

SABRINA VANESSA DE ANDRADE DOS SANTOS

**Nitrogênio, alta radiação fotossinteticamente  
ativa e UV-B na indução da coloração rubra na  
bromélia ornamental *Alcantarea imperialis*  
(Carrière) Harms**

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

SÃO PAULO

2018

SABRINA VANESSA DE ANDRADE DOS SANTOS

**Nitrogênio, alta radiação fotossinteticamente  
ativa e UV-B na indução da coloração rubra na  
bromélia ornamental *Alcantarea imperialis*  
(Carrière) Harms**

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

ORIENTADORA: DRA. VÍVIAN TAMAKI

CO-ORIENTADORA: DRA. SILVIA RIBEIRO DE SOUZA

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

Santos, Sabrina Vanessa de Andrade dos  
S237n Nitrogênio, alta radiação fotossinteticamente ativa e UV-B na indução da coloração rubra na bromélia ornamental *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms / Sabrina Vanessa de Andrade dos Santos -- São Paulo, 2018.  
126p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2018.  
Bibliografia.

1. Bromeliaceae. 2. Antocianinas. 3. Cultivo *in vitro*. I. Título

CDU: 582.564

*Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,  
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.*

*Chico Xavier*

***Dedico,***

*Aos meus filhos Lívia e Heitor.*

*Ao Fábio por seu amor, confiança e incentivo.*

*E aos meus pais Jô e Fábio por me apoiarem e me incentivarem a nunca desistir.*

## AGRADECIMENTOS

À Dra. Vívian Tamaki, minha orientadora, pelo incentivo, confiança e paciência. Agradeço por acreditar no meu trabalho e na minha capacidade. Sou muito grata por tudo que fez por mim ao longo desses 11 anos.

À Dra. Silvia Ribeiro de Souza, minha co-orientadora, pelo apoio durante a padronização do método para a análise de antocianinas em HPLC, assim como, por todos os outros esclarecimentos.

Ao Instituto de Botânica do Estado de São Paulo, por disponibilizar suas dependências para a realização do projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa de doutorado concedida, fundamental para a execução deste projeto.

Aos pesquisadores do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais, Dra. Catarina Carvalho Nievola por ter me ajudado em um momento de muita tensão e desespero, que foi o período que antecedeu a minha qualificação, Dr. Shoey Kanashiro que me ajudou com esclarecimentos e sugestões que contribuíram de forma significativa para execução do meu trabalho, Dra. Vanessa Rebouças pelas conversas e brincadeiras que alegravam os meus dias e Dr. Armando Reis Tavares pelas conversas e sugestões referentes a análises.

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais, Ivomar Aparecido Medina, pela ajuda em vários momentos ao longo desses quatro anos, pelas conversas e boas risadas durante o cafezinho, Sr. Hugo, sempre disposto a me ajudar nos trabalhos realizados no campo experimental e D. Lúcia pela ajuda no laboratório. Em especial, Jorge Luiz Marx Young, grande amigo, que sempre me ajudou muito, adubando e regando as plantas do campo experimental e alta PAR, coletando dados, monitorando as plantas do experimento UV (no momento em que eu mais precisei, durante minha licença maternidade). Nunca esquecerei o apoio desse grande amigo.

Aos amigos do Núcleo de Pesquisas em Plantas Ornamentais, Flávia, Camila, Priscila, Fernanda, Luciana, Letícia, Pamela, Danilo e Alessandro. Em especial à Luana Kelly Ramiro pela ajuda com a preparação dos meios de cultura e solução de adubação, assim como pela adubação das plantas aclimatizadas, a Victória de Carvalho pelas dicas relacionadas as análises enzimáticas, que foram fundamentais para a realização desta etapa do trabalho, e também, por nossas conversas e por sua paciência, em me ouvir, nos momentos em que o desespero vinha à tona, e a Gabriela M. C. Nascimento por me ajudar a usar o programa Sisvar, assim como pelas conversas e momentos de divertimento. Agradeço a todos pelos momentos agradáveis que passamos juntos e que nunca serão esquecidos.

Aos membros da minha banca de qualificação, Dr. Marcos Pereira Marinho Aidar, Dra. Luce Maria Brandão Torres e Dr. Rogério Mamoru Suzuki.

Agradeço em especial, Dr. Rogério, não só por ter aceito o convite para participar da minha qualificação, como também por ter colaborado com as minhas análises em espectrofotômetro, permitindo que eu utilizasse o aparelho na Ornamentais e a Dra. Luce pelos artigos relacionados a biossíntese de antocianinas e pelas dicas durante a padronização do método em HPLC.

À minha filha Lívia, menina linda e querida, que me acompanha ao Instituto de Botânica desde que nasceu. Por muitas vezes, ainda *pitiquinha* com menos de 3 meses, passou horas no Jardim Botânico com meus pais para que eu pudesse realizar as análises do projeto PIBIC sem comprometer suas mamadas, e após 10 anos foi minha companheira de laboratório em muitos finais de semana. Te amo meu amorzinho!

Aos meus pais queridos, pessoas maravilhosas que sempre me colocaram em primeiro lugar, deixando seus compromissos para que eu pudesse dar andamento nos meus... por cuidarem dos meus filhos com tanto amor e carinho. Por me acompanharem aos finais de semana para que eu não ficasse sozinha no laboratório, muitas vezes, me ajudando no que era possível. Não há palavras para expressar a gratidão que sinto por eles. Amo muito vocês!

Ao Fábio meu marido, que sempre me apoiou e me incentivou, mesmo quando eu passava sábados, domingos e feriados no laboratório e também pela ajuda com a manutenção das câmaras UV-B. Te amo meu amor!

E ao pequeno Heitor, que embora ainda não entenda, também contribuiu com este trabalho, se comportando como um príncipe durante a gestação, permitindo que a mamãe fosse para o laboratório até a manhã de seu nascimento. Te amo filho!

Muito obrigada a todos.

## RESUMO

*Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms é uma bromélia de grande porte com inflorescência vistosa muito utilizada em projetos paisagísticos. Quando cultivada *in vitro* sob diferentes concentrações de nitrogênio (N), suas folhas normalmente verdes apresentam coloração vermelha, assim como alguns indivíduos em ambiente natural. Essa coloração rubra, além de torná-la mais ornamental, indica a presença de antocianinas, pigmentos que podem ser sintetizados em resposta a estímulos ambientais, como luz, disponibilidade de nutrientes, temperatura e radiação UV. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi induzir o acúmulo de antocianinas em plantas de *A. imperialis* cultivadas *in vitro*, em diferentes fontes e concentrações de nitrogênio (N), na presença de alta radiação fotossinteticamente ativa (PAR) ou com radiação ultravioleta (UV-B), visando manter a coloração, com crescimento e desenvolvimento satisfatórios, durante a aclimatização para a produção de exemplares que possuam maior interesse econômico. Plantas obtidas a partir de sementes foram transferidas para três experimentos – cultivo *in vitro* em meio de Murashige & Skoog (MS) com modificações nas concentrações (3,75, 7,5 e 15 mM) e fontes nitrogenadas ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) e tratamento controle (TC – 60 mM de N) – cultivo *in vitro* em TC sob alta PAR ( $700 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) – cultivo em câmaras com diferentes intensidade de UV-B (4,7 11,8 e  $101,9 \text{ kJ.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ ) sob adubação com a mesma formulação do TC. Após 6 meses foram avaliados os parâmetros número de folhas e raízes, comprimento das partes aérea e radicular, massa das partes aérea e radicular, teores de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b* e carotenoides), antocianinas e as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione redutase (GR) e ascorbato peroxidase (APX). Plantas que acumularam antocianinas foram transferidas para casa de vegetação, onde permaneceram por 12 meses para acompanhamento da cor durante a aclimatização. Constatou-se que as plantas cultivadas *in vitro* nas concentrações 3,75 e 7,5 mM de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  foram as que mais acumularam antocianinas. A alta PAR não influenciou de forma significativa no acúmulo do pigmento, apenas 10% das plantas expostas apresentaram antocianinas foliares. As diferentes intensidades de UV-B também influenciaram no acúmulo do pigmento nos tratamentos 4,7 e  $101,9 \text{ kJ.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ . Foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) os glicosídeos de pelargonidina, cianidina e delphinidina em folhas de *A. imperialis*. As plantas que foram aclimatizadas mantiveram a coloração durante os 12 meses de acompanhamento, sendo que os maiores teores de antocianinas resultaram das plantas cultivadas sob adubação com  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Os resultados indicaram que o cultivo mais adequado para obtenção de plantas rubras de *A. imperialis* é o *in vitro* em meio MS com a concentração de 15 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , pois nesta concentração obteve-se plantas maiores durante a fase *in vitro* e maior acúmulo de antocianinas após a aclimatização.

Palavras-chave: Bromeliaceae, antocianinas, casa de vegetação, cianidina, cultivo *in vitro*, fontes de nitrogênio

## ABSTRACT

*Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms is a large bromeliad species with showy inflorescence widely used in landscape projects. When grown *in vitro* under different nitrogen (N) concentrations, its normally green leaves show red coloration, as well as some individuals in a natural environment. This red coloration, in addition to making it more ornamental, indicates the presence of anthocyanins, pigments that can be synthesized in response to environmental stimuli such as light, nutrient availability, temperature and UV radiation. Thus, the aim of this study to induce the accumulation of anthocyanins in *A. imperialis* plants cultivated *in vitro*, in different sources and concentrations of nitrogen (N), in high photosynthetically active radiation (PAR) or with ultraviolet radiation (UV-B), aiming to maintain the coloration, with satisfactory growth and development, during the acclimatization to produce specimens that have greater economic interest. Plants obtained from seeds were cultivated *in vitro* and transferred to three experiments - *in vitro* culture in Murashige & Skoog (MS) medium with varying concentrations (3.75, 7.5 and 15 mM) and nitrogen sources ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) and control treatment (TC – 60 mM N) - *in vitro* culture in TC under high PAR ( $700 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) - culture in different intensities UV-B chamber (7.4 11.8 and  $101.9 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ) under fertilization with the same TC formulation. After six months the parameters number of leaves and roots, length of aerial and radicular parts, mass of aerial and root parts, photosynthetic pigment contents (chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and carotenoids), anthocyanins and superoxide dismutase enzyme (SOD), catalase (CAT), glutathione reductase (GR) and ascorbate peroxidase (APX) were determined. Plants that accumulated anthocyanins were transferred to greenhouse, where they remained for 12 months to follow the color during acclimatization. Plants grown *in vitro* at 3.75 and 7.5 mM of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  were the most accumulated anthocyanins. The high PAR did not significantly influence the pigment accumulation, only 10% of the exposed plants showed anthocyanins in leaves. The different UV-B intensities also influenced the pigment accumulation in the treatments 4.7 and  $101.9 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ . High performance liquid chromatography (HPLC) identified pelargonidin, cyanidin and delphinidin glycosides on *A. imperialis* leaves. The plants that were acclimatized maintained color during the 12 months, and the highest levels of anthocyanins resulted from the plants cultivated under fertilization with  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . The results indicated that the most suitable cultivation to obtain *A. imperialis* red plants is the *in vitro* in MS medium with the concentration of 15 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , because in this concentration larger plants were obtained during the *in vitro* phase and greater accumulation of anthocyanins after acclimatization.

Keywords: Bromeliaceae, anthocyanins, greenhouse, cyanidin, *in vitro* culture, nitrogen sources

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido ascórbico
APX	Ascorbato peroxidase
CAT	Catalase
DAD	Detector de arranjo de díodos
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GR	Glutathione redutase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Ácido fosfórico
HPLC	High performance liquid chromatography (Cromatografia líquida de alta eficiência)
IAV	Inclusões antociânicas vasculares
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de potássio dibásico
MF	Massa fresca
MSE	Massa seca
N	Nitrogênio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NBT	Cloreto de tetrazólio-nitroazul
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Amônio
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Nitrato de amônio
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrato
OCH <sub>3</sub>	Metoxila
OH	Hidroxila
PAR	Photosynthetically active radiation (Radiação fotossinteticamente ativa)
PVPP	Polivinilpirrolidona
ROS	Reactive oxygen species (Espécies reativas de oxigênio)
SOD	Superóxido dismutase
SR	Sistema de reação
TC	Tratamento controle
TR	Tempo de retenção

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Coloração das principais antocianidinas e a posição dos grupos hidroxila (OH) e metoxila (OCH <sub>3</sub> ).....	09
<b>Tabela 2.</b> Quantidade de sais (g.L <sup>-1</sup> ) utilizados na formulação dos meios de cultura e concentrações de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .....	17
<b>Tabela 3.</b> Quantidade de sais (g.L <sup>-1</sup> ) utilizados na formulação dos meios de cultura e concentrações de amônio (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ).....	18
<b>Tabela 4.</b> Quantidade de sais (g.L <sup>-1</sup> ) utilizados na formulação dos meios de cultura e concentrações de NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....	18
<b>Tabela 5.</b> Intensidades de radiação UV-B (kJ.m <sup>-2</sup> .h <sup>-1</sup> ) utilizados nos diferentes tratamentos.....	18
<b>Tabela 6.</b> Quantificação das antocianinas identificadas em folhas de <i>Alcantarea imperialis</i> (Carrière) Harms cultivadas <i>in vitro</i> por 6 meses sob diferentes concentrações de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> e tratamento controle (TC).....	27
<b>Tabela 7.</b> Crescimento de plantas <i>Alcantarea imperialis</i> (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo <i>in vitro</i> em meio Murashige & Skoog (MS) modificado com diferentes concentrações de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> e tratamento controle (TC).....	30
<b>Tabela 8.</b> Pigmentos fotossintéticos foliares (clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> e carotenoides) em plantas de <i>Alcantarea imperialis</i> (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo <i>in vitro</i> em meio de cultura Murashige & Skoog (MS) com diferentes concentrações de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> e tratamento controle (TC).....	31
<b>Tabela 9.</b> Crescimento de plantas de <i>Alcantarea imperialis</i> (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo <i>in vitro</i> em meio Murashige & Skoog (MS) modificado com diferentes concentrações de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> e tratamento controle (TC).....	37
<b>Tabela 10.</b> Pigmentos fotossintéticos foliares (clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> e carotenoides) em plantas de <i>Alcantarea imperialis</i> (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo <i>in vitro</i> em meio Murashige & Skoog (MS) com diferentes concentrações de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> e tratamento controle (TC).....	38
<b>Tabela 11.</b> Quantificação das antocianinas identificadas em folhas de plantas <i>Alcantarea imperialis</i> (Carrière) Harms cultivadas <i>in vitro</i> por 6 meses sob diferentes concentrações de NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> e tratamento controle (TC).....	42
<b>Tabela 12.</b> Crescimento de plantas <i>Alcantarea imperialis</i> (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo <i>in vitro</i> em meio Murashige & Skoog (MS) modificado com diferentes concentrações de NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> e tratamento controle (TC). ....	44

<b>Tabela 13.</b> Pigmentos fotossintéticos foliares (clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> e carotenoides) em plantas de <i>Alcantarea imperialis</i> (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo <i>in vitro</i> em meio Murashige & Skoog (MS) com diferentes concentrações de NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> e tratamento controle (TC).....	45
<b>Tabela 14.</b> Quantificação das antocianinas identificadas em folhas de <i>Alcantarea imperialis</i> (Carrière) Harms cultivadas após 6 meses de cultivo <i>in vitro</i> sob alta PAR (700 μmol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> ) e controle (50 μmol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> ).....	50
<b>Tabela 15.</b> Crescimento de plantas <i>Alcantarea imperialis</i> (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo <i>in vitro</i> sob alta PAR (700 μmol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> ) e controle (50 μmol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> ).....	51
<b>Tabela 16.</b> Pigmentos fotossintéticos foliares (clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> e carotenoides) em plantas de <i>Alcantarea imperialis</i> (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo <i>in vitro</i> sob alta PAR (700 μmol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> ) e controle (50 μmol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> ).....	52
<b>Tabela 17.</b> Quantificação das antocianinas identificadas em folhas de <i>Alcantarea imperialis</i> (Carrière) Harms cultivadas em casa de vegetação por 12 meses sob diferentes concentrações de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> e tratamento controle (TC).....	59
<b>Tabela 18.</b> Crescimento de plantas <i>Alcantarea imperialis</i> (Carrière) Harms após 12 meses de cultivo em casa de vegetação sob adubação com diferentes concentrações NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> e tratamento controle (TC). ....	62
<b>Tabela 19.</b> Pigmentos fotossintéticos (clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> e carotenoides) foliares em plantas <i>Alcantarea imperialis</i> (Carrière) Harms após 12 meses de cultivo em casa de vegetação sob adubação com diferentes concentrações NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> e tratamento controle (TC). ....	63
<b>Tabela 20.</b> Quantificação das antocianinas identificadas em folhas de <i>Alcantarea imperialis</i> (Carrière) Harms cultivadas em casa de vegetação por 12 meses sob diferentes concentrações de NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> e tratamento controle (TC).....	67
<b>Tabela 21.</b> Crescimento de plantas <i>Alcantarea imperialis</i> (Carrière) Harms após 12 meses de cultivo em casa de vegetação sob adubação com diferentes concentrações de NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> e tratamento controle (TC).....	68
<b>Tabela 22.</b> Pigmentos fotossintéticos foliares (clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> e carotenoides) em plantas de <i>Alcantarea imperialis</i> (Carrière) Harms após 12 meses de cultivo em casa de vegetação sob adubação com diferentes concentrações de NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> e tratamento controle (TC).....	68
<b>Tabela 23.</b> Quantificação das antocianinas identificadas em folhas de <i>Alcantarea imperialis</i> (Carrière) Harms cultivadas por 6 meses em câmaras sob diferentes intensidades de radiação UV-B.....	75

**Tabela 24.** Crescimento de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo em câmaras sob diferentes intensidades de radiação UV-B.....77

**Tabela 25.** Pigmentos fotossintéticos foliares (clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides) em plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo em câmaras sob diferentes intensidades de radiação UV-B.....78

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** A) Exemplar adulto da espécie *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, B) Fruto aberto contendo sementes, C) Semente com apêndices plumosos, D) Sementes após processo de desinfestação em meio de cultura para germinação e E) Plântulas após 40 dias de germinação em meio de cultura.....05
- Figura 2.** Rota biossintética simplificada das antocianinas e as principais enzimas envolvidas. Fenilalanina amônia liase (PAL), chalcona 4-sintase (C4H), 4-coumaroil-CoA (4CL), chalcona sintase (CHS), chalcona isomerase (CHI), flavanona 3-hidroxilase (F3H), flavonoide 3-hidroxilase (F3'H), dihidroflavonol 4-redutase (DFR), flavonoide 3'5' hidroxilase (F3'5'H), antocianidina sintase (ANS), flavonoide 3-O-glucosiltransferase (UFGT). Modificado de Shi & Xie (2012).....07
- Figura 3.** Estrutura química das moléculas de A) Antocianidina e B) Antocianina.....08
- Figura 4.** Principais componentes do sistema antioxidante em plantas.  $\cdot\text{O}_2^-$  – radical superóxido,  $\text{H}_2\text{O}_2$  – peróxido de hidrogênio, SOD – superóxido dismutase,  $\text{O}_2$  – oxigênio molecular, CAT – catalase,  $\text{H}_2\text{O}$  – água, APX – ascorbato peroxidase, AsA – ácido ascórbico/ascorbato; MDHA – monodehidroascorbato, MDHAR – MDHA redutase, DHA – dehidroascorbato, DHAR – DHA redutase, GR – glutationa redutase, GSH – glutationa reduzida; GSSG – glutationa oxidada. Adaptado de Buchanan *et al.* (2015).....13
- Figura 5.** Fluxograma do experimento.....20
- Figura 6.** Perfil cromatográfico dos padrões analíticos A) Cloreto de pelargonidina, B) Cloreto de cianidina e C) Cloreto de delphinidina.....23
- Figura 7.** Presença de antocianinas em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo *in vitro* no meio Murashige & Skoog (MS) com diferentes concentrações de  $\text{NO}_3^-$ . A) Planta controle (TC), B) 3,75 mM de  $\text{NO}_3^-$ , C) 7,50 mM de  $\text{NO}_3^-$  e D) 15,00 mM de  $\text{NO}_3^-$ . Barra = 1 cm.....26
- Figura 8.** Cromatogramas de antocianinas em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo *in vitro* em meio de cultura Murashige & Skoog (MS) com diferentes concentrações de  $\text{NO}_3^-$ . A) Tratamento controle (TC), B) 3,75 mM  $\text{NO}_3^-$ , C) 7,50 mM  $\text{NO}_3^-$  e D) 15,00 mM  $\text{NO}_3^-$ . Números indicam a quantidade de picos e presença de antocianinas. \*glicosídeo de pelargonidina (pico 1), \*\*glicosídeo de cianidina (pico 2) e \*\*\*glicosídeo de delphinidina (pico 4).....28
- Figura 9.** Teores de amônio e nitrato ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$ ) em folhas de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo *in vitro* em meio de cultura Murashige & Skoog (MS) com diferentes concentrações de  $\text{NO}_3^-$  e TC. Letras distintas indicam diferenças significativas dentro de uma mesma variável de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....32

**Figura 10.** Atividade das enzimas antioxidantes em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo *in vitro* em meio de cultura Murashige & Skoog (MS) com diferentes concentrações de  $\text{NO}_3^-$ . A) Catalase (CAT), B) Ascorbato peroxidase (APX), C) Glutaciona redutase (GR) e D) Superóxido dismutase (SOD). Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....33

**Figura 11.** Plantas de *Alcantarea imperialis* após 6 meses de cultivo *in vitro* em meio Murashige & Skoog (MS) com diferentes concentrações de  $\text{NH}_4^+$ . A) Planta controle (TC), B) 3,75 mM de  $\text{NH}_4^+$ , C) 7,50 mM de  $\text{NH}_4^+$  e D) 15,00 mM de  $\text{NH}_4^+$ . Barra = 1 cm.....34

**Figura 12.** Cromatogramas de antocianinas em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo *in vitro* em meio de cultura Murashige & Skoog (MS) com diferentes concentrações de  $\text{NH}_4^+$ . A) 3,75 mM de  $\text{NH}_4^+$ , B) 7,50 mM de  $\text{NH}_4^+$  e C) 15,00 mM de  $\text{NH}_4^+$ .....35

**Figura 13.** Teores de amônio e nitrato ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$ ) em folhas de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo *in vitro* em meio de cultura Murashige & Skoog (MS) com diferentes concentrações de  $\text{NH}_4^+$  e TC. \* Não houve acúmulo. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....39

**Figura 14.** Atividade das enzimas antioxidantes em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo *in vitro* em meio de cultura Murashige & Skoog (MS) com diferentes concentrações de  $\text{NH}_4^+$ . A) Catalase (CAT), B) Ascorbato peroxidase (APX), C) Glutaciona redutase (GR) e D) Superóxido dismutase (SOD). Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....40

