuki, A. 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilisation in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany* 105: 1141–1158.

- McCullough, Helen. 1967. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clinica Chimica Acta* 17(2): 297-304.
- Melo, J. T.; Silva, J. A., Torres, R. A. DE A., Silveira, C.E. dos S. e Caldas, L.S. 1998. Coleta, propagação e desenvolvimento inicial de espécies do Cerrado. In: *Cerrado: ambiente e flora*. eds. Sano, S.M. e Almeida, S. P. de, pp. 195-243. Planaltina: EMBRAPA-CPAC.
- Mercier, H. e Kerbaudy, G. B. 1993. Micropropagation Of *Dyckia Macedoi* And Endangered Endemic Brazilian Bromeliad. *Botanical gardens micropropagation news* 1(6): 70-72.
- Mercier, H. e Kerbaudy, G. B. 1994. In Vitro Culture Of *Vriesea Hieroglyphica*, An Endangered Bromeliad From The Brazilian Atlantic Forest. *Journal of the bromeliad society* 44: 120-124.
- Mercier, H. e Kerbaudy, G. B. 1995. Importance Of Tissue Culture Technique For Conservation Of Endangered Brazilian Bromeliads From Atlantic Rain Forest Canopy. *Selbyana* 16: 147-149.
- Mercier, H. e Kerbaudy, G. B. 1996 Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). In: *Biotechnology in agriculture and forestry, high-tech and micropropagation* eds Bajaj Y. P. S. pp. 43-57. Berlim: Springer-Verlag.
- Mercier, H. e Nievola, C. C, 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.
- Mercier, H. e Nievola, C. C. 2003. Obtenção de bromélias *in vitro* como estratégia de preservação. *Vidalia* 1(1): 57-62.
- Mifflin, B. J. e 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.

- Miller, A. J., Fan, X., Orsel, M., Smith, S. J., e Wells, D. M. 2007. Nitrate transport and signalling *Journal of Experimental Botany* 58(9): 2297–2306.
- Murashige, T. e Skoog, F. 1962 A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3): 473-497.
- Munné-Bosch, S. e Lalueza, P. 2007. Age-related changes in oxidative stress markers and abscisic acid levels in a drought-tolerant shrub, *Cistus clusii* grown under Mediterranean field conditions. *Planta* 225: 1039–1049.
- Myers, N. et al. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Oliveira, M. K. T. de et al. 2007. Propagação in vitro da cultura do abacaxizeiro ornamental (*Ananas lucidus* Miller). *Caatinga* 20(3): 167-171.
- Orme, C. D. R. et al. 2005. Global *hotspots* of species richness are not congruent with endemism or threat. *Nature* 436(7053): 1016-1019.
- Paula, C. C. e Silva, H. M. 2004. *Peregrino do Cultivo prático de bromélias*. 3 ed. Viçosa: UFV.
- Pickens, K. A., Affolter, J. M. e Wetzstein H. Y. 2003 Enhanced seed germination and seedling growth of *Tillandsia eizii* in vitro. *HortScience* 38: 101–104.
- Pinhal, H. F., Anastácio, M. R., Carneiro, P. A. P, Silva, V. J. Morais, T. P e Luz, J. M. Q. 2011. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. *Ciência Rural* 41(7): 1136-1142.
- Proença, S. L. e SAJO, M. G. 2007. Anatomia foliar de bromélias ocorrentes em áreas de cerrado do Estado de São Paulo, Brasil. *Acta Botânica Brasílica* 21(3): 657-673.
- Rennenberg, H., Wildhagen, H. e Ehlting, B. 2010. Nitrogen nutrition of pop- lar trees. *Plant Biol* 12:275–291.
- Roosta, H. R. e Schjoerring, J.K. 2007. Effects of ammonium toxicity on nitrogen metabolism and elemental profile of cucumber plants. *J Plant Nutr* 30:1933–1951

- Santos, D. S., Tamaki, V. e Nievola, C. C. 2010. In vitro propagation of the ornamental bromeliad *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Klotzsch via nodal segments. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 46(6): 524-529.
- Sarasan, V. et al. 2006. Conservation *in vitro* of threatened plants: progress in the past decade. *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 42: 206-214.
- Skopelitis, D. S., Paranychianakis, N. V., Paschalidis, K. A., Pliakonis, E. D., Delis, I. D., Yakoumakis, D. I., Kouvarakis, A., Papadakis, A. K., Stephanou, E. G. e Roubelakis-Angelakis, K. A. 2006. Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. *Plant Cell* 18: 2767–2781.
- Souza, F. V. D. Et al. 2009 Micropropagação do abacaxizeiro e outras bromeliáceas. In: *Aspectos práticos da micropropagação de plantas* eds. Junghas, T. G. e Souza, A. S, pp. 177-205. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical.
- Souza, F. V. D. et al. 2012. O abacaxi ornamental. In: *Produção de flores de corte*. eds. Paiva, P. D. O. e Almeida, E. F. A. C., pp. 18-39 Lavras: UFLA.
- Stitt, M. et al. 2002. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *Journal Experimental Botany* 53(370): 959-970.
- Su, M.J., Schnitzer, J.A. e Faria, R.T. de. 2012. Polpa de banana e fertilizantes comerciais no cultivo in vitro de orquídea. *Científica* 40(1): 28–34.
- Suzuki, R.M. , Moreira, V.C., Nakabashi, M. e Ferreira, W. M. 2009. Estudo da germinação e crescimento *in vitro* de *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Chiron & V.P. Castro (Orchidaceae), uma espécie da flora brasileira ameaçada de extinção. *Hoehnea*: 36:657-666.