**Figura 15.** Presença de antocianinas em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo *in vitro* em meio Murashige & Skoog (MS) com diferentes concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . A) Planta controle (TC), B) 3,75 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , C) 7,50 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e D) 15,00 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Barra = 1 cm.....41

**Figura 16.** Cromatogramas de antocianinas em folhas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo *in vitro* em meio de cultura Murashige & Skoog (MS) com diferentes concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . A) Tratamento controle (TC), B) 3,75 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , C) 7,50 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e D) 15,00 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Números indicam a quantidade de picos e presença de antocianinas. \*glicosídeo de pelargonidina (pico 2) \*\*glicosídeo de cianidina (pico 4) e \*\*\*glicosídeo de delphinidina (pico 6).....43

**Figura 17.** Teores de amônio e nitrato ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$ ) em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo *in vitro* em meio de cultura Murashige & Skoog (MS) com diferentes concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e TC. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....46

<b>Figura 18.</b> Atividade das enzimas antioxidantes em folhas de <i>Alcantarea imperialis</i> (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo <i>in vitro</i> em meio de cultura Murashige & Skoog (MS) com diferentes concentrações de $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . A) Catalase (CAT), B) Ascorbato peroxidase (APX), C) Glutaciona redutase (GR) e D) Superóxido dismutase (SOD). Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	47
<b>Figura 19.</b> Plantas de <i>Alcantarea imperialis</i> (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo <i>in vitro</i> sob alta PAR ( $700 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Barra = 1 cm.....	48
<b>Figura 20.</b> Cromatograma de antocianinas em folhas de <i>Alcantarea imperialis</i> (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo <i>in vitro</i> sob alta PAR ( $700 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). A) Plantas controle ( $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), B) Plantas verdes - alta PAR e C) Plantas rubras - alta PAR.....	49
<b>Figura 21.</b> Teores de amônio e nitrato ( $\mu\text{g.g}^{-1}\text{MF}$ ) em folhas de <i>Alcantarea imperialis</i> (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo <i>in vitro</i> sob alta PAR ( $700 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) e controle ( $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	53
<b>Figura 22.</b> Atividade das enzimas antioxidantes em folhas de <i>Alcantarea imperialis</i> (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo <i>in vitro</i> sob alta PAR ( $700 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) e controle ( $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). A) Catalase (CAT), B) Ascorbato peroxidase (APX), C) Glutaciona redutase (GR) e D) Superóxido dismutase (SOD). Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	54
<b>Figura 23.</b> Antocianinas foliares identificadas em folhas de plantas <i>Alcantarea imperialis</i> (Carrière) Harms cultivadas <i>in vitro</i> por 6 meses nos experimentos com diferentes fontes nitrogenadas ( $\text{NO}_3^-$ e $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) e radiação fotossinteticamente ativa (PAR). Letras distintas indicam diferenças significativas dentro de uma mesma variável de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). *Plantas não acumularam antocianinas.....	55
<b>Figura 24.</b> Pigmentos fotossintéticos (clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> e carotenoides) em folhas de plantas <i>Alcantarea imperialis</i> (Carrière) Harms cultivadas <i>in vitro</i> por 6 meses nos experimentos com diferentes fontes nitrogenadas ( $\text{NO}_3^-$ , $\text{NH}_4^+$ e $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) e radiação fotossinteticamente ativa (PAR). Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	56
<b>Figura 25.</b> Comprimento foliar (cm), massa seca da parte aérea e radicular ( $\text{mg.g}^{-1}\text{MS}$ ) de plantas <i>Alcantarea imperialis</i> (Carrière) Harms cultivadas <i>in vitro</i> por 6 meses nos experimentos com diferentes fontes nitrogenadas ( $\text{NO}_3^-$ , $\text{NH}_4^+$ e $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) e radiação fotossinteticamente ativa (PAR). Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). MSPA = massa seca da parte aérea; MSR = massa seca da raiz.....	57

**Figura 26.** Presença de antocianinas em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 12 meses de cultivo em casa de vegetação sob adubação com diferentes concentrações  $\text{NO}_3^-$ . A) 3,75 mM de  $\text{NO}_3^-$ , B) 7,50 mM de  $\text{NO}_3^-$ , C) 15,00 mM de  $\text{NO}_3^-$  e D) Planta controle (TC). Barra = 10 cm.....58

**Figura 27.** Cromatogramas de antocianinas em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 12 meses de cultivo em casa de vegetação sob adubação com diferentes concentrações de  $\text{NO}_3^-$ . A) Tratamento controle, B) 3,75 mM de  $\text{NO}_3^-$ , C) 7,50 mM de  $\text{NO}_3^-$  e D) 15,00 mM de  $\text{NO}_3^-$ . Números indicam quantidade de picos e presença de glicosídeos de \*pelargonidina (pico 1), \*\*cianidina (pico 2) e \*\*\*delfinidina (pico 4). Setas indicam a presença de novas antocianinas após a aclimatização.....61

**Figura 28.** Teores de amônio e nitrato ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$ ) em folhas de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 12 meses de cultivo em casa de vegetação sob adubação com diferentes concentrações de  $\text{NO}_3$ . Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....64

**Figura 29.** Atividade das enzimas antioxidantes em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 12 meses de cultivo em casa de vegetação sob adubação com diferentes concentrações de  $\text{NO}_3$ . A) Catalase (CAT), B) Ascorbato peroxidase (APX), C) Glutaciona redutase (GR) e D) Superóxido dismutase (SOD). Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....64

**Figura 30.** Presença de antocianinas em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 12 meses de cultivo em casa de vegetação sob adubação com diferentes concentrações  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . A) 3,75 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , B) 7,50 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , C) 15,00 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e D) Planta controle (TC). Barra = 10 cm.....65

**Figura 31.** Cromatogramas de antocianinas em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 12 meses de cultivo em casa de vegetação sob adubação com diferentes concentrações de  $\text{NO}_3^-$ . A) Tratamento controle, B) 3,75 mM de  $\text{NO}_3^-$ , C) 7,50 mM de  $\text{NO}_3^-$  e D) 15,00 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Números indicam quantidade de picos e presença de glicosídeos de \*pelargonidina (pico 2), \*\*cianidina (pico 4) e \*\*\*delfinidina (pico 6).....66

**Figura 32.** Conteúdo endógeno de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$ ) em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 12 meses de cultivo em casa de vegetação sob adubação com diferentes concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....69

**Figura 33.** Atividade das enzimas antioxidantes em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 12 meses de cultivo em casa de vegetação sob adubação com diferentes concentrações de  $\text{NO}_3$ . A) Catalase (CAT), B) Ascorbato peroxidase (APX), C) Glutaciona redutase (GR) e D) Superóxido dismutase (SOD). Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....70

**Figura 34.** Teores de antocianinas totais (pelargonidina, cianidina e delphinidina) em folhas de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms aclimatizadas e cultivadas em casa de vegetação por 12 meses nos experimentos com diferentes fontes nitrogenadas ( $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ). Letras distintas indicam diferenças significativas entre as variáveis de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....72

**Figura 35.** Antocianinas foliares identificadas em folhas de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms aclimatizadas e cultivadas em casa de vegetação por 12 meses nos experimentos com diferentes fontes nitrogenadas ( $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ). Letras distintas indicam diferenças significativas entre as variáveis de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....72

**Figura 36.** Pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides) em folhas de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms aclimatizadas e cultivadas em casa de vegetação por 12 meses nos experimentos com diferentes fontes nitrogenadas ( $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ). Letras distintas indicam diferenças significativas entre as variáveis de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....73

**Figura 37.** Comprimento foliar (cm), massa seca da parte aérea e radicular (mg.g-1MS)) de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms cultivadas in vitro por 6 meses nos experimentos com diferentes fontes nitrogenadas ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) e radiação fotossinteticamente ativa (PAR). Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). MSPA = massa seca da parte aérea; MSR = massa seca da raiz.....74

**Figura 38.** Plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms mantidas no tratamento UV+ indicando a presença de antocianinas. A) Planta após 2 meses de cultivo e B) Planta após 6 meses de cultivo.....75

**Figura 39.** Cromatogramas de antocianinas em plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo sob diferentes intensidades de radiação UV-B. A) UV ambiente ( $11,8 \text{ kJ.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ ), B) UV- ( $4,7 \text{ kJ.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ ) e C) UV+ ( $101,9 \text{ kJ.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ ).....76

**Figura 40.** Plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms mantidas no experimento UV-B durante predação. Setas e círculos indicam presença de lagartas de lepidópteros. Barras = 1 cm.....77

**Figura 41.** Conteúdo endógeno de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms cultivadas por 6 meses em câmaras sob diferentes intensidades de radiação UV-B. Tratamentos: UV- ( $4,7 \text{ kJ.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ ), UV ambiente ( $11,8 \text{ kJ.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ ) e UV+ ( $101,9 \text{ kJ.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ ). Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....79

**Figura 42.** Atividade das enzimas antioxidantes em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo em câmaras sob diferentes intensidades de radiação UV-B. A) Catalase (CAT), B) Ascorbato peroxidase (APX), C) Glutaciona redutase (GR) e D) Superóxido dismutase (SOD). Tratamentos: UV- ( $4,7 \text{ kJ.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ ), UV ambiente ( $11,8 \text{ kJ.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ ) e UV+ ( $101,9 \text{ kJ.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ ). Letras distintas indicam diferenças significativas entre os

tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....80

# SUMÁRIO

RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	II
LISTA DE ABREVIATURAS.....	III
LISTA DE TABELAS.....	IV
LISTA DE FIGURAS.....	VII
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Bromeliaceae.....	01
1.2. Propagação <i>in vitro</i> .....	02
1.3. <i>Alcantarea imperialis</i> (Carrière) Harms.....	03
1.4. Antocianinas (ACNs).....	06
1.5. Fatores relacionados a biossíntese de antocianinas.....	10
1.5.1. Nitrogênio (N).....	10
1.5.2. Radiação fotossinteticamente ativa (PAR).....	11
1.5.3. Radiação ultravioleta-B (UV-B).....	12
1.5.4. Espécies reativas de oxigênio (ROS).....	12
2. OBJETIVO.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Material vegetal.....	16
3.2. Obtenção de plântulas <i>in vitro</i> .....	16
3.3. Tratamentos.....	16
3.3.1. Crescimento <i>in vitro</i> em diferentes fontes e concentrações de N.....	16
3.3.2. Crescimento <i>in vitro</i> sob alta PAR.....	18
3.3.3. Aclimatização das plantas rubras obtidas no cultivo <i>in vitro</i> .....	19
3.3.4. Crescimento <i>ex vitro</i> sob diferentes intensidades de radiação UV-B.....	19
3.4. Delineamento experimental.....	20
3.5. Medidas biométricas e de biomassa.....	21
3.6. Pigmentos fotossintéticos.....	21
3.7. Antocianinas.....	22

3.8. Determinação de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) foliar.....	23
3.9. Atividade de enzimas antioxidantes.....	24
3.10. Análises.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1. Cultivo <i>in vitro</i> .....	26
4.1.1. Plantas cultivadas em diferentes concentrações de $\text{NO}_3^-$ .....	26
4.1.1.1. Antocianinas.....	26
4.1.1.2. Biometria e biomassa.....	28
4.1.1.3. Pigmentos fotossintéticos.....	30
4.1.1.4. Nitrato e amônio foliar.....	31
4.1.1.5. Enzimas antioxidantes.....	32
4.1.2. Plantas cultivadas em diferentes concentrações de $\text{NH}_4^+$ .....	34
4.1.2.1. Antocianinas.....	34
4.1.2.2. Biometria e biomassa.....	35
4.1.2.3. Pigmentos fotossintéticos.....	37
4.1.2.4. Nitrato e amônio foliar.....	38
4.1.2.5. Enzimas antioxidantes.....	39
4.1.3. Plantas cultivadas em diferentes concentrações de $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .....	41
4.1.3.1. Antocianinas.....	41
4.1.3.2. Biometria e biomassa.....	43
4.1.3.3. Pigmentos fotossintéticos.....	44
4.1.3.4. Nitrato e amônio foliar.....	45
4.1.3.5. Enzimas antioxidantes.....	46
4.1.4. Cultivo <i>in vitro</i> sob alta PAR.....	48
4.1.4.1. Antocianinas.....	48
4.1.4.2. Biometria e biomassa.....	50
4.1.4.3. Pigmentos fotossintéticos.....	51
4.1.4.4. Nitrato e amônio foliar.....	52
4.1.4.5. Enzimas antioxidantes.....	53

4.1.5. Comparativo dos resultados obtidos no cultivo <i>in vitro</i> .....	55
4.2. Aclimatização das plantas rubras obtidas no cultivo <i>in vitro</i> .....	58
4.2.1. Plantas cultivadas com NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .....	58
4.2.1.1. Antocianinas.....	58
4.2.1.2. Biometria e biomassa.....	61
4.2.1.3. Pigmentos fotossintéticos.....	62
4.2.1.4. Nitrato e amônio foliar.....	63
4.2.1.5. Enzimas antioxidantes.....	64
4.2.2. Plantas cultivadas com NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....	65
4.2.2.1. Antocianinas.....	65
4.2.2.2. Biometria e biomassa.....	67
4.2.2.3. Pigmentos fotossintéticos.....	68
4.2.2.4. Nitrato e amônio foliar.....	69
4.2.2.5. Enzimas antioxidantes.....	70
4.2.3. Comparativo dos resultados obtidos na aclimatização das plantas rubras	72
4.3. Plantas cultivadas sob diferentes intensidades de radiação UV-B.....	75
4.3.1. Antocianinas.....	75
4.3.2. Biometria e biomassa.....	77
4.3.3. Pigmentos fotossintéticos.....	78
4.3.4. Nitrato e amônio foliar.....	79
4.3.5. Enzimas antioxidantes.....	80
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	81
CONCLUSÃO.....	84
REFERÊNCIAS.....	85
ANEXOS.....	98

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Bromeliaceae

Bromeliaceae é uma das famílias com maior diversidade de plantas em regiões tropicais, apresentando 58 gêneros e aproximadamente 3.352 espécies (Luther 2012, Versieux & Wanderley 2015) que estão distribuídas em oito subfamílias: Piticarnioideae, Bromelioideae, Tillandsioideae, Puyoideae, Navioideae, Hechtioideae, Lindmanioideae e Brocchinioideae (Givnish *et al.* 2014).

São plantas herbáceas, perenes que possuem hábitos distintos, podendo ser epífitas, terrícolas, rupícolas ou saxícolas e assim podem ser encontradas em vários biomas (Nunes 2006, Vanhoutte *et al.* 2016). A Mata Atlântica é considerada um dos principais centros de diversidade e endemismo desta família, com mais de 653 espécies (Forzza *et al.* 2013, Bastos *et al.* 2017). Destacam-se pela capacidade de sobreviver em ambientes áridos e pobres em nutrientes (Benzing 2000).

Bromélias contribuem para a manutenção da biodiversidade em diversos habitats (Benzing 2000). Devido a arquitetura de suas folhas, distribuídas em roseta, essas plantas formam fitotelmos (Araújo *et al.* 2007), servindo de local para abrigo, forrageamento e reprodução de animais (Rocha *et al.* 1997, Oliveira 2004).

Além da importância ecológica, as bromélias são muito apreciadas pelo mercado paisagístico (Carneiro *et al.* 2009). São plantas com grande variedade de formas e tamanhos, com folhas e brácteas coloridas, e flores com cores vivas e contrastantes que podem durar por vários meses (Vanhoutte *et al.* 2016, Souza, *et al.* 2016). Essas características agregadas ao fato de serem plantas de fácil adaptação e cultivo, aumentam a procura de exemplares destas espécies para comercialização (Nunes 2006, Givnish *et al.* 2011).

O interesse comercial eleva o risco de extinção das bromélias, uma vez que há abundância no ambiente natural, facilidade de obtenção e poucos produtores para atender a demanda (Pereira *et al.* 2010, Negrelle *et al.* 2011).

O longo período de crescimento é considerado um dos principais motivos para a extração intensiva de espécies nativas, pois algumas espécies podem demorar até uma década para atingir o tamanho comercial (Negrelle *et al.* 2012).

A produção de bromélias é atividade viável e tem sido bastante explorada no Brasil, seguindo os passos de outros países, como os Estados Unidos, Holanda e Bélgica (Aoyama *et al.* 2012), no entanto, poucas espécies são produzidas em escala comercial (Pereira *et al.* 2010).

As poucas variedades de espécies produzidas no Brasil podem estar relacionadas com a falta de informações sobre técnicas de produção que promovam o aumento na produtividade e na manutenção da sanidade vegetal (Giampaoli *et al.* 2017). Para Sanches *et al.* (2017) a maior dificuldade encontrada pelos produtores brasileiros está relacionada ao fator nutricional. Esta falta de conhecimento científico e técnico das espécies nativas é uma grande barreira na produção de bromélias (Negrelle *et al.* 2012).

De acordo com Negrelle *et al.* (2012) a produção de plantas ornamentais no Brasil corresponde a apenas 2% da produção global. A atividade é concentrada no estado de São Paulo com 66% dos produtores, onde também se localizam os maiores atacadistas do país. Os demais produtores estão localizados nos estados da região sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul). No entanto, há pouca informação disponível relacionada à produção e ao comércio de bromélias.

O processo de degradação dos ecossistemas, somado ao extrativismo predatório, tem resultado em reduções drásticas nas populações de bromélias *in situ*. Embora esta família possua espécies de grande importância ecológica, ornamental e medicinal (Oliveira 2004, Araújo *et al.* 2007, Negrelle *et al.* 2012) a realização de pesquisas sobre o aspecto nutricional das espécies ainda é escassa (Sanches *et al.* 2017), principalmente com abordagem fisiológica.

O desenvolvimento de técnicas de cultivo é uma importante estratégia de conservação para as bromélias ornamentais (Tamaki *et al.* 2011), assim como para a produção comercial.

## **1.2. Propagação *in vitro***

O cultivo *in vitro* além de ser considerado uma estratégia eficiente para conservação de espécies raras e ameaçadas, tem sido amplamente utilizado para a produção de plantas ornamentais, como bromélias (Sarasan *et al.* 2006, Kanashiro *et al.* 2009), pois permite fornecer um maior número de plantas ao mercado; assim, reduzindo a atividade predatória por espécies de seus ambientes naturais (Andrade & Tamaki 2016). Com esta ferramenta é possível compreender os requerimentos nutricionais das espécies, favorecendo a propagação, além de fornecer subsídios para os produtores.

Um aspecto importante do cultivo *in vitro* é o suprimento mineral do meio de cultura, uma vez que a nutrição mineral é essencial para o crescimento e o desenvolvimento das plantas (Bunn *et al.* 2011). Os meios de cultura utilizados, na maioria das vezes, são baseados em formulações básicas modificadas, como a de Murashige & Skoog (MS) (1962) (Kanashiro 2005). A importância da escolha de um meio de cultura ideal e uma concentração adequada

são fundamentais, pois é o meio que supre as necessidades nutricionais para o crescimento da planta *in vitro* (Naves 2001).

Inúmeros estudos têm relacionado o uso do cultivo *in vitro* com espécies de bromélias de diferentes hábitos (Souza *et al.* 2009, Carvalho *et al.* 2014, Andrade & Tamaki 2016, Silva *et al.* 2017). Para a espécie *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, bromélia de hábito rupícola ou saxícola, estudos relacionados a nutrição mostraram que o N é o nutriente que mais compromete o crescimento da planta quando sua disponibilidade é comprometida e que alterações nas concentrações dos macronutrientes do meio MS favorece o crescimento das plantas cultivadas *in vitro* (Kurita & Tamaki 2014). De acordo com Aoyama *et al.* (2012), a propagação *in vitro* desta espécie a partir de sementes propicia condições de maior desenvolvimento das plântulas em comparação àquelas cultivadas *ex vitro*.

### **1.3. *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms**

A espécie *A. imperialis* (Figura 1A) pertencente a subfamília Tillandsioideae, é nativa da Serra dos Órgãos/ RJ e possui ampla distribuição entre os estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais, porém, sua ocorrência é restrita a afloramentos rochosos e formações campestres de montanhas (Martinelli & Moraes 2013, Versieux & Wanderley 2015).

Planta heliófila de grande porte (pode atingir cinco metros de altura), apresenta folhas largas distribuídas em roseta com até 1,50 m de comprimento e inflorescência vistosa (centenas de flores) que pode durar meses (Versieux & Wanderley 2015).

Devido ao seu grande potencial ornamental, a espécie, que é conhecida popularmente como “bromélia imperial” é muito utilizada em projetos paisagísticos (Rodrigues *et al.* 2004).

Embora seja produzida em escala comercial, muitos exemplares já foram retirados ilegalmente das áreas de preservação e/ou unidades de conservação (UC), como no Parque Nacional da Serra dos Órgãos (Versieux 2009). Esse extrativismo ilegal pode estar associado ao ciclo de vida da espécie, que pode demorar até quatro décadas para atingir a maturidade (Carneiro *et al.* 2009, Versieux & Wanderley 2015).

Por ser uma espécie rupícola, suas plantas estão expostas a vários fatores que são limitantes ao estabelecimento e desenvolvimento, tais como, baixa disponibilidade de água e nutrientes, alta irradiância, variações da temperatura, ventos fortes, além de poluentes naturais (Giulietti *et al.* 1997, Giulietti *et al.* 2000, Versieux & Wanderley 2015). O extrativismo ilegal associado a esses fatores ambientais, juntamente com a degradação do bioma, coloca a espécie em risco de extinção (Bastos *et al.* 2017). De acordo com a Lista Oficial das Espécies

da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção, a espécie encontra-se na categoria vulnerável à extinção (MMA 2014).

Devido a sua vulnerabilidade e importância ecológica, estudos vem sendo realizados a fim de compreender o seu comportamento. Trabalhos envolvendo fatores como déficit hídrico, temperatura, nutrição e diferentes condições de cultivo (Rodrigues *et al.* 2004, Mollo *et al.* 2011, Aoyama *et al.* 2012, Kurita & Tamaki 2014) já foram desenvolvidos a fim de entender o seu comportamento mediante fatores de estresse, ou seja, fatores aos quais plantas da espécie são expostas em habitat natural.

Estudos visando entender os requerimentos nutricionais e assim otimizar o crescimento de plantas de *A. imperialis* mostraram que os indivíduos apresentam alterações na coloração quando cultivados em baixas concentrações de nitrogênio (7,5 mM de N), alterando a coloração verde de suas folhas para rubro (Kurita & Tamaki 2014).

A alteração na coloração foliar pode contribuir com a preservação da espécie, pois a mudança na coloração aumenta o potencial ornamental dos exemplares, e conseqüentemente o desinteresse do mercado paisagístico pelas plantas naturalmente verdes, comprometendo assim, a retirada ilegal de exemplares do ambiente natural.

A coloração foliar pode ser originada por diversos compostos, como antocianinas, betalaninas e carotenoides (Delgado-Vargas & Paredes-Lopez 2000, Tanaka *et al.* 2008, Rodriguez-Amaya 2018), no entanto, a coloração vermelha em folhas tem sido atribuída, principalmente, às antocianinas.



**Figura 1.** A) Exemplar adulto da espécie *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms em pleno florescimento, B) Fruto aberto contendo sementes, C) Semente com apêndices plumosos, D) Sementes após processo de desinfestação em meio de cultura para germinação e E) Plântulas após 40 dias de germinação em meio de cultura. Barras = 1 cm

#### 1.4. Antocianinas (ACNs)

Antocianinas (ACNs) são pigmentos vegetais pertencentes à classe dos flavonoides (Ponmozhi *et al.* 2011), cuja coloração pode variar do vermelho ao violeta (Yuan *et al.* 2009, Passeri *et al.* 2016). Estão presentes, principalmente, nas camadas epidérmicas de frutos, folhas e pétalas de flor (Conn *et al.* 2010) e suas funções estão relacionadas a atração para polinizadores, absorção de radiação ultravioleta (UV) na proteção do DNA e dos fotossistemas e ação antioxidante (Gould 2004, Zhang *et al.* 2012).

As ACNs são sintetizadas, a partir da fenilalanina, na face citosólica do retículo endoplasmático (RE) e armazenadas no vacúolo (Tanaka *et al.* 2008, Xie & Shie 2010, Passeri *et al.* 2016), em resposta a estímulos ambientais, como luz, disponibilidade de nutrientes, temperatura e radiação UV (Gould *et al.* 2002, Cruz *et al.* 2012, Souberyand *et al.* 2014).

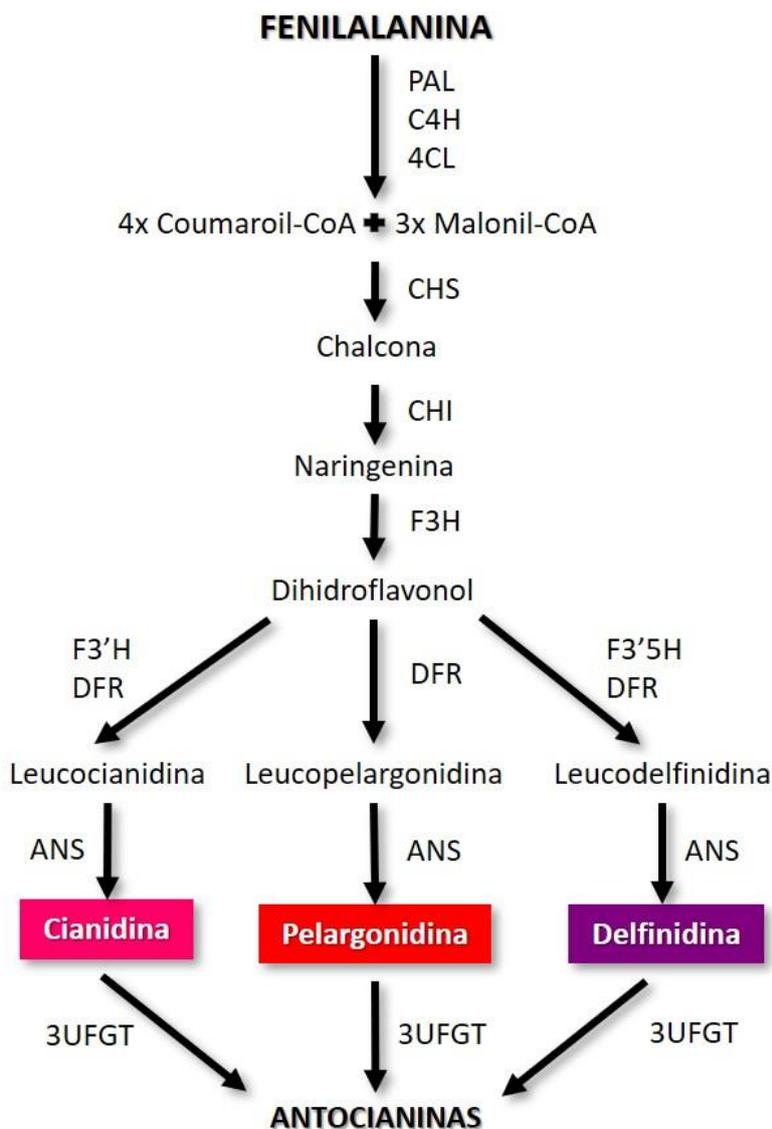
Acredita-se que o transporte das ACNs para o vacúolo ocorra pela ação da enzima glutathione S-transferase (GST) (Mueller *et al.* 2000, Kitamura *et al.* 2004, Tanaka *et al.* 2008, Shi & Xie 2014), no entanto, inúmeras sugestões foram propostas, mas sem nenhuma definição. Uma das propostas mais aceitas é que ocorra por mediação das vesículas de membrana e transportadores de membrana (Conn *et al.* 2010), conforme observado por Wiltshire & Collings (2009) em epiderme de cebola vermelha. Após a síntese e compartimentalização no vacúolo, as ACNs precisam ser estabilizadas para preservar a cor do tecido vegetal ao longo do tempo (Passeri *et al.* 2016).

Uma vez localizadas no vacúolo, as ACNs são ionizadas espontaneamente em seu cátion flavílio pigmentado, sendo armazenadas em estruturas denominadas antocianoplastos (Nakamura 1989, Nakamura 1993) ou inclusões antociânicas vasculares (IAV) (Hrazdina *et al.* 1987, Hrazdina & Jensen 1992, Markham *et al.* 2000). Esses pigmentos podem ocorrer de forma livre na seiva vacuolar, no entanto, tornam-se mais suscetíveis à degradação pela ação de enzimas vacuolares. Sendo assim, a retenção dentro de IAV é benéfica para manutenção da cor (Conn *et al.* 2010).

Várias enzimas estão envolvidas na biossíntese das ACNs (Figura 2), e estas podem variar entre as espécies (Shi & Xie 2010), influenciando diretamente na presença ou ausência de determinada ACN, assim como na coloração do vegetal (Passeri *et al.* 2016). Segundo Tanaka *et al.* (2008) as enzimas flavonoide 3'-hidroxilase (F3'H) e flavonoide 3',5'-hidroxilase (F3'5'H) são necessárias para a produção das ACNs cianidina e delphinidina.

A biossíntese de ACNs é uma das vias metabólicas mais estudadas em plantas (Xu *et al.* 2017) e ao longo das últimas décadas, os principais genes reguladores e fatores de

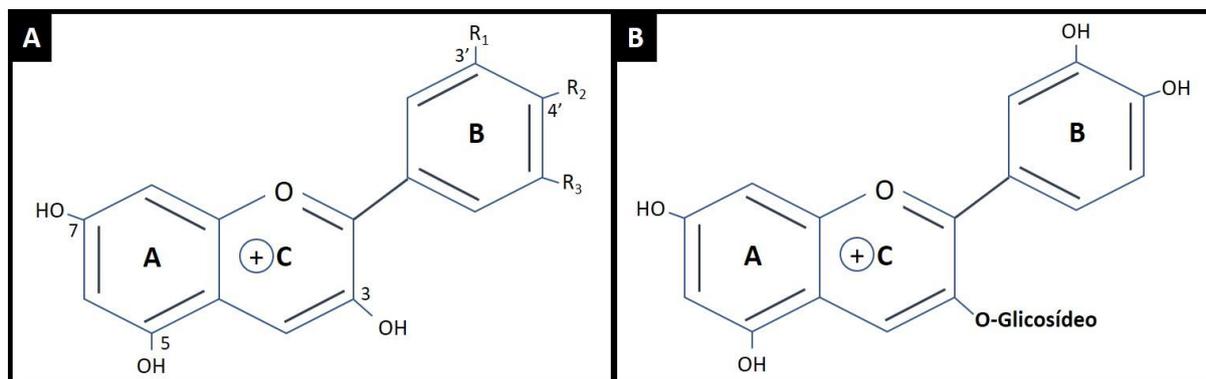
transcrição que controlam a via foram isolados. (Yuan & Li 2009, Zhou *et al.* 2012, Wang *et al.* 2013). É consenso que a fenilalanina amônia liase (PAL) é a enzima chave para ativação dos genes envolvidos na síntese destes pigmentos (Page *et al.* 2012, Zhang *et al.* 2015).



**Figura 2.** Rota biossintética simplificada das antocianinas e as principais enzimas envolvidas. Fenilalanina amônia liase (PAL), chalcona 4-sintase (C4H), 4-coumaroil-CoA (4CL), chalcona sintase (CHS), chalcona isomerase (CHI), flavanona 3-hidroxilase (F3H), flavonoide 3-hidroxilase (F3'H), dihidroflavonol 4-redutase (DFR), flavonoide 3'5' hidroxilase (F3'5'H), antocianidina sintase (ANS), flavonoide 3-O-glucosiltransferase (UFGT). Modificado de Shi & Xie (2012).

Antocianinas são glicosídeos de antocianidinas, também conhecidas como agliconas (Wu *et al.* 2006). As antocianidinas não possuem grupos glicosídeos e a maioria possui OH nas posições 3 (anel C), 5 e 7 (anel A) (Figura 3A). Com a presença de açúcares (glicose, xilose, arabinose, ramnose, galactose ou dissacarídeos constituídos por esses açúcares) em uma ou mais dessas OH (Prior & Wu 2006, Março *et al.* 2008) se obtêm uma molécula de

antocianina (Figura 3B). Devido à presença de açúcares, as moléculas de ACNs são mais solúveis e estáveis do que as antocianidinas (Março *et al.* 2008).



**Figura 3.** Estrutura química das moléculas de A) Antocianidina e B) Antocianina.

Existem cerca de 20 antocianidinas (Wu *et al.* 2006, Prior & Wu 2006), mas apenas 06 (seis) são responsáveis pelas cores das ACNs (Kong *et al.* 2003) (Tabela 1), sendo então, as ACNs derivadas da pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina (Kong *et al.* 2003, Wu *et al.* 2006, Março *et al.* 2008). Entretanto, a maioria delas derivam da cianidina (31%), delphinidina (22%) ou pelargonidina (18%), estando presentes em 80% das folhas pigmentadas (Kong *et al.* 2003, Martín *et al.* 2017). Das mais de 600 ACNs já relatadas (Wu *et al.* 2006) a mais encontrada nos vegetais é a cianidina-3-glicosídeo (Kong *et al.* 2003, Março *et al.* 2008).

Esses pigmentos diferenciam-se em função do número e posição dos grupos hidroxila e metoxila presentes nas antocianidinas (Wu *et al.* 2006, Lopes *et al.* 2007) (Tabela 1), a natureza e o número de açúcar ligado à molécula, a posição desse fixador e a presença de ácidos alifáticos ou aromáticos ligados aos açúcares na molécula (Kong *et al.* 2003, Março & *et al.* 2008). Além destes fatores, outros como pH, luminosidade, temperatura e enzimas podem influenciar na coloração das ACNs (Delgado-Vargas & Paredes-Lopez 2000, Lopes *et al.* 2007, Simões *et al.* 2012). Em pH <3 o pigmento apresenta coloração vermelho intenso, tornando-se incolor em pH 4–5 e azul quando está acima de 7. A co-pigmentação resultante da interação com outras moléculas (alcaloides, aminoácidos) até mesmo outras ACNs podem influenciar na coloração destes pigmentos (Março *et al.* 2008).

**Tabela 1.** Coloração das principais antocianidinas e a posição dos grupos hidroxila (OH) e metoxila (OCH<sub>3</sub>).

Antocianidinas	Coloração	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Pelargonidina	Vermelho alaranjado	H	OH	H
Cianidina	Vermelho	OH	OH	H
Delfinidina	Azul	OH	OH	OH
Peonidina	Púrpura	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Petunidina	Violeta	OCH <sub>3</sub>	OH	OH
Malvidina	Violeta	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>

Embora trabalhos com identificação de pigmentos antociânicos em bromélias sejam escassos, alguns já relataram a presença de algumas ACNs em espécies de Bromeliaceae.

Saito & Harbone (1983), constataram em um levantamento com 16 gêneros da subfamília Bromelioideae a presença de cianidina-3,5-glicosídeo principalmente em folhas e brácteas dos espécimes analisados, dentre eles a espécie *Ananas comosus*.

Scogin (1985) também constatou a presença de ACNs em 10 espécies do gênero *Puya*. As ACNs relatadas pelo autor foram cianidina-3-O-glicosídeo, cianidina-3,5-O-glicosídeo e três derivadas de delfinidina.

Segundo Manetti *et al.* (2009), já foram identificadas mais de 20 ACNs em espécies de Bromeliaceae, derivadas de pelargonidina, cianidina, delfinidina e peonidina, no entanto, não há relatos para a espécie *A. imperialis*.

De acordo com Bogs *et al.* (2006), o conhecimento do tipo de ACN também se mostra fundamental no estudo de plantas ornamentais, isso porque a predominância de uma antocianina individual pode determinar a cor do produto, influenciando diretamente na aceitação e no valor comercial do mesmo.

Vale ressaltar que a síntese de ACNs, conforme mencionado anteriormente, está relacionada a diversos fatores que influenciam diretamente no pigmento produzido, ou seja, plantas expostas a alta radiação fotossinteticamente ativa, podem apresentar ACNs distintas das produzidas em plantas com baixo fornecimento de nitrogênio. Sendo assim, ao se identificar ACNs presentes em determinada planta, principalmente nas produzidas comercialmente, é importante verificar a quais fatores as plantas foram expostas a fim de manter as mesmas condições de cultivo para que não ocorra interferência na cor do produto.

## 1.5. Fatores relacionados a biossíntese de ACNs

### 1.5.1. Nitrogênio (N)

O nitrogênio (N) é o principal componente de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, clorofila e coenzimas (Raven *et al.* 2007, Silva Júnior *et al.* 2013), devido à sua importância, está envolvido desde o metabolismo à alocação de biomassa, crescimento e desenvolvimento (Chen *et al.* 2012).

Considerado o elemento mineral mais importante para as plantas, é absorvido nas formas inorgânicas  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  e orgânicas como ureia e aminoácidos (Marschner 2012, Taiz & Zeiger 2013, Liu & von Wirén 2017). No solo a forma nitrogenada disponível às plantas pode ser nítrica (N- $\text{NO}_3^-$ ) ou amoniacal (N- $\text{NH}_4^+$ ), sendo a forma nítrica a mais abundante, em decorrência do processo de nitrificação por bactérias que provocam a oxidação do amônio livre (Shan *et al.* 2012).

Devido aos diversos hábitos de crescimento, as bromélias estão expostas a diferentes formas nitrogenadas, incluindo a forma mineral e orgânica (Nievola *et al.* 2001).

A forma disponível do N e sua concentração influenciam no crescimento das plantas, no entanto, Araújo *et al.* (2009) ressaltaram que a combinação destes dois íons favorece o crescimento *in vitro* de várias espécies, sendo que a razão entre estas duas fontes de nitrogênio ( $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$ ) parece ser o fator determinante para que ocorra este estímulo.

Quando as plantas não são supridas adequadamente por N esse é translocado das folhas mais velhas, que apresentam clorose, para as folhas jovens que apresentam um menor desenvolvimento. A deficiência de N, geralmente, resulta em sintomas como estiolamento e clorose generalizada (Epstein & Bloom, 2006), assim como acúmulo de ACNs (Soubeyrand *et al.* 2014, Liang & He 2018).

Quando a planta está sob deficiência de N, a expressão de genes PAL aumenta, liberando amônia para aumentar os níveis de N disponível na planta, assim como os precursores para a biossíntese de fenilpropanoides (Soubeyrand *et al.* 2014), resultando na síntese de ACNs. De acordo com Barker *et al.* (2007), conforme citação de Simões *et al.* (2012), o acúmulo de ACNs mediante deficiência de alguns nutrientes é uma estratégia usada pelas plantas para evitar o acúmulo excessivo de carboidratos nos tecidos, prevenindo assim distúrbios fisiológicos

A relação entre a disponibilidade de N e ACNs já foi relatada em diversos trabalhos (Yuan *et al.*, 2009, Shi & Xie 2010, Zhou *et al.* 2012, Liang & He 2018), inclusive para plantas da espécie *A. imperialis* quando cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de N ( $0 \leq \text{N} \leq 175$ ) (Kurita & Tamaki 2014).

### 1.5.2. Radiação fotossinteticamente ativa (PAR – *em inglês*)

Da radiação solar incidente na superfície terrestre, a irradiância de fótons que atinge a superfície da folha (expressa em *quanta* – mol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) pode variar de aproximadamente 2.000 a 10 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> entre o dossel e o sub-bosque de uma floresta, respectivamente (Taiz & Zeiger 2013). A PAR compreende o fluxo de fótons absorvidos pelas plantas nos comprimentos de onda entre 400-700 nm (Taiz & Zeiger 2013, Klem *et al.* 2015).

A luz solar é essencial para a vida vegetal e assim como os requerimentos nutricionais, cada espécie necessita de uma determinada intensidade luminosa para poder manter suas funções vitais.

Embora a PAR seja necessária para o crescimento e desenvolvimento dos vegetais, quando em excesso pode causar danos como a fotoinibição da fotossíntese. A fotoinibição ocorre devido à redução no desempenho fotoquímico do PSII, podendo levar à destruição fotooxidativa do aparato fotossintético (Takahashi *et al.* 2010, Klem *et al.* 2015).

Estresse oxidativo também pode ser consequência da exposição a alta PAR. Quando expostas à alta irradiância as plantas podem absorver mais energia luminosa do que o necessário para a fotossíntese, essa excitação excessiva das clorofilas sobrecarrega os mecanismos fotoprotetores resultando no aumento da produção de ROS, como radicais superóxido (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e radicais hidroxila (OH<sup>·</sup>) (Zhang *et al.* 2012, Buchanan *et al.* 2015).

Para evitar danos, as plantas possuem mecanismos que podem minimizar os efeitos nocivos causados pelo excesso de luz. Estas respostas incluem mecanismos que podem diminuir a absorção de luz excessiva (movimentação foliar e cloroplastos), redução nos complexos de coleta de luz, indução de mecanismos de reparo, mudanças na morfologia foliar e acúmulo de pigmentos fotoprotetores e antioxidantes (Klem *et al.* 2015).

Pigmentos não fotossintéticos como as ACNs limitam a intensidade de luz que atinge as moléculas de clorofila, prevenindo a superexcitação (Trojak & Showron 2017). A síntese de ACNs sob alta PAR ocorre devido à fotoativação indireta das enzimas envolvidas através do sistema fitocromo (Cruz *et al.* 2012).

O acúmulo de ACNs em resposta a alta PAR já foi descrito em várias espécies, como *Arabidopsis thaliana*, *Euphorbia pulcherrima*, *Hordeum vulgare*, *Kalanchoe brasilienses* e *Kalanchoe pinnata*, entre outras, (Shi & Xie 2010, Cruz *et al.* 2012, Page *et al.* 2012, Klem *et al.* 2015, Trojak & Showron 2017), entretanto, não há registros para a espécie *Alcantarea imperialis*.

### 1.5.3. Radiação ultravioleta-B (UV-B)

Com a depleção da camada de ozônio, a radiação UV-B (280-320 nm) tem atingido cada vez mais a superfície da Terra, causando diversas consequências danosas aos vegetais (Ballaré *et al.* 2011, Almeida *et al.* 2012, Buchanan *et al.* 2015).

Os efeitos nocivos dos raios UV-B podem comprometer o crescimento e o desenvolvimento, reduzir a fotossíntese, a biomassa e a síntese proteica e danificar o DNA (Almeida *et al.* 2012, Soledad *et al.* 2015). De acordo com Takahashi *et al.* (2010) a redução da fotossíntese pela ação da radiação UV-B é mais efetiva do que pela ação de alta PAR.

A maioria das espécies possuem mecanismos de proteção extremamente eficientes contra a radiação UV, que possibilitam a adaptação às variações nos níveis de UV-B (Ballaré *et al.* 2011).

Plantas expostas à radiação UV-B podem apresentar alterações bioquímicas, como aumento na produção de ROS e acúmulo de flavonoides (Neill *et al.* 2002, Ballaré *et al.* 2011, Page *et al.* 2012, Hideg *et al.* 2013, Agati *et al.* 2013). O aumento da atividade do sistema antioxidante enzimático (SOD, CAT, APX e GR) é um importante mecanismo de tolerância à radiação UV-B (Soledad *et al.* 2015, Majer *et al.* 2014).

A biossíntese de ACNs tem sido relacionada à exposição de diversas espécies a radiação UV-B (Guo *et al.* 2008, Khatami & Ghanati 2011, Soledad *et al.* 2015). A presença desses pigmentos nos tecidos foliares reduz significativamente a ação da radiação, minimizando as chances de danos ao DNA (Boeger & Poulson 2006).

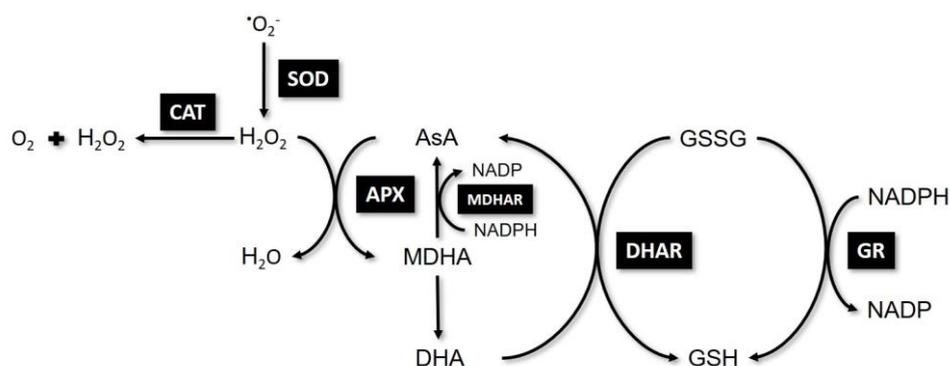
### 1.5.4. Espécies reativas de oxigênio (ROS – *em inglês*)

Espécies reativas de oxigênio (ROS) como oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e radical superóxido ( $^{\cdot}\text{O}_2^-$ ) são formadas naturalmente em resposta ao metabolismo aeróbio (Foyer 2018), mas também por condições ambientais que causam o estresse oxidativo (Nakabayashi *et al.* 2014). Herbicidas, poluição do ar, metais pesados, seca, temperaturas extremas, ataque por patógenos, senescência e condições intensas de luz são exemplos de fatores que resultam em desequilíbrios metabólicos causando estresse oxidativo e conseqüentemente a produção e acúmulo de ROS (Suzuki *et al.* 2012, Buchanan *et al.* 2015, Xu *et al.* 2017).