- Suzuki, R. M.; Almeida, V. de; Pescador, R. e Ferreira, W. de M. 2010. Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). *Hoehnea* 37(4): 731-742.
- Tamaki, V. et al. 2007a Cultivo *in vitro* de clones de *Ananas comosus* (L.) Merrill cultivar Smooth Cayene em diferentes concentrações de macronutrientes. *Hoehnea* 34(1): 67-73.
- Toledo-Aceves, T. e Wolf J. H. D. 2008. Germination and establishment of *Tillandsia eizii* (Bromeliaceae) in the canopy of an oak forest in Chiapas. Mexico. *Biotropica* 40: 246–250.
- Vieira, R. F. et al., 2006. Frutas nativas da região Centro-Oeste. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.
- Wang, K., Okumoto S., Zhang, X. e Ervin E. 2011. Circadian patterns of the major nitrogen metabolism-related enzymes and metabolites in creeping bentgrass and the influence of cytokinin and nitrate. *Crop Science* 51: 2145-2154.
- Weatherburn, M. W. 1967. Phenol-Hypochlorite Reaction for Determination of ammonia. *Analytical Chemistry* 39(8): 971-974.
- Werner, E. T. et al. 2010. Meios de cultura, reguladores de crescimento e fontes de nitrogênio na regulação da calogênese do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) *Acta Botânica Brasílica* 24(4): 1046-1051.
- Yang, Z. J. e Midmore, D. J. 2005. A model for the circadian oscillations in expression and activity of nitrate reductase in higher plants. *Ann Bot* 96: 1019–1026.
- Yoneyama, T. et al. 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(1): 133-139.

Xu, G., Fan, X. e Miller, A. J. 2012. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annual Review of Plant Biology* 63: 153–182.

Zimmermann, J. L. 1993. Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. *Plant Cell* 5(10): 1411–1423.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo teve como propósito elucidar questões em relação ao crescimento e a assimilação do nitrogênio para *Ananas comosus* var. *ananassoides*, visto a sua importância tanto econômica quanto ecológica, sendo assim, a primeira linha de pesquisa foi no sentido de estabelecer qual a melhor formulação nutritiva para o crescimento desta espécie, por meio do cultivo *in vitro* e posterior cultivo *ex vitro*, onde surgiu a primeira questão: qual seria a melhor fonte de nitrogênio (N) inorgânico para o crescimento desta bromélia? Uma vez que existem relatos sobre a preferência de algumas espécies por determinadas fontes inorgânicas de N (isoladas), e com isso revelou-se a segunda questão: como ocorre a assimilação na fonte de maior crescimento para as plantas desta espécie?

A partir destas duas questões foi construído o primeiro capítulo deste trabalho, cujos resultados indicaram uma tendência de maior crescimento *in vitro* nas plantas cultivadas em 60 mM tanto de NO_3^- quanto de NH_4NO_3 , todavia com a transferência para o ambiente *ex vitro* o maior crescimento foi apresentado nas plantas cultivadas nas maiores concentrações de NH_4NO_3 e principalmente em 60 mM de NH_4NO_3 , implicando em uma maior capacidade fotossintética quando *ex vitro*. Sendo assim, sugere-se o cultivo *in vitro* e *ex vitro* desta bromélia em 60 mM de NH_4NO_3 .

No que se refere à assimilação do nitrogênio, os resultados obtidos tornaram evidente que as fontes de N utilizadas influenciaram na atividade das enzimas associadas com a assimilação do N, mostrada pelo aumento da atividade da NR e GS na maioria dos tratamentos de NH_4NO_3 , possivelmente relacionado com o menor conteúdo de nitrato

endógeno nestas plantas. E também a elevada atividade das GDH nas plantas cultivada apenas em NH_4^+ , indicando um possível processo de senescência nestas plantas. Concluindo-se que a forma de N fornecida para espécie em estudo influencia as atividades das enzimas responsáveis pela assimilação do N.

Diversos estudos mencionados no decorrer deste trabalho verificaram que a propagação *in vitro* por meio segmento nodais é de grande relevância para produção mudas tanto para estudos com as plantas quanto para o mercado comercial. Todavia, quando o objetivo é reintrodução no ambiente natural, sugere-se a utilização de plantas obtidas a partir de semente, pois estas podem apresentar maior diversidade genética nos indivíduos gerados. Sendo assim, levantou-se a última questão do presente estudo: a assimilação do nitrogênio nas plantas de *A. comosus* var. *ananassoides* obtidas a partir de sementes e de segmentos nodais é diferente?

A partir desta última questão foi formado o segundo capítulo deste trabalho, cujos resultados indicaram semelhanças em muitos parâmetros analisados para as plantas nas duas origens utilizadas (zigótica e somática) em relação às fontes de N, como por exemplo, acúmulo de massa seca e conteúdo endógeno de NO_3^- nas plantas cultivadas em NO_3^- (de ambas as origens), o maior conteúdo de pigmentos fotossintéticos e atividade da NR e GS nas plantas cultivadas em NH_4NO_3 . Sendo assim, conclui-se que as plantas de *A. comosus* var. *ananassoides* de ambas as origens (zigótica e somática) apresentam resposta de crescimento e assimilação semelhantes quando cultivadas nas fontes de NO_3^- e de NH_4NO_3 .