O aumento das ROS pode resultar na oxidação de componentes celulares, prejudicar a atividade metabólica, afetando a integridade das organelas (Suzuki *et al.* 2012). Para que tais danos não ocorram, as plantas eliminam o excesso de ROS através do sistema de defesa antioxidante, que pode ser enzimático pela ação de enzimas como SOD, APX, CAT e GR ou

não-enzimático por compostos como ascorbato (vitamina C), glutathiona, tocoferóis (vitamina E) e carotenoides (Buchanan *et al.* 2015) (Figura 4). A SOD é considerada uma enzima chave no mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo por ser a primeira a atuar contra o aumento das ROS, dismutando o radical  $\cdot\text{O}_2^-$  em  $\text{H}_2\text{O}_2$  que será convertido em  $\text{H}_2\text{O}$  pela ação das enzimas CAT e APX. A APX também atua no ciclo ascorbato-glutathiona, juntamente com a GR, onde são responsáveis por regenerarem o ascorbato e a glutathiona reduzida.

As ACNs também são descritas como compostos do sistema de defesa não-enzimáticos devido à sua capacidade antioxidante (Fini *et al.* 2011, Zhang *et al.* 2012, Buchanan *et al.* 2015, Xu *et al.* 2017), no entanto, pouco se sabe sobre o mecanismo de indução ocasionado por ROS (Xu & Rothstein 2018).



**Figura 4.** Principais componentes do sistema antioxidante em plantas.  $\cdot\text{O}_2^-$  - radical superóxido,  $\text{H}_2\text{O}_2$  - peróxido de hidrogênio, SOD - superóxido dismutase,  $\text{O}_2$  - oxigênio molecular, CAT - catalase,  $\text{H}_2\text{O}$  - água, APX - ascorbato peroxidase, AsA - ácido ascórbico/ascorbato; MDHA - monodehidroascorbato, MDHAR - MDHA redutase, DHA - dehidroascorbato, DHAR - DHA redutase, GR - glutathiona redutase, GSH - glutathiona reduzida; GSSG - glutathiona oxidada. Adaptado de Buchanan *et al.* (2015).

Embora haja um consenso relacionado a eliminação de ROS por flavonoides, como ACNs, há controvérsias, devido à presença dos flavonoides, quase que exclusivamente, em vacúolos de células epidérmicas e, portanto, separados das principais fontes geradoras de ROS (Fini *et al.* 2011, Zhang *et al.* 2012). Bienert *et al.* (2006) relatam que mesmo estando concentradas nos vacúolos, as ACNs conseguem eliminar ROS devido a mobilidade dos compostos de sinalização entre as organelas, que é facilitado pela presença de aquaporinas. Há relatos que as ACNs atuam como antioxidantes no mesofilo para reduzir  $\text{H}_2\text{O}_2$  gerado a partir de dano mecânico (Fini *et al.* 2011). Neill & Gould (2003) mencionam a presença de ACNs no citosol em formas incolores e azuis.

Xu *et al.* (2017) descrevem as ACNs não apenas como compostos que eliminam ROS, e sim, compostos cuja biossíntese está diretamente relacionada à presença de ROS. Para os

autores, o fato destes pigmentos serem acumulados em função de inúmeros fatores ambientais considerados estressantes e geradores de estresse oxidativo, o que ativa a biossíntese não é o fator estressante e sim a produção de ROS ocasionada por ele. Neste caso as ROS atuam como sinalizadores para ativação dos genes envolvidos na rota biossintética das ACNs. Outros trabalhos também relatam a ação de ROS como compostos de sinalização (Bienert *et al.* 2006, Buchanam *et al.* 2015).

Plantas de *Arabidopsis* apresentam acúmulo de ACNs quando expostas a estresses abióticos como deficiência de fosfato e nitrogênio, luz, temperatura alta, seca e radiação UV, portanto, adequadas para esclarecer se ACNs atuam efetivamente na eliminação de ROS, principalmente por ter a via biossintética totalmente descrita (Nakabayashi *et al.* 2014). Ressaltando que em condições normais de crescimento as plantas apresentam baixos níveis de ACNs na maioria dos tecidos (Xu & Rothstein 2018).

Por ser uma planta modelo no estudo de ACN, Zhang *et al.* (2012) avaliaram os efeitos da exposição a alta PAR ( $1300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) em dois fenótipos de *Arabidopsis* (selvagens e mutantes-deficientes em ACNs), a fim para compreender a função antioxidante das ACNs. Os resultados mostraram que plantas selvagens tiveram um aumento no teor de precursores da síntese de ACNs, assim como na capacidade de captação de DPPH e menor acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2^-$ , indicando a ação antioxidante destes pigmentos, na eliminação de ROS.

Assim como em *Arabidopsis*, estudo com *Oryza sativa* L. (arroz) mostrou que folhas contendo ACNs apresentam potencial antioxidante maior do que as folhas verdes (Peng *et al.* 2006).

Embora tenha sido sugerido que as ACNs possam atuar como antioxidantes, a associação dos pigmentos e o estresse oxidativo parece estar relacionada à capacidade das ACNs em reduzir a pressão de excitação e, conseqüentemente, o potencial de dano oxidativo.

Mesmo havendo vários relatos sobre a excelente capacidade antioxidante das ACNs (Prior & Wu 2006, Fini *et al.* 2011, Zhang *et al.* 2012), ainda existem várias lacunas a serem preenchidas para a melhor compreensão da atividade antioxidante destes pigmentos.

## **2. OBJETIVO**

O presente trabalho teve como objetivo induzir o acúmulo de antocianinas em plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms cultivadas *in vitro*, em diferentes fontes e concentrações de nitrogênio (N), na presença de alta radiação fotossinteticamente ativa (PAR) ou com radiação ultravioleta (UV-B), visando manter a coloração, com crescimento e desenvolvimento satisfatórios, durante a aclimatização para a produção de exemplares que possuam maior interesse econômico.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material vegetal

Nos experimentos foram utilizadas sementes de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms (plantas com folhas verdes), cujos frutos foram coletados de plantas do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais do Instituto de Botânica, em São Paulo. Os frutos foram abertos manualmente (Figura 1B) e suas sementes foram acondicionadas em sacos de papel pardo e armazenadas em condições de refrigeração a 10 °C.

#### 3.2. Obtenção de plântulas *in vitro*

Para obtenção de plântulas foram utilizadas 10.000 sementes, sem os apêndices plumosos (Figura 1C) (retirados manualmente), que foram submetidas à desinfestação superficial em frasco de 250 mL contendo álcool etílico a 70% por 5 minutos, sendo, em seguida, imersas em solução de hipoclorito de sódio a 2%, acrescida de duas gotas de Tween 20, onde permaneceram sob agitação por uma hora. A seguir, em câmara de fluxo de ar estéril, a solução de hipoclorito foi retirada e o processo finalizado com quatro lavagens consecutivas das sementes com água destilada esterilizada em autoclave por 60 minutos.

Após a desinfestação, as sementes (35 sementes/ frasco) foram depositadas em frascos contendo 10 mL de meio de cultura com 3% sacarose (Figura 1D). O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da adição de 6 g.L<sup>-1</sup> de agar. A esterilização dos meios foi realizada em autoclave a 120 °C durante 15 minutos. Os frascos foram mantidos em sala de cultura com fotoperíodo de 12 horas, radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de 50 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, temperatura de 26±2 °C até a obtenção de plântulas (1,0±0,1 cm de altura e 0,2±0,0 cm de sistema radicular), por aproximadamente 30 dias (Figura 1E).

#### 3.3. Tratamentos

##### 3.3.1. Crescimento *in vitro* em diferentes fontes e concentrações de nitrogênio (N)

As plântulas obtidas *in vitro* foram transferidas para os tratamentos contendo meio MS modificado em relação à concentração dos macronutrientes e fonte nitrogenada (formulação do meio MS original encontra-se disponível em anexo) permanecendo em sala de cultura por 6 meses, nas mesmas condições descritas no item 3.2.

Foram utilizados 03 (três) tratamentos contendo diferentes fontes nitrogenadas, sendo elas, nitrato de amônio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) – tendo como fontes NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e KNO<sub>3</sub>, nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) –

tendo como fonte  $\text{KNO}_3$  e  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) – tendo como fonte  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e  $(\text{NH}_4)\text{Cl}$  (Tabela 2, 3 e 4).

As concentrações utilizadas foram 3,75 mM, 7,5 mM e 15 mM de N e como tratamento controle (TC) foi utilizado um meio contendo 32 mM de  $\text{NO}_3^-$  e 28 mM de  $\text{NH}_4^+$ , considerado por Kurita & Tamaki (2014) como adequado ao crescimento da espécie. Vale ressaltar que para elaboração dos tratamentos foi realizado o balanço iônico dos sais.

Cada tratamento continha 30 frascos por concentração com 6 plântulas em cada que foram mantidos sob condições assépticas em sala de cultura com fotoperíodo de 12 horas, PAR de  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  e temperatura média de  $26\pm 2$  °C durante 6 meses.

A fim de evitar o acúmulo de antocianinas em função do pH, após três meses, período em que normalmente o meio apresenta pH próximo a 4,0, as plantas foram transferidas para novos meios de cultura. Além de evitar o acúmulo de antocianinas por pH baixo, esse subcultivo se fez necessário para evitar deficiência nutricional em função da depleção de nutrientes no meio.

**Tabela 2.** Quantidade de sais ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) utilizados na formulação dos meios de cultura em função das concentrações 3,75, 7,5 e 15 mM de  $\text{NO}_3^-$ .

Sais ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Tratamentos – $\text{NO}_3^-$			
	3,75 mM	7,50 mM	15,00 mM	TC
$\text{KNO}_3$	0,08	0,46	1,21	0,12
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,35	0,35	0,35	0,35
$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,22	0,22	0,22	0,44
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,37	0,37	0,37	0,37
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,17	0,17	0,17	0,08
KCl	0,66	0,53	0,25	-
$\text{K}_2\text{SO}_4$	0,78	0,62	0,30	-
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	-	-	-	2,23

\* TC – tratamento controle

**Tabela 3.** Quantidade de sais (g.L<sup>-1</sup>) utilizados na formulação dos meios de cultura em função das concentrações 3,75, 7,5 e 15 mM de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

Sais (g.L <sup>-1</sup> )	Tratamentos – NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>			
	3,75 mM	7,50 mM	15,00 mM	TC
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,12	0,25	0,50	-
(NH <sub>4</sub> )Cl	0,10	0,20	0,40	-
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,44	0,44	0,44	0,44
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,37	0,37	0,37	0,37
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,17	0,17	0,17	0,08
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,82	0,82	0,82	-
KCl	0,70	0,70	0,70	-
KNO <sub>3</sub>	-	-	-	0,12
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-	-	-	2,23
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	-	-	-	0,35

\* TC - tratamento controle

**Tabela 4.** Quantidade de sais (g.L<sup>-1</sup>) utilizados na formulação dos meios de cultura em função das concentrações 3,75, 7,5 e 15 mM de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>.

Sais (g.L <sup>-1</sup> )	Tratamentos – NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>			
	3,75 mM	7,50 mM	15,00 mM	TC
KNO <sub>3</sub>	0,19	0,38	0,38	0,12
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,08	0,15	0,45	2,23
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,44	0,44	0,44	0,44
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,37	0,37	0,37	0,37
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,17	0,17	0,17	0,08
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	-	-	-	0,35

\* TC – tratamento controle

### 3.3.2. Crescimento *in vitro* sob alta PAR

Plantas obtidas *in vitro*, conforme descrito no item 3.2., foram transferidas para frascos contendo tratamento controle (TC), totalizando 60 frascos com 6 plantas em cada. As plantas

permaneceram em sala com fotoperíodo de 12 horas, PAR de  $700 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e temperatura média de  $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 6 meses. Um lote (controle) foi mantido em sala de cultura com PAR de  $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

A fim de evitar o acúmulo de antocianinas em função do pH, após três meses, período em que normalmente o meio apresenta pH próximo a 4,0, as plantas foram transferidas para novos meios de cultura. Além de evitar o acúmulo de antocianinas por pH baixo, esse subcultivo se fez necessário para evitar deficiência nutricional em função da depleção de nutrientes no meio.

### 3.3.3. Aclimatização das plantas rubras obtidas no cultivo *in vitro*

Plantas que apresentaram coloração rubra durante o cultivo *in vitro* foram transplantadas para vasos plásticos (tamanho 8x10 cm) contendo casca de *Pinus* como substrato e mantidas em casa de vegetação com PAR  $\cong 450 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  por 12 meses para acompanhamento da durabilidade da cor em condição ambiente.

Para adubação manteve-se as mesmas concentrações de N presentes nos meios de cultura, cujo tratamento induziu alteração na coloração.

### 3.3.4. Crescimento *ex vitro* sob diferentes intensidades de radiação UV-B

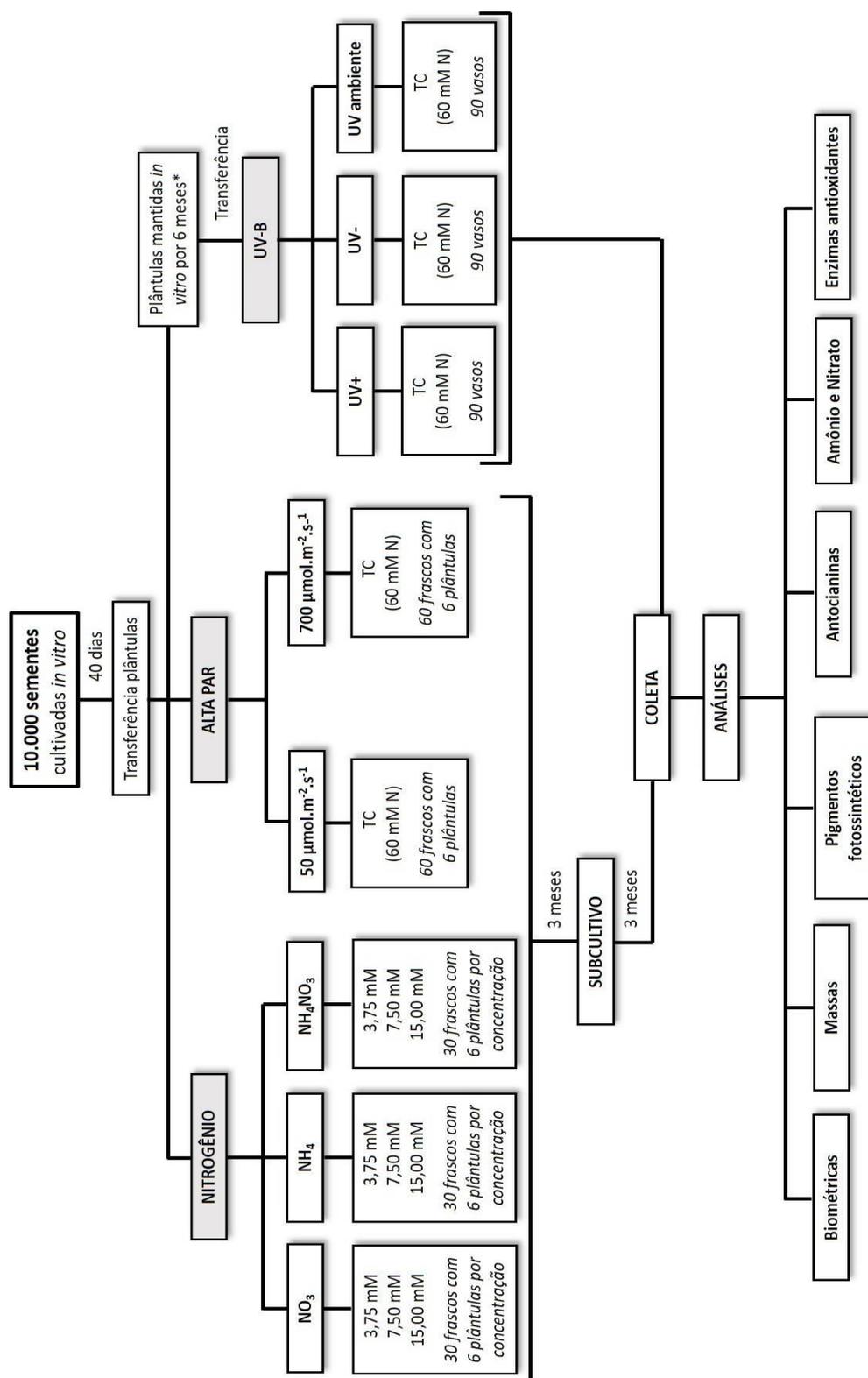
Plantas obtidas *in vitro*, conforme descrito em 3.2., foram cultivadas *in vitro* por 6 meses em TC. Após esse período 270 plantas foram transplantadas para vasos contendo casca de *Pinus* como substrato e aclimatizadas em sala de cultura por 30 dias para então serem transferidas para as câmaras com diferentes intensidades de radiação UV-B (Tabela 5).

Cada tratamento continha 90 vasos, cujas plantas foram adubadas semanalmente com as mesmas concentrações utilizadas no TC. As plantas mantidas no tratamento UV+, ficaram expostas a radiação UV-B por 1 hora/ dia durante 6 meses, visando a indução da cor rubra nas folhas de *A. imperialis*.

**Tabela 5.** Intensidades de radiação UV-B ( $\text{kJ.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ ) utilizados nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Intensidade de UV-B ( $\text{kJ.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ )
UV-	4,7
UV ambiente	11,8
UV+	101,9

### 3.4. Delineamento experimental



**Figura 5.** Fluxograma do experimento.

\*Plantas foram cultivadas *in vitro* por 6 meses em TC (tratamento controle) passando por subcultivo após 3 meses ao início da transferência para então serem transferidas para vasos permanecendo nas câmaras com diferentes intensidades de UV-B.

### 3.5. Medidas biométricas e de biomassa

Para análise de crescimento foram avaliados os parâmetros quantidade de folhas e raízes, comprimento foliar e radicular (cm), massa fresca e seca das partes aérea e radicular (mg ou g). Foram utilizadas 20 plantas de cada tratamento, escolhidas de forma aleatória.

Para obtenção da massa seca, o material foi separado em parte aérea e radicular e acondicionado em sacos de papel devidamente identificados, os quais foram colocados em estufa à 60 °C, durante 120 horas. Após a secagem, o material foi pesado em balança analítica (marca BioPrecisa).

### 3.6. Pigmentos fotossintéticos

Para a análise de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides) foram utilizadas 100 mg de material vegetal (foram descartadas as folhas com clorose e senescentes) triturado em nitrogênio líquido, em triplicata de cada tratamento. Para extração dos pigmentos foi adicionado à massa 1 mL de acetona PA 100% (gelada) e homogeneizado em vortex por 30", permanecendo em banho de ultrassom (marca Eco-sonics) por 30 min (água gelada) e posteriormente centrifugado a 15.000 rpm, a 4 °C por 10 min (centrífuga marca Thermo Scientific). O sobrenadante foi retirado e o processo repetido. A amostra foi armazenada a -20 °C até a análise. O processo de extração foi adaptado de Munné-Bosch & Lalueza (2007) e os cálculos das concentrações foram baseados nas equações definidas por Lichtenthaler (1987) e Buschmann (2001).

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (modelo PG Instruments – T60), utilizando-se cubetas de vidro. A absorbância (*A*) da clorofila *a* foi lida em 662 nm, clorofila *b* em 645 nm e dos carotenoides em 470 nm. As concentrações da clorofila *a* (*Ca*), da clorofila *b* (*Cb*) e dos carotenoides (*C*) foram obtidas pelas equações apresentadas a seguir:

$$Ca = 11,24 A_{662} - 2,04 A_{645}$$

$$Cb = 20,13 A_{645} - 4,19 A_{662}$$

$$C = (1000 A_{470} - 1,90 Ca - 63,14 Cb) / 214$$

Os conteúdos de clorofilas e de carotenoides dos tecidos foram expressos em µg do pigmento por grama de massa fresca (µg.g<sup>-1</sup> MF).

### 3.7. Antocianinas

Para a análise de ACNs foram utilizadas 300 mg de material vegetal triturado em nitrogênio líquido e homogeneizado em 1 mL de solução de extração (90% água deionizada e 10% HCl 0,3 M (v/v)). O material foi agitado em vortex por 30', permanecendo em banho de ultrassom por 15 min (água gelada) e posteriormente centrifugado a 10.000 rpm, a 10 °C por 15 min. O sobrenadante foi retirado e o processo repetido. A amostra foi armazenada em -20 °C até a análise que foi realizada em triplicata.

As análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando equipamento LC-1220 da marca Agilent Technologies equipado com detector de arranjos de díodos (DAD).

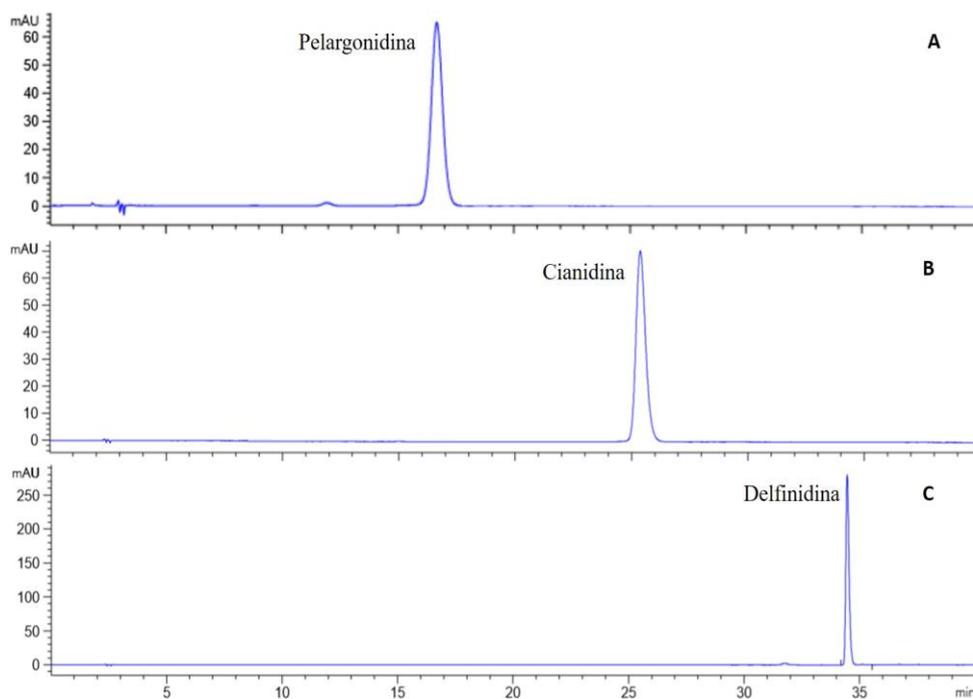
As amostras foram separadas em coluna analítica Eclipse StableBlond SB-C18 (4,6 mm, 250 mm, 5 µm, Agilent). Os solventes utilizados na fase móvel foram água ultrapura, ácido fosfórico e metanol (eluente A: 3% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> em água ultrapura; eluente B: 100% metanol (grau HPLC)).

A coluna foi tratada com um sistema de eluição em gradiente adequado para separação de ACNs, baseado no método descrito por Long (2015). O gradiente foi composto da seguinte forma: eluente A para B: 77:23 (0-25 min), 74:26 para 65:35 (25-30 min), 65:35 para 40:60 (30-35 min) e 40:60 para 77:23 (35-40 min). O fluxo de vazão foi de 1 mL.min<sup>-1</sup> e o volume de injeção foi de 20 µL. O sinal do DAD foi configurado para 525 nm.

A identificação de ACNs por HPLC é um grande desafio, pois requer o uso de padrões analíticos (Março *et al.* 2008) que nem sempre são comercializados, resultando na falta de padrões, assim como pelo alto custo. Em função desses fatores, a identificação de ACNs pode ocorrer por comparação direta, quando há disponibilidade de padrões, ou comparação indireta. Por ser a comparação indireta um método sujeito a erros, optou-se neste trabalho em utilizar padrões analíticos.

Devido à dificuldade em adquiri-los, a identificação foi baseada em três padrões analíticos (Sigma-Aldrich): cloreto de pelargonidina (cas number 17334-58-6), cloreto de cianidina (cas number 7084-24-4) e cloreto de delphinidina (cas number 528-53-0) em concentrações – 1 mg.mL<sup>-1</sup>, 0,66 mg.mL<sup>-1</sup> e 1 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 3).

Optou-se por estes padrões, por serem consideradas as ACNs presentes na maioria dos vegetais (Kong *et al.* 2003).



**Figura 6.** Perfil cromatográfico dos padrões analíticos A) Cloreto de pelargonidina, B) Cloreto de cianidina e C) Cloreto de delfinidina.

Ocorreram variações nos tempos de retenção ( $T_R$ ), ocasionados por fatores externos. Para garantir a confiabilidade dos resultados, optou-se por passar os padrões analíticos diariamente, antes do início das análises. Assim foi possível monitorar o deslocamento dos picos e identificá-los em cada amostra analisada. Os dados cromatográficos contendo  $T_R$ , altura, largura e área dos picos estão disponíveis nos Anexos.

### 3.8. Determinação de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) foliar

Para preparação do extrato vegetal foram utilizadas folhas de 10 plantas que foram cortadas em pequenos fragmentos formando uma mistura composta. Amostras de 200 mg de massa fresca foram trituradas em nitrogênio líquido e, posteriormente, transferidas para tubos tipo Eppendorf, aos quais foram acrescentados 1 ml de água deionizada. Estas amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado nas quantificações de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  endógeno. Este procedimento foi realizado em triplicata.

A quantificação de  $\text{NH}_4^+$  endógeno foi determinada de acordo com o método fenol-hipoclorito, utilizando-se dois reagentes (A e B) (Weatherburn 1967, Mccullough 1967). O reagente A foi constituído de fenol ( $10 \text{ g.L}^{-1}$ ) e nitroprusside de sódio ( $50 \text{ mg.L}^{-1}$ ), enquanto o reagente B continha  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  ( $53,7 \text{ g.L}^{-1}$ ), hipoclorito de sódio (10-14%  $\text{Cl}_2$ ) ( $10 \text{ mL.L}^{-1}$ ) e NaOH ( $5 \text{ g.L}^{-1}$ ). Para análise, 200  $\mu\text{L}$  do extrato (sobrenadante) foi transferido para tubo tipo Eppendorf ao qual foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  - reagente A e 500  $\mu\text{L}$  - reagente B. Após

agitação em vortex por 10 segundos, a mistura permaneceu em banho-maria a 35 °C por 35 minutos. As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 625 nm.

A quantificação de  $\text{NO}_3^-$  endógeno foi realizada de acordo com o método descrito por Cataldo *et al.* (1975). A análise foi realizada com 20  $\mu\text{L}$  de extrato, ao qual foi adicionado 80  $\mu\text{L}$  da solução de ácido salicílico 5% (p/v) diluído em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Após agitação em vortex por 10 segundos, os tubos permaneceram em temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, foi adicionado lentamente 1.900  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$  2 N para elevar o pH a 12. As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 410 nm.

### 3.9. Atividade de enzimas antioxidantes

Para preparação do extrato foram utilizados 200 mg de tecido foliar fresco (coletado as 10h – período de luz) homogeneizado em 2 ml de solução de extração contendo 1M de tampão fosfato de potássio (pH 7,5), 1 mM de  $\text{EDTA-Na}_2$ , 50 mM de  $\text{NaCl}$ , 1 mM de ácido ascórbico e aproximadamente 2% PVPP (Souza *et al.* 2013). O material foi centrifugado a 11.000g, em 4 °C por 15 min e o sobrenadante foi mantido a mesma temperatura até a análise.

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1) foi determinada de acordo com Beauchamp & Fridovich (1971) modificado por Balen *et al.* (2009). O sistema de reação (SR) continha 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,8), 0,1 mM  $\text{EDTA-Na}_2$ , 0,075 mM NBT (Sigma Aldrich), 13 mM de metionina e 0,002 mM de riboflavina. A reação ocorreu com a adição de 40  $\mu\text{L}$  de extrato em 960  $\mu\text{L}$  de SR e posterior exposição a luz fluorescente (23 watts) por 6 min. A atividade de SOD foi determinada a 560 nm e expressa em unidades (U)  $\text{mg}^{-1}$  de proteína. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a redução de 50% NBT por minuto.

A atividade da catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) foi mensurada de acordo com Luck (1974) com algumas modificações. O sistema de reação (SR) continha 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,5) e 15 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A reação ocorreu com a adição de 100  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático em 900  $\mu\text{L}$  de SR. A atividade baseava-se no consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 240 nm por 2 min e foi calculada com o coeficiente de extinção de  $0,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  e expressa como  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína.

A atividade da enzima glutathione redutase (GR) (EC 1.6.4.2) foi baseada no método de Schaedle & Bassham (1977). O sistema de reação continha 50 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM de glutathione oxidada (GSSG), 0,15 mM de NADPH e 3 mM de  $\text{MgCl}_2$ . A reação ocorreu com a adição de 100  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático em 900  $\mu\text{L}$  de SR, totalizando 1 mL. A atividade foi determinada pelo decréscimo na absorvância a 340 nm por 2 min, devido a

oxidação de NADPH. A atividade foi calculada com o coeficiente de extinção de  $6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  e expressa como  $\text{nmol NADPH} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína.

A atividade da ascorbato peroxidase (APX) (EC 1.11.1.11) foi baseada no método descrito por Nakano & Asada (1981), modificado por Weng *et al.* (2007). O sistema de reação continha 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,0), 0,1mM de EDTA- $\text{Na}_2$ , 0,5 mM de ácido ascórbico e 0,2 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A reação foi iniciada com a adição de 40  $\mu\text{L}$  de extrato em 960  $\mu\text{L}$  de SR totalizando um volume de 1 mL, monitorando o decréscimo da absorbância a 290 nm por 2 min, devido a oxidação do ascorbato. A atividade foi calculada com o coeficiente de extinção de  $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  expressa como  $\mu\text{mol de ascorbato} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína.

As análises enzimáticas (APX, GR e CAT) foram realizadas em espectrofotômetro modelo Ultrospec 3100 pro.

A atividade específica das enzimas foi determinada pela quantificação de proteínas, baseado no método de Bradford (1976) com albumina de soro bovino (Sigma) como padrão.

### **3.10. Análises estatísticas**

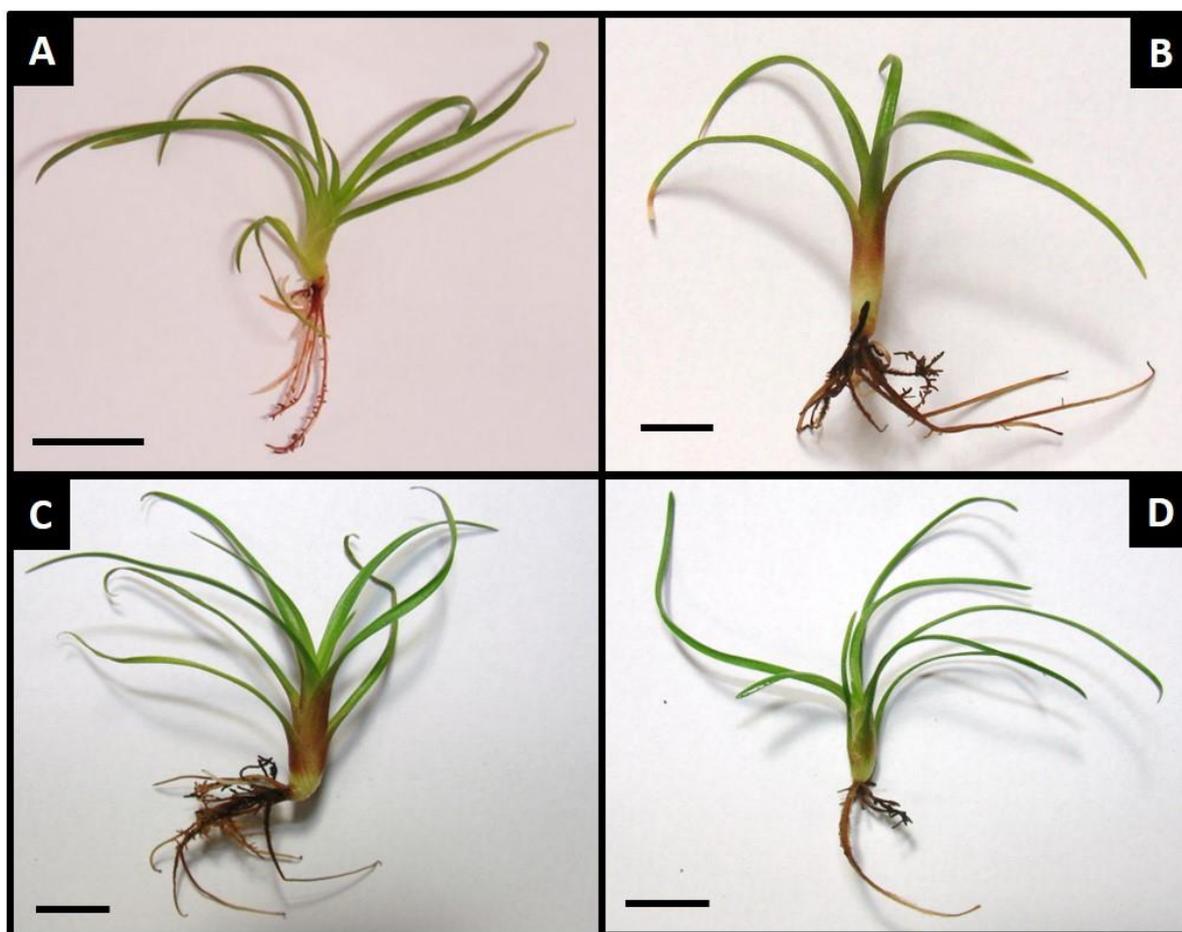
Todos os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade. Para realização das análises foi utilizado o software SISVAR 5.6 (Build 86).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Cultivo *in vitro*

#### 4.1.1. Plantas cultivadas em diferentes concentrações de $\text{NO}_3^-$

##### 4.1.1.1. Antocianinas



**Figura 7.** Presença de antocianinas em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo *in vitro* no meio Murashige & Skoog (MS) com diferentes concentrações de  $\text{NO}_3^-$ . A) Planta controle (TC), B) 3,75 mM de  $\text{NO}_3^-$ , C) 7,50 mM de  $\text{NO}_3^-$  e D) 15,00 mM de  $\text{NO}_3^-$ . Barra = 1 cm.

Ao término do cultivo *in vitro*, constatou-se que plantas mantidas nas concentrações 3,75, 7,50 e 15 mM de  $\text{NO}_3^-$  apresentaram pigmentação rubra, principalmente na face abaxial das folhas (Figura 7). Com análise em HPLC constatou-se a presença de pigmentos antociânicos, confirmando que ACNs são os pigmentos responsáveis por essa coloração (Figure 8). Notou-se que as plantas começaram a apresentar o acúmulo de ACNs (pontos aleatórios) após três meses de cultivo e foi se intensificando até o término do experimento.

As análises cromatográficas indicaram a presença de quatro ACNs nos extratos das plantas de *A. imperialis* (Figure 8). No entanto, com base nos padrões utilizados foi possível identificar apenas a presença dos glicosídeos de pelargonidina, cianidina e delphinidina.

Os resultados indicaram como ACN majoritária um glicosídeo de cianidina (Figura 8). Constatou-se, pelo perfil cromatográfico, que há uma tendência ao acúmulo de ACNs, conforme a disponibilidade de N, ou seja, quanto menor a concentração de N presente no meio, maior o acúmulo de ACNs. Essa tendência se confirma com os valores referentes às áreas dos picos (anexo), assim como, pela quantificação das ACNs identificadas (Tabela 6).

Esse resultado corrobora com os obtidos por Shi & Xie (2010) em trabalho com a espécie *A. thaliana* cultivadas *in vitro* em meios com diferentes concentrações de N. Os autores observaram que conforme a concentração total de N era reduzida (9,4 mM de  $\text{NO}_3^-$ ) aumentava a formação de ACNs.

A mesma tendência foi obtida por Do & Cormier (1990) em estudo com *Vitis vinifera* L. Os autores relataram que o acúmulo de ACNs foi maior quando a concentração de  $\text{NO}_3^-$  passou de 25 mM para 6,25 mM.

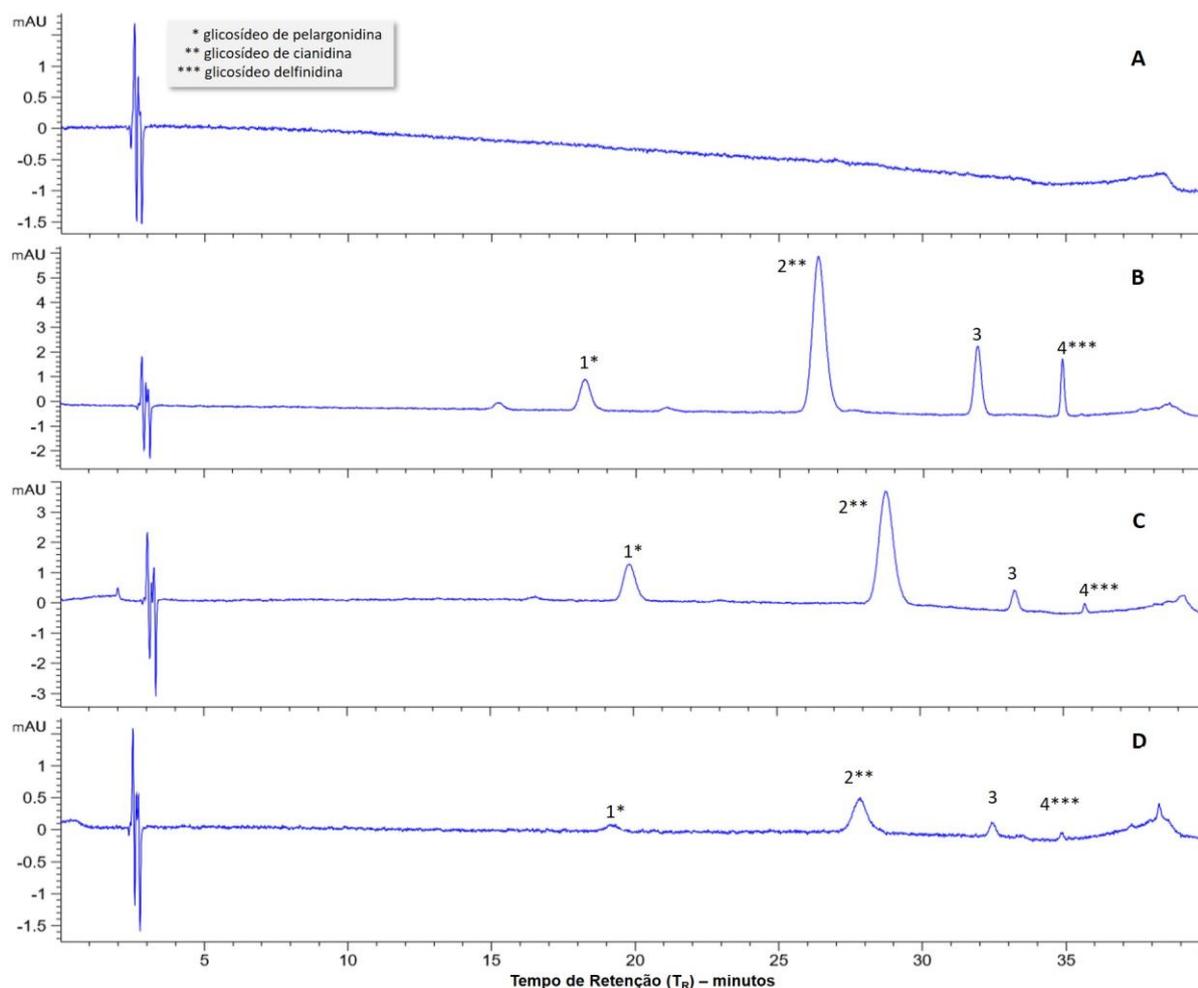
Esta relação entre déficit de N e ACNs também tem sido associada a presença ou ausência de enzimas da rota biossintética, como a dihidroflavonol 4-redutase, considerada uma importante enzima na biossíntese de ACNs (Liang & He 2018), por controlar o fluxo de carbono (Wang *et al.* 2013).

**Tabela 6.** Quantificação das antocianinas identificadas em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms cultivadas *in vitro* por 6 meses sob diferentes concentrações de  $\text{NO}_3^-$  e tratamento controle (TC).

Variável	Tratamentos – $\text{NO}_3^-$			
	TC	3,75 mM	7,50 mM	15 mM
Pelargonidina <sup>1</sup>	0,00 c	0,96 a	1,08 a	0,13 b
Cianidina <sup>1</sup>	0,00 d	2,69 a	1,75 b	0,27 c
Delphinidina <sup>1</sup>	0,00 c	1,13 a	0,22 b	0,05 b

<sup>1</sup>Glicosídeo. Valores em  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\text{MF}$ .

Letras distintas na linha indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Figura 8.** Cromatogramas de antocianinas em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo *in vitro* em meio de cultura Murashige & Skoog (MS) com diferentes concentrações de  $\text{NO}_3^-$ . A) Tratamento controle (TC), B) 3,75 mM  $\text{NO}_3^-$ , C) 7,50 mM  $\text{NO}_3^-$  e D) 15,00 mM  $\text{NO}_3^-$ . Números indicam a quantidade de picos e presença de antocianinas. \*glicosídeo de pelargonidina (pico 1), \*\*glicosídeo de cianidina (pico 2) e \*\*\*glicosídeo de delfinidina (pico 4).

#### 4.1.1.2. Biometria e biomassa

As plantas de *A. imperialis* responderam eficientemente ao cultivo *in vitro* sob as diferentes concentrações de  $\text{NO}_3^-$  (Tabela 2). Os resultados mostraram que houve um crescimento diferenciado entre os tratamentos.

Plantas mantidas no tratamento contendo 3,75 mM de  $\text{NO}_3^-$  apresentaram o menor número de folhas sadias ( $6,0 \pm 0,6$ ) (Tabela 7) e várias folhas senescentes. Este aumento na senescência foliar indica que o N foi redistribuído das folhas basais para as folhas mais jovens, sugerindo que as plantas mantidas neste tratamento estavam sob estresse nutricional pela baixa disponibilidade de N. Para as plantas mantidas nos tratamentos 7,5 e 15 mM de  $\text{NO}_3^-$  não houve diferença para este parâmetro (Tabela 7). Aoyama *et al.* (2014) verificaram que plantas de *A. imperialis* quando cultivadas *in vitro* em meio MS/2 (equivalente a 30 mM

de N) por 6 meses apresentaram cerca de 12 folhas por planta. Esse resultado mostra que a quantidade de folhas não sofre influência significativa entre 7,5 e 30 mM de N.

As concentrações de N não influenciaram no comprimento das folhas, entretanto, ao comparar os resultados com os obtidos no TC percebe-se que as concentrações foram positivas ao crescimento foliar, pois as plantas mantidas em meio contendo apenas  $\text{NO}_3^-$  como fonte de N apresentaram um maior comprimento foliar (Tabela 7). Este resultado pode demonstrar uma tendência a preferência pelo íon  $\text{NO}_3^-$ , pois na composição do TC a fonte nitrogenada continha  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  em uma concentração superior (60 mM de N). Amaral *et al.* (2009) e Ferreira *et al.* (2007), estudando o efeito de diferentes concentrações de N nas bromélias *Aechmea blanchetiana* e *Neoregelia cruenta* não encontraram esta tendência, sendo que os autores observaram um aumento linear na altura da planta, conforme o aumento nas doses de N, assim como para a espécie *A. imperialis* (Tabela 7)., Silva *et al.* (2012) não constataram diferenças no acúmulo de massa da parte aérea em plantas da bromélia terrícola *Ananas comosus* var. *ananassoides* (Baker) LB Sm. cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de N ( $0 \leq N \leq 175 \text{mM}$ ).

Os tratamentos com as diferentes concentrações de  $\text{NO}_3^-$  influenciaram na composição do sistema radicular. O número de raízes foi superior nas plantas mantidas nas menores concentrações (3,75 e 7,50 mM) (Tabela 7). Os resultados para os tratamentos 15 mM de N e TC (Tabela 7) corroboram com os dados obtidos por Mollo *et al.* (2011) ao trabalharem com a mesma espécie em meio MS/2 (concentração equivalente a 30 mM de N). Esses resultados sugerem que acima de 15 mM de N o número de raízes não aumenta mais. Em relação ao comprimento, ocorreu uma redução linear das raízes, conforme o incremento de N no meio. Esta tendência corrobora com os dados de Andrade & Tamaki (2016) no trabalho com a bromélia terrícola *Nidularium minutum* Mez cultivada *in vitro* por 180 dias em diferentes concentrações de N ( $0 \leq N \leq 175 \text{mM}$ ).

De acordo com Garnett *et al.* (2009), quando há excesso de sais no meio, o sistema radicular pode apresentar redução, no entanto, as concentrações utilizadas neste trabalho não são consideradas tóxicas para a espécie, pois em trabalho de Kurita & Tamaki (2014) plantas de *A. imperialis* mostraram um ótimo crescimento em 60 mM de N. O incremento de massa seca radicular das plantas mantidas em 7,5 mM de N foi superior aos demais tratamentos, sendo 4,5 vezes maior ao das plantas mantidas em TC (Tabela 7).

A análise do sistema radicular é importante, pois o sucesso no processo de aclimatização depende de um sistema radicular bem desenvolvido.

**Tabela 7.** Crescimento de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo *in vitro* em meio Murashige & Skoog (MS) modificado com diferentes concentrações de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e tratamento controle (TC).

Variável	Tratamentos – NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>			
	TC	3,75 mM	7,50 mM	15,00 mM
Número de folhas	13,5±1,3 a	6,0±0,7 c	10,0±0,8 b	10,0±1,2 b
Número de raízes	6,7±0,8 b	8,0±0,7 a	9,0±1,0 a	6,0±1,1 b
Folha (cm)	4,2±0,3 b	6,2±0,8 a	6,1±0,4 a	6,7±0,4 a
Raiz (cm)	1,7±0,4 c	4,2±1,0 a	3,7±0,9 b	2,0±0,7 c
MF parte aérea (mg)	203,2±3,9 b	216,0±5,0 a	232,6±5,3 a	196,3±3,0 b
MSE parte aérea (mg)	20,6±1,9 a	20,8±1,0 a	22,4±6,2 a	17,3±3,7 b
MF raiz (mg)	12,1±1,1 d	21,2±0,5 c	60,6±1,6 a	31,6±8,0 b
MSE raiz (mg)	2,1±0,7 c	6,6±1,0 b	9,0±1,5 a	3,6±0,7 c

MF = massa fresca; MSE = massa seca.

Letras distintas na linha indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.1.3. Pigmentos fotossintéticos

Para o conteúdo de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides), os resultados indicaram uma tendência ao aumento nos teores, conforme o incremento do N (Tabela 8). Trabalhos envolvendo outras bromélias, não seguiram esta mesma tendência. Silva *et al.* (2017) ao estudarem a espécie *Ananas comosus* var. *ananassoides* em diferentes concentrações de N ( $0 \leq N \leq 175$  mM) não verificaram diferenças significativas entre os tratamentos 7,50 e 60 mM de N. Para a espécie *N. minutum* cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de N ( $0 \leq N \leq 175$  mM), o acúmulo de pigmentos fotossintéticos não apresentou diferenças significativas entre as concentrações 7,50 e 120 mM de N (Andrade & Tamaki 2016).

De acordo com Prado (2008), aumentar a concentração de N aumenta linearmente o teor de clorofila nas folhas. Entretanto, no presente trabalho, houve uma diminuição no conteúdo, tanto de clorofilas como de carotenoides no tratamento contendo 3,75 e 7,5 mM de N. Esse resultado corrobora com os dados de Kurita & Tamaki (2014) que verificaram uma redução nos teores de clorofila *a* e *b*, em plantas de *A. imperialis* cultivadas em diferentes concentrações de N (fontes nitrogenadas NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Estas diferenças no acúmulo de

pigmentos entre as espécies podem estar relacionadas ao hábito e aos requerimentos nutricionais de cada espécie.

Por ser a clorofila uma molécula que possui quatro átomos de N em sua composição, os teores de pigmentos fotossintéticos podem indicar o teor de nitrogênio da planta, contribuindo para análise do estado nutricional. No presente experimento, podemos sugerir o início de uma possível deficiência nutricional nas plantas de *A. imperialis* mantidas nos tratamentos 3,75 mM e 7,50 mM de N (Tabela 8).

O estresse nutricional por deficiência de N, afeta a função e a eficiência fotossintética, assim como diminui os níveis das enzimas do ciclo de Calvin (Terashima & Evans 1988, Sugiharto *et al.* 1990), resultando na indução ou aumento no acúmulo de ACNs foliares em muitas espécies vegetais (Close & Beadle 2003). De acordo com Liang & He (2018), o acúmulo de antocianinas é uma importante resposta bioquímica em plantas com deficiência de N.

**Tabela 8.** Pigmentos fotossintéticos foliares (clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides) em plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo *in vitro* em meio de cultura Murashige & Skoog (MS) com diferentes concentrações de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e tratamento controle (TC).

Variável	Tratamentos – NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>			
	TC	3,75 mM	7,50 mM	15,00 mM
Clorofila <i>a</i>	1171±85 a	822±83 bc	664±24 c	958±83 b
Clorofila <i>b</i>	405±30 a	299±24 b	252±33 b	403±41 a
Carotenoides	262±20 a	202±21 b	161±06 b	253±24 a

Valores em µg.g<sup>-1</sup>MF.

Letras distintas na linha indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.1.4. Nitrato e amônio foliar

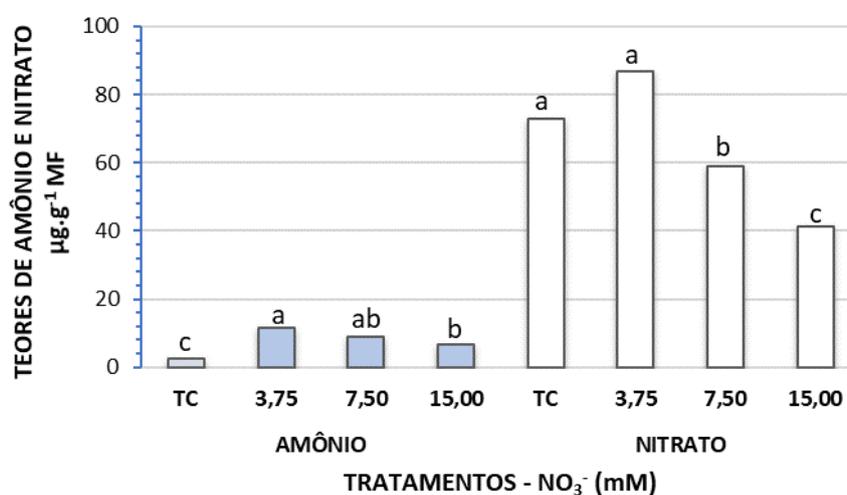
As diferentes concentrações de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> influenciaram de forma significativa no conteúdo endógeno de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Figura 9), cujos valores médios foram 11,6±1,4, 9,1±2,1 e 6,8±1,9 µg.g<sup>-1</sup>MF para os tratamentos 3,75, 7,50 e 15 mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, respectivamente.

Os resultados para o acúmulo de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> mostraram que os maiores teores ocorrem nas plantas mantidas na concentração com 3,75 mM e TC (Figura 9). De acordo com Luz *et al.*

(2008) a quantidade de  $\text{NO}_3^-$  acumulado na planta tem correlação linear com a quantidade fornecida na adubação. Tendência não encontrada para as plantas de *A. imperialis*.

Byrne *et al.* (2002) correlacionaram o maior acúmulo de  $\text{NO}_3^-$  à maior massa fresca em plantas de *Lactuca sativa* L. (alface). Turazi *et al.* (2006) também descreveram esta correlação; para os autores, plantas maiores, com mais massa, apresentam maior teor de N e conseqüentemente de  $\text{NO}_3^-$ . Esta correlação não foi encontrada para *A. imperialis*, pois as diferentes concentrações de N- $\text{NO}_3^-$  não influenciaram no acúmulo de massa das plantas.

Vários fatores podem influenciar no acúmulo de  $\text{NO}_3^-$ , dentre eles, baixa irradiância, temperatura, disponibilidade de N e molibdênio (Mo), além de outros fatores que possam influenciar na fotossíntese (Luz *et al.* 2008).



**Figura 9.** Teores de amônio e nitrato ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$ ) em folhas de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo *in vitro* em meio de cultura Murashige & Skoog (MS) com diferentes concentrações de  $\text{NO}_3^-$  e TC. Letras distintas indicam diferenças significativas dentro de uma mesma variável de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.1.5. Enzimas antioxidantes

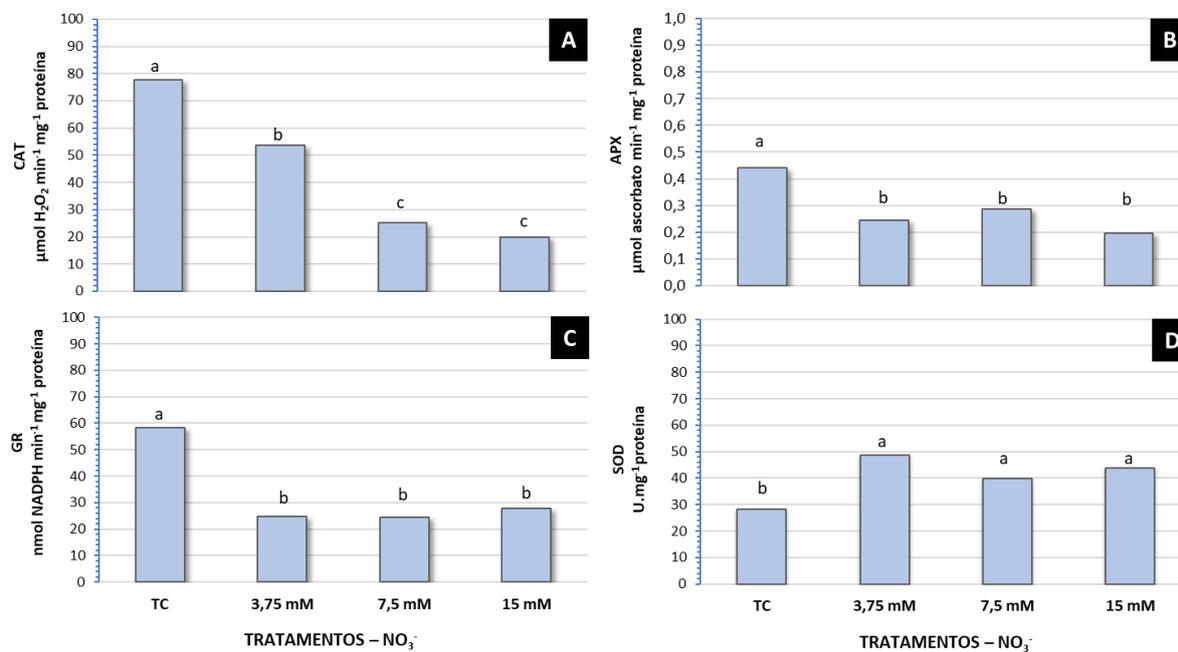
As atividades das enzimas antioxidantes APX, GR e SOD não apresentaram alterações significativas entre os tratamentos com diferentes concentrações de  $\text{NO}_3^-$  (Figura 10-B, C e D).

Segundo Cao *et al.* (2003), quando a fonte nitrogenada é, exclusivamente,  $\text{NO}_3^-$  há uma redução na atividade das peroxidases, conforme foi observado para APX (Figura 10-B) que apresentou menor atividade nas plantas cultivadas em 3,75, 7,5 e 15 mM de  $\text{NO}_3^-$  em relação às plantas mantidas em TC.

Dentre os tratamentos, a CAT apresentou maior atividade nas plantas mantidas na concentração contendo 3,75 mM de  $\text{NO}_3^-$  (Figura 10-A). Este aumento pode estar relacionado ao

maior acúmulo de  $\text{NO}_3^-$  endógeno (Figura 9), pois, quando em excesso, a forma nitrogenada pode influenciar na formação de ROS induzindo estresse oxidativo (Li *et al.* 2013).

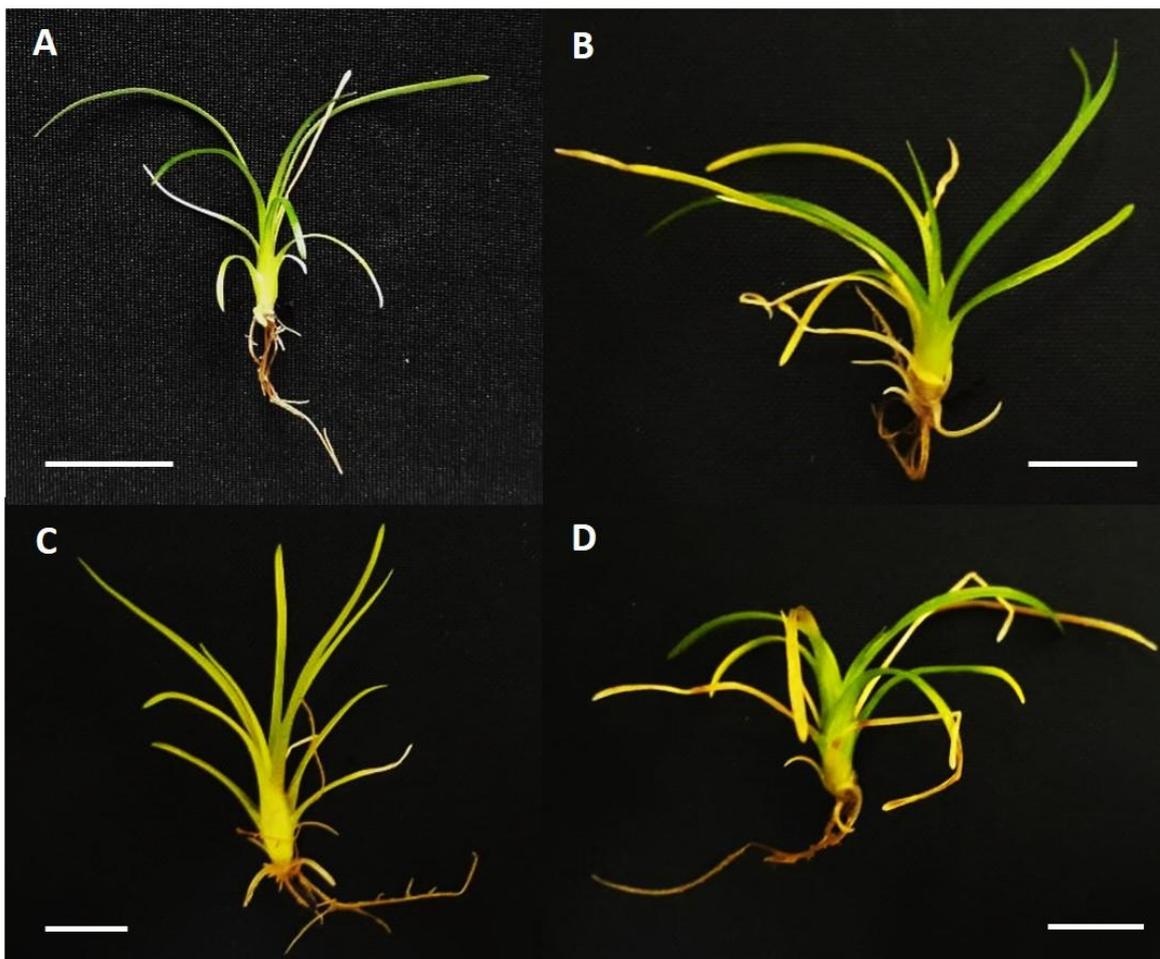
Observou-se que as plantas mantidas no TC apresentaram maior atividade das enzimas CAT, APX e GR, quando comparadas com as plantas cultivadas nas diferentes concentrações de  $\text{NO}_3^-$ .



**Figura 10.** Atividade das enzimas antioxidantes em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo *in vitro* em meio de cultura Murashige & Skoog (MS) com diferentes concentrações de  $\text{NO}_3^-$ . A) Catalase (CAT), B) Ascorbato peroxidase (APX), C) Glutaciona redutase (GR) e D) Superóxido dismutase (SOD). Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 4.1.2. Plantas cultivadas em diferentes concentrações de $\text{NH}_4^+$

### 4.1.2.1. Antocianinas



**Figura 11.** Plantas de *Alcantarea imperialis* após 6 meses de cultivo *in vitro* em meio Murashige & Skoog (MS) com diferentes concentrações de  $\text{NH}_4^+$ . A) Planta controle (TC), B) 3,75 mM de  $\text{NH}_4^+$ , C) 7,50 mM de  $\text{NH}_4^+$  e D) 15,00 mM de  $\text{NH}_4^+$ . Barra = 1 cm.

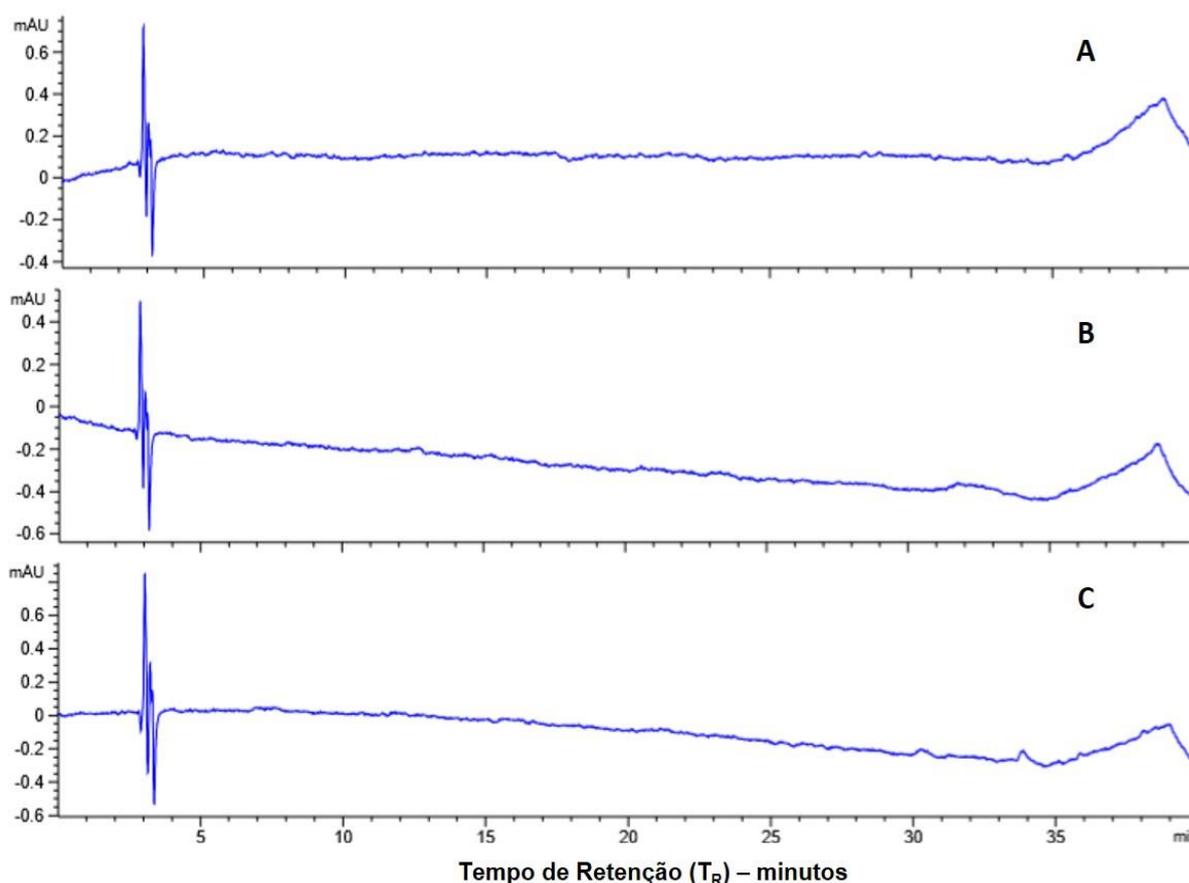
As plantas cultivadas *in vitro* nas concentrações 3,75, 7,5 e 15 mM de  $\text{NH}_4^+$  não apresentaram acúmulo de ACNs, conforme confirmado pelas análises em HPLC (Figura 12).

Segundo Simões *et al.* (2012) há trabalhos que relatam a redução dos teores de ACNs com o aumento na concentração de  $\text{NH}_4^+$  em culturas de suspensão celular de *V. vinifera*, *Daucus carota* (cenoura) e *Euphorbia millii* (coroa-de-cristo).

Mudança na composição das ACNs em *Ipomoea batatas* em função dos níveis de  $\text{NH}_4^+$  no meio de cultura, foi relatada por Konczak-Islam *et al.* (2008). Para os autores a mudança ocorreu devido a inibição de acilações na presença de altas concentrações do íon.

Conforme descrito por Dougall & Frazier (1989), o acúmulo de ACNs é inibido em concentrações superiores a 3 mM de  $\text{NH}_4^+$ .

No presente experimento todas as concentrações estavam acima de 3 mM de  $\text{NH}_4^+$  (Tabela 3) talvez seja este o motivo pelo qual as plantas mantidas nestes tratamentos não acumularam ACNs (Figura 12).



**Figura 12.** Cromatogramas indicando ausência de antocianinas em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo *in vitro* em meio de cultura Murashige & Skoog (MS) com diferentes concentrações de  $\text{NH}_4^+$ . A) 3,75 mM de  $\text{NH}_4^+$ , B) 7,50 mM de  $\text{NH}_4^+$  e C) 15,00 mM de  $\text{NH}_4^+$ .

#### 4.1.2.2. Biometria e biomassa

As plantas mantidas nos tratamentos contendo as concentrações 3,75, 7,5 e 15 mM de  $\text{NH}_4^+$  apresentaram folhas senescentes, assim como folhas com clorose após 6 meses de cultivo *in vitro* (Figura 11).

Durante exposições ao íon  $\text{NH}_4^+$ , as células assimilam o amônio que absorveram, resultando na produção de prótons ( $\text{H}^+$ ), que diminuem o pH citoplasmático e estimulam a  $\text{H}^+$ -ATPases a bombear prótons para fora da célula, principalmente  $\text{H}^+$  (Hedrich & Schoeder

1989), a acidez gerada pode comprometer a absorção de nutrientes essenciais, resultando em sintomas de deficiência, como clorose e folhas senescentes.

Avaliando os resultados biométricos, percebe-se que as concentrações de  $\text{NH}_4^+$  utilizadas influenciaram de forma significativa no comprimento de folhas e raízes, sendo os maiores valores observados nas plantas mantidas em 7,5 mM de  $\text{NH}_4^+$ .

Para o parâmetro número de folhas, as plantas mantidas nas concentrações contendo 7,5 e 15 mM de  $\text{NH}_4^+$  foram as que apresentaram os menores valores (Tabela 9).

As concentrações de  $\text{NH}_4^+$  utilizadas influenciaram nos parâmetros relacionados ao sistema radicular, no entanto, apresentaram resultados inferiores aos das plantas mantidas no TC. De acordo com Li *et al.* (2010) a redução do sistema radicular é comum em plantas cultivadas em solução onde a única forma de N é o  $\text{NH}_4^+$  ou quando este está em excesso.

Embora os resultados para o comprimento das raízes tenham sido inferiores aos das plantas controle (Tabela 9), os valores médios indicam, as concentrações utilizadas ficaram dentro de uma faixa de tolerância. Segundo Li & Shi (2007), concentrações entre 5 a 15 mM de  $\text{NH}_4^+$  não são suficientes para induzir sintomas de toxicidade no cultivo *in vitro*.

Para o acúmulo de massa fresca da parte aérea (Tabela 9), percebe-se que os tratamentos com as diferentes concentrações de  $\text{NH}_4^+$  não apresentaram diferenças significativas entre si, sendo os resultados inferiores ao TC. No entanto, ao observar a matéria seca percebe-se um maior acúmulo de massa nas plantas mantidas nas concentrações 7,5 e 15 mM de  $\text{NH}_4^+$ , com valor estatisticamente iguais.

Li *et al.* (2010) não encontraram diferença na biomassa de *A. thaliana* cultivada em meio de cultura contendo diferentes concentrações de  $\text{NH}_4^+$ . Assim como ocorreu com *A. imperialis*. Cruz *et al.* (2008) e Fallovo *et al.* (2009) constataram em plantas de *Manihot esculenta* (mandioca) e em duas espécies de *Brassica* (nabo e mostarda-da-india), respectivamente, que a adubação com N- $\text{NH}_4^+$  comprometeu o crescimento e o acúmulo de biomassa.

De acordo com Britto & Kronzucker (2002), o íon  $\text{NH}_4^+$  compromete o crescimento de algumas espécies, devido a necessidade de utilização dos carboidratos para a rápida assimilação do amônio absorvido, evitando assim, o acúmulo e problemas de toxicidade devido a alterações no pH celular e desbalanços iônico e hormonal.

O acúmulo de MF e MSE das raízes foram maiores nas plantas cultivadas em meio contendo 7,5 mM de  $\text{NH}_4^+$  (Tabela 9), apresentando valores inferiores para os tratamentos 3,75 e 15 mM. Resultado distinto dos obtidos em plantas de *Bambusa vulgaris* (bambu) que mostraram acúmulo de biomassa, conforme o aumento nas doses  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  durante cultivo em casa de vegetação (Oliveira *et al.* 2008). Estes resultados mostram que as exigências

nutricionais entre as espécies são distintas (Santos *et al.* 2015), portanto, as respostas não seguem uma mesma tendência.

**Tabela 9.** Crescimento de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo *in vitro* em meio Murashige & Skoog (MS) modificado com diferentes concentrações de  $\text{NH}_4^+$  e tratamento controle (TC).

Variável	Tratamentos – $\text{NH}_4^+$			
	TC	3,75 mM	7,50 mM	15,00 mM
Número de folhas	13,5±1,3 a	7,8±1,2 b	6,7±0,7 c	6,7±0,4 c
Número de raízes	6,7±0,8 a	4,3±0,4 b	4,6±0,7 b	5,2±0,6 b
Folhas (cm)	4,2±0,3 b	4,4±0,4 b	5,3±0,4 a	4,8±0,5 b
Raiz (cm)	1,7±0,4 a	0,7±0,2 c	1,3±0,6 b	0,9±0,2 c
MF parte aérea (mg)	203,2±3,9 a	149,6±3,9 b	184,8±3,3 b	155,6±2,4 b
MSE parte aérea (mg)	20,6±1,9 a	13,1±2,7 b	17,0±0,3 ab	17,0±0,5 ab
MF raiz (mg)	12,1±1,1 a	7,6±0,3 b	13,1±0,7 a	6,4±2,0 b
MSE raiz (mg)	2,1±0,7 a	1,0±0,3 b	2,9±1,0 a	1,1±0,6 b

MF = massa fresca; MSE = massa seca

Letras distintas em cada linha, indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.2.3. Pigmentos fotossintéticos

A análise de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides) mostrou que as concentrações de  $\text{NH}_4^+$  não influenciaram nos teores de clorofilas (*a* e *b*) e carotenoides (Tabela 10).

Os teores de clorofila *a* para as plantas mantidas nos tratamentos 3,75, 7,5 e 15 mM de  $\text{NH}_4^+$  foram de 1193±77, 1234±88 e 1034±136  $\mu\text{g.g}^{-1}\text{MF}$ , respectivamente, considerados estatisticamente iguais aos obtidos para as plantas controle (1171±85  $\mu\text{g.g}^{-1}\text{MF}$ ). Os demais pigmentos também não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 10).

Endres & Mercier (2007) avaliaram o conteúdo foliar de clorofila na bromélia *Vriesea gigantea* cultivada em diferentes concentrações de  $\text{NH}_4^+$  (1, 5, 10, 20 e 50 mM) e constataram redução significativa após 5 mM. De acordo com os autores, essa redução pode estar associada a adaptação da espécie a ambientes com baixos níveis de N.

Assim como para *A. imperialis*, Vieira *et al.* (2010) não observaram alterações nos teores foliares de clorofila total em mudas de *Ananas comosus* (L.) Merrill cv. Pérola cultivadas sob diferentes concentrações (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0, 15, 30 e 60 mg.kg<sup>-1</sup>).

Segundo Cruz *et al.* (2008) a resposta fotossintética em adubação exclusiva com NH<sub>4</sub><sup>+</sup> é dependente da espécie. Essa relação fica evidente no trabalho de Endres & Mercier (2007), confirmando que os teores de pigmentos fotossintéticos estão relacionados ao hábito e requerimentos nutricionais de cada espécie.

A diferença constatada para *A. imperialis* entre o conteúdo de pigmentos e a diagnose visual (presença de folhas com coloração clara e algumas senescentes) pode estar relacionado ao fato de terem sido utilizadas para análise apenas folhas saudias. Sabe-se que plantas deficientes em N suprem as folhas mais novas e regiões apicais com os aminoácidos liberados na proteólise das folhas senescentes (Lima Filho & Malavolta 1997). Essa remobilização pode ter contribuído para a manutenção dos pigmentos e por isso os resultados das plantas mantidas com exclusividade de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> foram semelhantes ao das plantas cultivadas com TC (Tabela 10).

**Tabela 10.** Pigmentos fotossintéticos foliares (clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides) em plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo *in vitro* em meio Murashige & Skoog (MS) com diferentes concentrações de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e tratamento controle (TC).

Variável	Tratamentos NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>			
	TC	3,75mM	7,50 mM	15,00 mM
Clorofila <i>a</i>	1171±85 a	1193±77 a	1234±88 a	1034±136 a
Clorofila <i>b</i>	405±30 a	436±35 a	443±23 a	385±42 a
Carotenoides	262±20 a	267±50 a	318±40 a	268±27 a

Valores em µg.g<sup>-1</sup>MF.

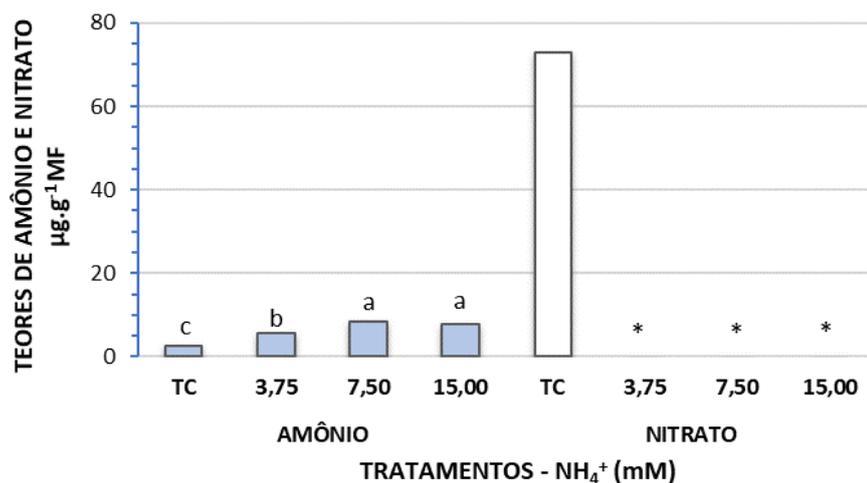
Letras distintas em cada linha, indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.2.4. Nitrato e amônio foliar

Em relação ao conteúdo de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> foliar, as plantas mantidas nas concentrações 7,5 e 15 mM de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> apresentaram resultados semelhantes com médias de 8,3±0,6 e 7,8±0,6 µg.g<sup>-1</sup>MF, respectivamente, sendo estes valores superiores ao obtidos nas plantas cultivadas em 3,75 mM que apresentaram 5,5±0,4 µg.g<sup>-1</sup> MF (Figura 13). Embora o TC contenha em sua formulação uma concentração maior de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, os resultados mostram que as plantas

cultivadas neste tratamento tiveram o menor acúmulo de amônio, quando comparadas aos resultados dos demais tratamentos. Este resultado pode estar relacionado a formulação do meio, pois contém as duas fontes nitrogenadas de forma balanceada.

As plantas cultivadas nas diferentes concentrações de  $\text{NH}_4^+$  não apresentaram acúmulo de  $\text{NO}_3^-$  nos tecidos foliares, pois não foram utilizados sais contendo nitrato no meio de cultura.



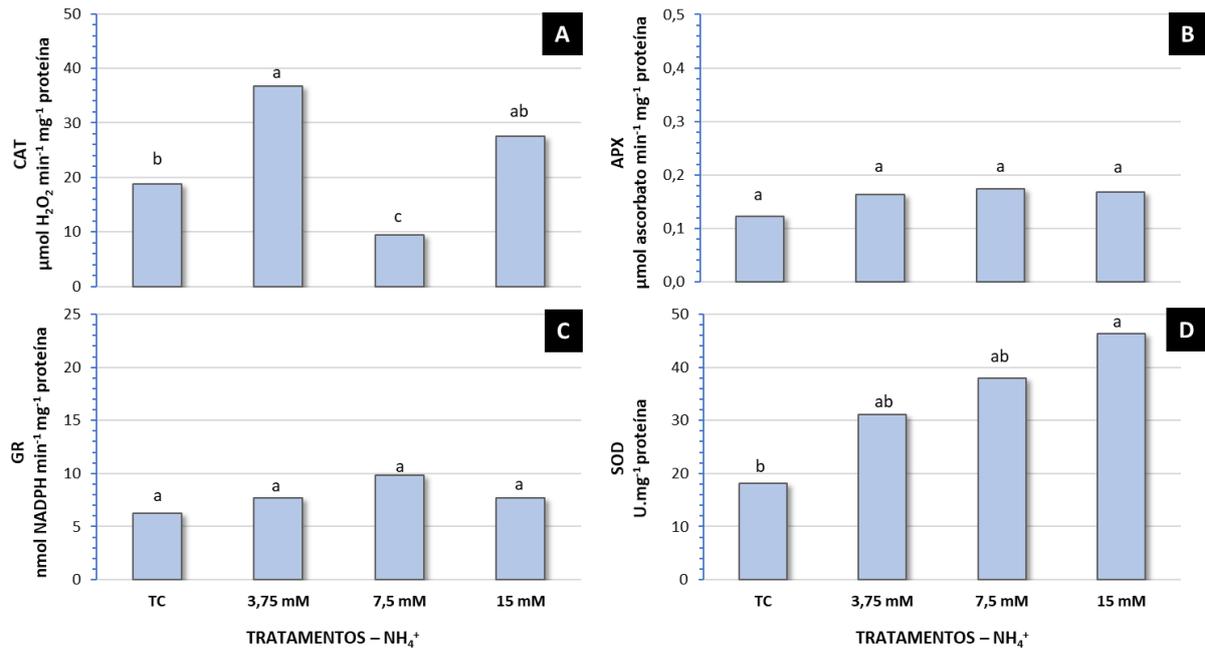
**Figura 13.** Teores de amônio e nitrato ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$ ) em folhas de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo *in vitro* em meio de cultura Murashige & Skoog (MS) com diferentes concentrações de  $\text{NH}_4^+$  e TC. \* Não houve acúmulo. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.2.5. Enzimas antioxidantes

Em relação a atividade antioxidante, não foram constatadas diferenças entre os tratamentos para as enzimas APX e GR (Figura 14-B e C). Enquanto a CAT apresentou elevada atividade nas plantas mantidas no tratamento contendo 3,75 mM de  $\text{NH}_4^+$ , indicativo de elevadas concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 14-A).

Os resultados da SOD indicam uma correlação entre o incremento da fonte nitrogenada e a atividade da enzima (Figura 14-D). Houve uma tendência ao aumento da atividade, conforme as concentrações  $\text{NH}_4^+$  aumentaram, sugerindo uma maior produção de ROS.

De acordo com Zhang *et al.* (2006) quando o  $\text{NH}_4^+$  está presente no meio de cultivo há um aumento na atividade desta enzima. Segundo os mesmos autores, se a solução nutritiva conter  $\text{N-NO}_3^-$  há uma redução na atividade, conforme resultados obtidos para a atividade das plantas mantidas em TC, cuja formulação possui  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^-$  (Figura 14-D).



**Figura 14.** Atividade das enzimas antioxidantes em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carri\u00e8re) Harms ap\u00f3s 6 meses de cultivo *in vitro* em meio de cultura Murashige & Skoog (MS) com diferentes concentra\u00e7\u00f5es de  $\text{NH}_4^+$ . A) Catalase (CAT), B) Ascorbato peroxidase (APX), C) Glutaciona redutase (GR) e D) Super\u00f3xido dismutase (SOD). Letras distintas indicam diferen\u00e7as significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 4.1.3. Plantas cultivadas em diferentes concentrações de $\text{NH}_4\text{NO}_3$

#### 4.1.3.1. Antocianinas



**Figura 15.** Presença de antocianinas em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo *in vitro* em meio Murashige & Skoog (MS) com diferentes concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . A) Planta controle (TC), B) 3,75 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , C) 7,50 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e D) 15,00 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Barra = 1 cm.

As plantas cultivadas em todos os tratamentos (3,75 mM, 7,5 mM e 15 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) apresentaram a presença de ACNs foliares (Figura 15).

O acúmulo do pigmento tornou-se visível após três meses de cultivo, seguindo o mesmo padrão das plantas mantidas em  $\text{NO}_3^-$  (Figura 7), pontos aleatórios na superfície abaxial das folhas que foram se intensificando até o término do experimental.

As análises cromatográficas indicaram a presença de 06 (seis) ACNs, das quais 03 (três) foram identificadas como glicosídeos de cianidina, pelargonidina e delfinidina (Figura

16). Notou-se pelo perfil cromatográfico (Figura 16), uma correlação negativa entre o acúmulo de ACNs e a menor disponibilidade de N, pois os maiores picos ocorreram nas plantas cultivadas em 3,75 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , indicando maiores concentrações dos pigmentos. Essa tendência se confirma com os valores referentes as áreas dos picos (anexo). Ichiishi *et al.* (1999) observaram em *Dionea muscipula* Ellis e *Drosera spathulata* Labill. cultivadas *in vitro* que a redução de N do meio MS intensificava o acúmulo de antocianinas foliares nestas duas espécies de plantas carnívoras.

Com a análise quantitativa constatamos como ACN majoritária uma cianidina, seguida por pelargonidina e delphinidina (Tabela 11).

Os resultados obtidos para *A. imperialis* corroboram com outros trabalhos que relacionaram a fornecimento de N ao acúmulo de ACNs (Do & Cormier 1990, Shi & Xie 2010, Zhou *et al.* 2012, Liang & He 2018).

Mesmo havendo a presença de sais de  $\text{NH}_4^+$  na formulação destes tratamentos, constatou-se que os teores de ACNs foliares em plantas de *A. imperialis* foram maiores dos que os obtidos em plantas cultivadas apenas em  $\text{NO}_3^-$ .

Segundo Konczak-Islam *et al.* (2008) ao reduzir a proporção de  $\text{NH}_4^+$  em relação ao  $\text{NO}_3^-$ , obtém-se maiores teores de ACNs em plantas cultivadas *in vitro*. Esta relação foi constatada em cultura de células de *Cleome rosea* mantidas em meio MS modificado com a proporção 1:4 de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  (Simões *et al.* 2009).

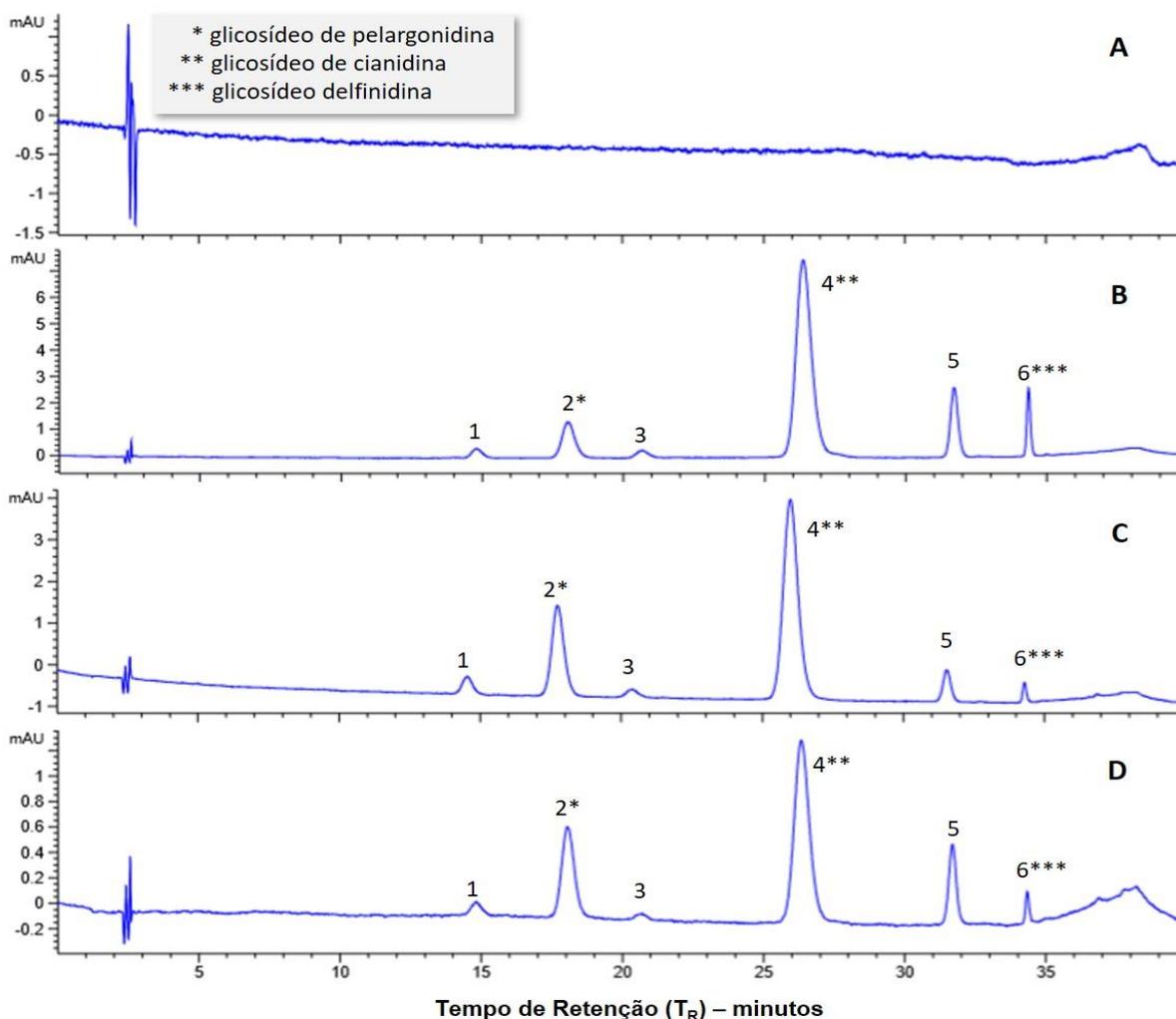
Baseando-se nestes relatos e nos resultados obtidos para *A. imperialis*, constatamos que o ideal é que as duas fontes nitrogenadas estejam presentes no meio de cultivo.

**Tabela 11.** Quantificação das antocianinas identificadas em folhas de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms cultivadas *in vitro* por 6 meses sob diferentes concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e tratamento controle (TC).

Variável	Tratamentos – $\text{NH}_4\text{NO}_3$			
	TC	3,75 mM	7,50 mM	15 mM
Pelargonidina <sup>1</sup>	0,00 d	1,39 b	2,15 a	0,76 c
Cianidina <sup>1</sup>	0,00 d	3,98 a	2,46 b	0,73 c
Delphinidina <sup>1</sup>	0,00 c	1,34 a	0,25 b	0,13 b

<sup>1</sup>Glicosídeos. Valores em  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  MF.

Dentro de cada linha, letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Figura 16.** Cromatogramas de antocianinas em folhas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo *in vitro* em meio de cultura Murashige & Skoog (MS) com diferentes concentrações de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. A) Tratamento controle (TC), B) 3,75 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, C) 7,50 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e D) 15,00 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. Números indicam a quantidade de picos e presença de antocianinas. \*glicosídeo de pelargonidina (pico 2) \*\*glicosídeo de cianidina (pico 4) e \*\*\*glicosídeo de delfinidina (pico 6).

#### 4.1.3.2. Biometria e biomassa

As diferentes concentrações de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (Tabela 4) influenciaram no crescimento das plantas de *A. imperialis* cultivadas *in vitro* durante os 6 meses de cultivo (Tabela 12).

Para os parâmetros relacionados a parte aérea, o tratamento contendo 15 mM de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> resultou em plantas com maior comprimento ( $7,3 \pm 0,7$  cm) e quantidade folhas ( $10,6 \pm 1,3$ ). No entanto, os dados referentes ao acúmulo de massas mostraram que o tratamento com 7,5 mM de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> foi o mais adequado para as plantas com  $32,7 \pm 5,3$  mg MSE (Tabela 12).

Alterações nas concentrações de N não influenciaram na quantidade de folhas em plantas da bromélia *Vriesea incurvata* entre 3,75 e 30 mM de N (Droste *et al.*, 2016).

Resultado distinto do obtido com *A. imperialis* que apresentou maior quantidade de folhas em 15 mM de N, assim como em TC, cuja formulação continha 60 mM de N.

Em relação ao sistema radicular, a maior quantidade de raízes ( $7,7 \pm 1,2$ ), assim como o comprimento ( $4,4 \pm 0,9$  cm) resultaram das plantas que permaneceram no tratamento com 15 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Diferentemente da parte aérea, o maior acúmulo de massas ocorreu nas plantas mantidas nos tratamentos 7,5 e 15 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , não apresentando diferenças significativas entre eles (Tabela 12).

**Tabela 12.** Crescimento de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo *in vitro* em meio Murashige & Skoog (MS) modificado com diferentes concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e tratamento controle (TC).

Variável	Tratamentos – $\text{NH}_4\text{NO}_3$			
	TC	3,75 mM	7,50 mM	15,00 mM
Número de folhas	$13,5 \pm 1,3$ a	$8,2 \pm 0,9$ b	$8,5 \pm 0,8$ b	$10,6 \pm 1,3$ a
Número de raízes	$6,7 \pm 0,8$ b	$5,6 \pm 0,8$ c	$5,7 \pm 0,8$ c	$7,7 \pm 1,2$ a
Folhas (cm)	$4,2 \pm 0,3$ b	$3,4 \pm 0,2$ c	$3,4 \pm 0,2$ c	$7,3 \pm 0,7$ a
Raiz (cm)	$1,7 \pm 0,4$ b	$1,5 \pm 0,1$ b	$1,4 \pm 0,1$ b	$4,4 \pm 0,9$ a
MF parte aérea (mg)	$203,2 \pm 3,9$ b	$58,0 \pm 5,1$ c	$356,5 \pm 6,3$ a	$244,4 \pm 8,7$ b
MSE parte aérea (mg)	$20,6 \pm 1,9$ b	$5,6 \pm 1,1$ c	$32,7 \pm 5,3$ a	$21,2 \pm 7,3$ b
MF raiz (mg)	$12,1 \pm 1,1$ b	$16,5 \pm 4,5$ b	$67,3 \pm 7,5$ a	$27,6 \pm 1,5$ b
MSE raiz (mg)	$2,1 \pm 0,7$ b	$2,0 \pm 0,5$ b	$10,5 \pm 3,1$ a	$9,9 \pm 0,7$ a

MF = massa fresca; MSE = massa seca.

Dentro de cada linha, letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.3.3. Pigmentos fotossintéticos

Os teores de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a* e *b*) apresentaram uma tendência ao aumento, conforme o incremento de N no meio de cultura (Tabela 13). De acordo com Prado (2008), este resultado é o esperado quando há um maior fornecimento do nutriente à planta. Para os carotenoides, os maiores teores resultaram das plantas mantidas no tratamento 15 mM de  $\text{NH}_4^+\text{NO}_3^-$  com  $402 \pm 5$   $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{MF}$ . Para as concentrações 3,75 e 7,5 mM os teores foram semelhantes (Tabela 13).

Tamaki *et al.* (2007) cultivaram plantas de *Ananas comosus* (L.) Merrill obtidas a partir de segmentos nodais em meio MS e diluições (0,6 mM, 1 mM, 6 mM, 12 mM, 30 mM e 60 mM de N) e não constataram diferenças entre as concentrações 12 e 60 mM de N.

Resultado semelhante foi encontrado por Silva *et al.* (2017) para a bromélia *A. comosus* var. *ananasssoides* quando cultivada *in vitro* entre as concentrações 7,5 e 60 mM de N. Plantas de *Aniba rosaeodora* Ducke (pau-rosa) também não apresentaram diferenças nos teores de clorofila *a*, *b* e carotenoides quando cultivadas sob diferentes concentrações de N (Barreto *et al.* 2007).

**Tabela 13.** Pigmentos fotossintéticos foliares (clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides) em plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo *in vitro* em meio Murashige & Skoog (MS) com diferentes concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e tratamento controle (TC).

Variável	Tratamentos – $\text{NH}_4\text{NO}_3$			
	TC	3,75 mM	7,50 mM	15,00 mM
Clorofila <i>a</i>	1171±85 a	694±35 c	753±20 bc	835±11 b
Clorofila <i>b</i>	405±30 a	284±6 c	303±12 bc	332±22 b
Carotenoides	262±20 b	182±9 c	185±26 c	402±5 a

Valores em  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$ .

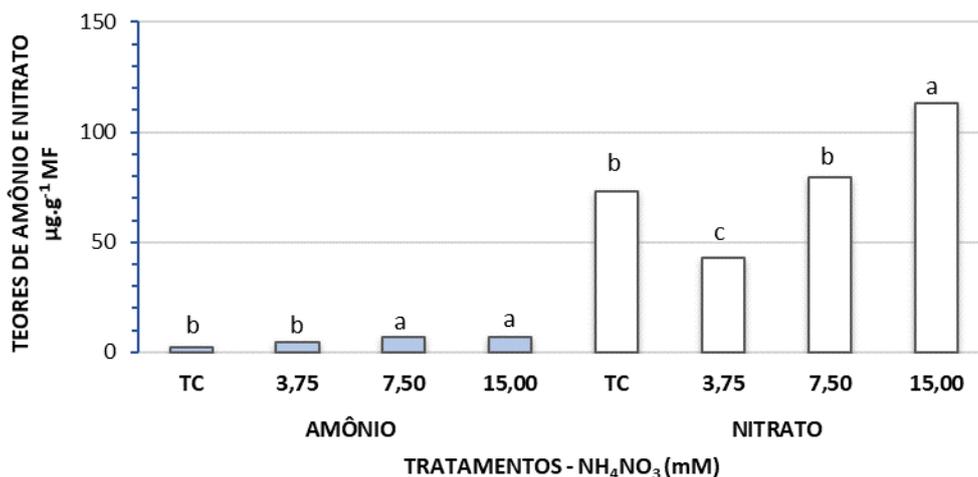
Dentro de cada linha, letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.3.4. Nitrato e amônio foliar

Os teores endógenos de  $\text{NH}_4^+$  foram maiores nas plantas mantidas nos tratamentos 7,5 e 15 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  com  $7,1\pm 1,5$  e  $6,9\pm 0,7$   $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$ , respectivamente (Figura 17).

Para o conteúdo de  $\text{NO}_3^-$  houve um aumento nos valores médios, conforme o incremento de N (Figura 17). Tendência observada em clones da bromélia *A. comosus* quando cultivada em meio MS e suas diluições (Tamaki *et al.* 2007).

O incremento nos teores de nitrato tende a acompanhar o incremento da fonte nitrogenada fornecida na adubação (Luz *et al.* 2008).



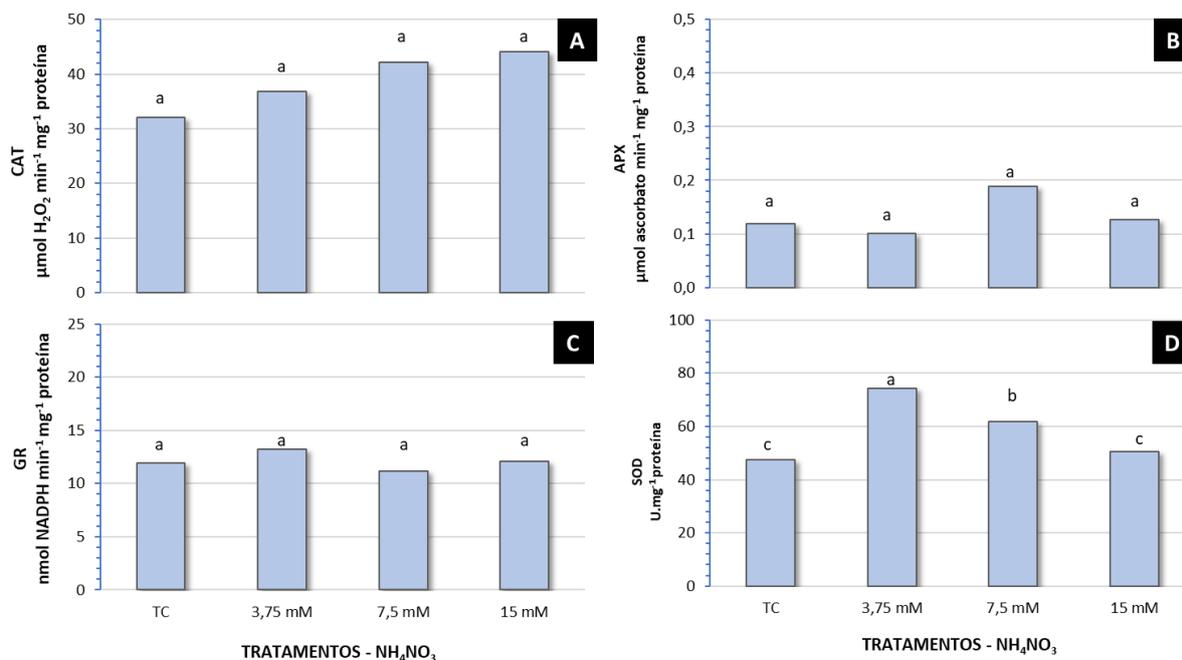
**Figura 17.** Teores de amônio e nitrato ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$ ) em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo *in vitro* em meio de cultura Murashige & Skoog (MS) com diferentes concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e TC. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.3.5. Enzimas antioxidantes

Em relação ao sistema antioxidante, constatou-se uma tendência ao aumento na atividade da CAT, conforme o aumento na disponibilidade de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  no meio de cultivo, apesar de não ter apresentado diferenças significativas. Para as enzimas APX e GR não foi constatado diferenças nas atividades que possam ser relacionadas a concentração da fonte nitrogenada (Figura 18).

A SOD foi a única que apresentou diferenças entre os tratamentos, tendo uma maior atividade nas plantas cultivadas em 3,75 mM, decaindo conforme o aumento das concentrações (Figura 18).

Zhang *et al.* (2006) avaliaram os efeitos das fontes  $\text{N-NO}_3^-$  e  $\text{N-NH}_4^+$  no cultivo de espinafre e constataram uma diminuição da atividade de SOD, conforme o aumento na proporção de  $\text{NO}_3^-$  em relação ao  $\text{NH}_4^-$ . Resultado que corrobora com os obtidos neste experimento, pois conforme o aumento da concentração total de N, há um aumento nas concentrações de  $\text{NO}_3^-$  em relação ao  $\text{NH}_4^-$ .



**Figura 18.** Atividade das enzimas antioxidantes em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carri\u00e8re) Harms ap\u00f3s 6 meses de cultivo *in vitro* em meio de cultura Murashige & Skoog (MS) com diferentes concentra\u00e7\u00f5es de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . A) Catalase (CAT), B) Ascorbato peroxidase (APX), C) Glutathiona redutase (GR) e D) Super\u00f3xido dismutase (SOD). Letras distintas indicam diferen\u00e7as significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.4. Plantas cultivadas *in vitro* sob alta PAR

##### 4.1.4.1. Antocianinas

Dos fatores ambientais que podem influenciar na biossíntese de ACNs, a luz está entre os mais importantes. Conforme mencionado anteriormente, vários trabalhos já descreveram a correlação positiva entre os níveis de irradiância e o acúmulo de ACNs.

Simões *et al.* (2012) relataram estudos que relacionaram a PAR na produção de ACNs no cultivo *in vitro*. Entretanto, a exposição à alta PAR não apresentou resultados significativos para o acúmulo de ACNs em folhas de *A. imperialis* (Figura 19). De todas as plantas mantidas nesta condição de cultivo, menos de 10% apresentou acúmulo do pigmento.

Esperava-se um percentual maior, uma vez que a luz é considerada o fator externo que mais influência na biossíntese de ACNs; em função da fotoativação de muitas enzimas envolvidas na síntese, através do sistema fitocromo (Cruz *et al.* 2012). Mas este resultado comprova a adaptação desta espécie a alta PAR, e que a coloração rubra independe desta condição .

Mesmo tendo apresentado menos de 10% de plantas com folhas rubras, optou-se por analisar, visto que o padrão de pigmentação foi distinto das plantas cultivadas *in vitro* nas diferentes concentrações de N sob  $50 \mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  de PAR. A distribuição ocorreu em pontos aleatórios, porém presentes nas superfícies adaxial e abaxial. De acordo com Hatier & Gould (2007) a coloração pode abranger toda a lâmina, ser restrita as margens ou ainda em manchas ou pontos aleatórios tanto na face adaxial, quanto abaxial.

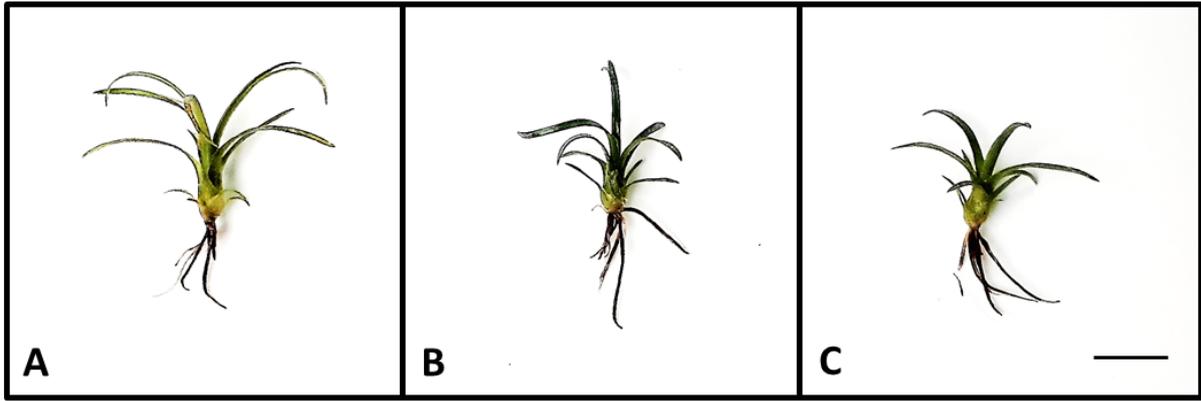
O acúmulo de ACNs em plantas expostas a alta irradiância de fótons, geralmente ocorre em tecidos periféricos (Steyn *et al.* 2002).

Mesmo não havendo um padrão definido para a presença de ACNs foliares, sugere-se que esta mudança no padrão de distribuição esteja relacionada ao fator indutor, sugerindo proteção contra a fotoinibição devido à alta irradiância.

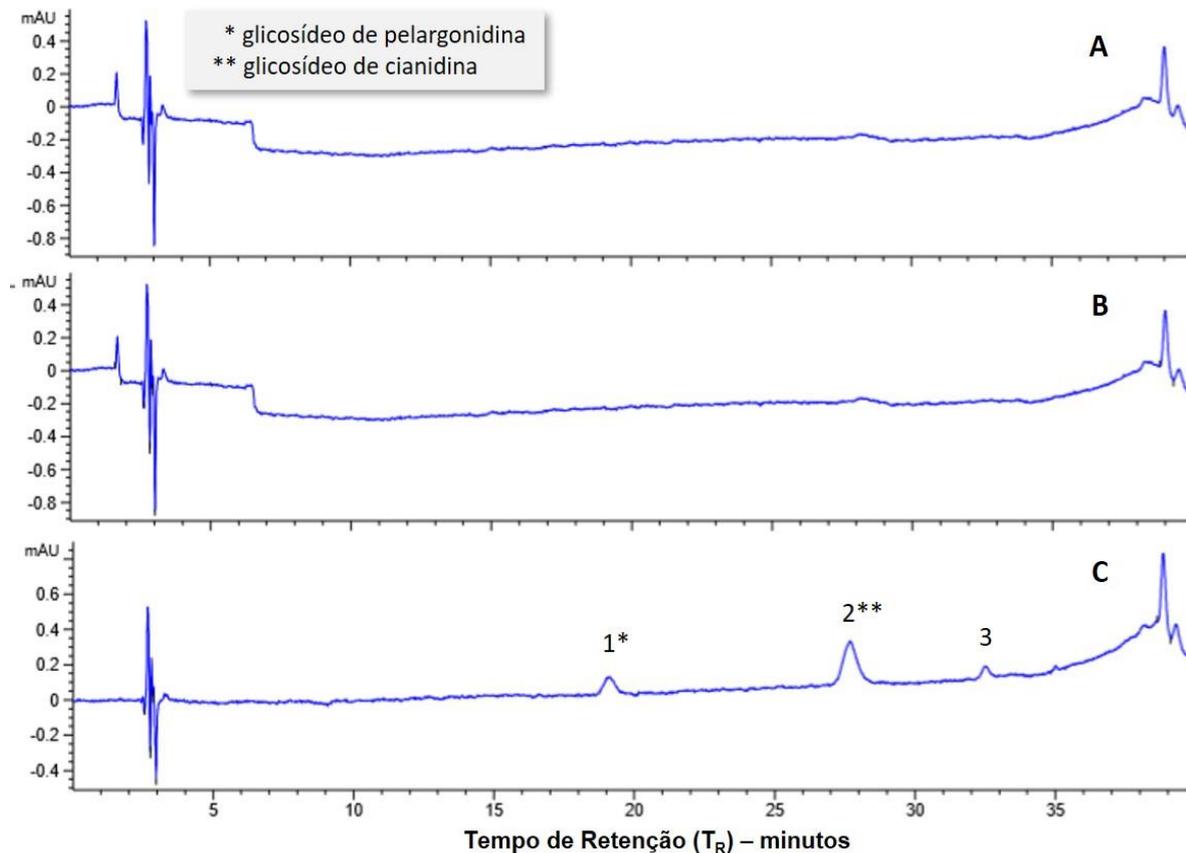
ACNs adaxiais atenuam a incidência de luz protegendo as células da fotoinibição em ambientes de alta luminosidade (Close & Beadle 2003, Gould 2004).

A análise cromatográfica dessas plantas indicou a presença de 03 picos, dos quais 02 que foram identificados como glicosídeos de pelargonidina e cianidina (Figura 20).

Os teores dos glicosídeos identificados não apresentaram diferenças significativas entre si (Tabela 14).



**Figura 19.** Plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo *in vitro* em alta PAR ( $700 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). A) Planta controle cultivada em  $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  – sem antocianinas, B) Planta verde cultivada em  $700 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  – sem antocianinas e C) Planta com antocianina cultivada em  $700 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Barra = 1 cm.



**Figura 20.** Cromatograma de antocianinas em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo *in vitro* sob alta PAR ( $700 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). A) Plantas controle ( $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), B) Plantas verdes - alta PAR e C) Plantas rubras - alta PAR.

**Tabela 14.** Quantificação das antocianinas identificadas em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms cultivadas após 6 meses de cultivo *in vitro* sob alta PAR ( $700 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) e controle ( $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ).

Variável	Condições de cultivo	
	TC	PAR
Pelargonidina <sup>1</sup>	0,00 b	0,11 a
Cianidina <sup>1</sup>	0,00 b	0,12 a

<sup>1</sup>Glicosídeo. Valores em  $\mu\text{g.ml}^{-1}\text{MF}$ .

Dentro de cada coluna, letras distintas indicam diferenças significativas entre as variáveis de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.4.2. Biometria e biomassa

Os resultados para a análise de crescimento das plantas expostas a alta PAR foram de  $12,5 \pm 1,0$  folhas e  $7,4 \pm 1,0$  raízes com  $3,6 \pm 0,5$  cm e  $2,2 \pm 0,4$  cm de comprimento, respectivamente.

Em relação ao acúmulo de massa, para a parte aérea os valores foram  $204,6 \pm 10,0$  e  $15,9 \pm 3,0$   $\text{mg.planta}^{-1}$  de MF e MSE, respectivamente. Enquanto nas raízes os valores foram de  $16,8 \pm 1,0$   $\text{mg.planta}^{-1}$  MF e  $2,1 \pm 0,6$   $\text{mg.planta}^{-1}$  MSE.

Os resultados foram semelhantes aos obtidos com as plantas controle (Tabela 15). Plantas de *Lactuca sativa* var. youmaicai (alface) cultivadas sob variações na intensidade luminosa ( $60$ ,  $140$  e  $220 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) apresentaram incremento da biomassa, conforme aumento da irradiância (Fu *et al.* 2017).

Pelos parâmetros biométricos e acúmulo de massas percebe-se que a alta PAR no cultivo *in vitro* influencia pouco no crescimento de plantas *A. imperialis* (Tabela 15).

**Tabela 15.** Crescimento de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo *in vitro* sob alta PAR (700  $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ ) e controle (50  $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ ).

Parâmetros	Tratamentos	
	Controle	PAR
Número de folhas	13,5±1,3 a	12,5±1,0 a
Número de raízes	6,7±0,8 a	7,4±1,0 a
Folha (cm)	4,2±0,3 a	3,6±0,5 b
Raiz (cm)	1,7±0,4 b	2,3±0,4 a
MF parte aérea (mg)	202,2±3,0 a	204,6±10,0 a
MSE parte aérea (mg)	21,1±1,0 a	15,9±3,0 b
MF raiz (mg)	13,4±0,5 b	16,8±1,0 a
MSE raiz (mg)	2,3±0,9 a	2,1±0,6 a

MF = massa fresca; MSE = massa seca.

Dentro de cada linha, letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.4.3. Pigmentos fotossintéticos

As análises de pigmentos fotossintéticos demonstraram aumento significativo nos teores de clorofila *a* e *b*, assim como carotenoides nas plantas mantidas sob alta irradiância (Tabela 16).

Diferentemente dos resultados obtidos neste experimento, variações na intensidade luminosa (60, 140 e 220  $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ ) no cultivo de plantas *L. sativa* resultaram no decréscimo do conteúdo das clorofilas (Fu *et al.* 2017).

Em plantas de *Solanum lycopersicum* (tomate) variações na intensidade de luz (50, 150, 200, 300, 450 e 550  $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ ) resultaram no aumento da taxa fotossintética líquida, conforme o aumento da irradiância, mostrando uma correlação positiva entre a taxa fotossintética e o aumento da intensidade luminosa (Fan *et al.* 2013).

Por ser a *A. imperialis* uma bromélia que cresce naturalmente sob alta intensidade luminosa (costão rochoso), esses resultados parecem comprovar que as plantas desta espécie são adaptadas a alta PAR.

**Tabela 16.** Pigmentos fotossintéticos foliares (clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides) em plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo *in vitro* sob alta PAR (700  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) e controle (50  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ).

Variável	Tratamentos	
	Controle	PAR
Clorofila <i>a</i>	1259±221 b	1379±226 a
Clorofila <i>b</i>	437±51 b	548±105 a
Carotenoides	307±40 b	385±82 a

Valores em  $\mu\text{g.g}^{-1}\text{MF}$ .

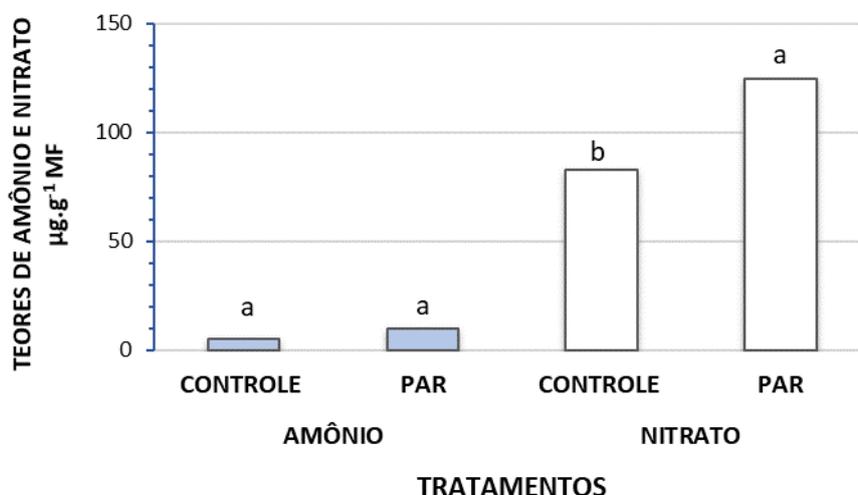
Dentro de cada linha, letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.4.4. Amônio e nitrato foliar

Os teores de  $\text{NH}_4^+$  endógeno das plantas mantidas em alta PAR não sofrem influência da alta irradiância, sendo os resultados semelhantes aos das plantas controle (Figura 18). No entanto, os valores para o conteúdo de  $\text{NO}_3^-$  foram superiores nas plantas mantidas sob alta PAR (Figura 18).

Sabe-se que a intensidade luminosa é um dos fatores ambientais que mais afeta a assimilação do  $\text{NO}_3^-$  pelas plantas, devido a relação de dependência da enzima nitrato redutase com a luz (Xu *et al.* 2012). Logo, o esperado seria que o maior acúmulo de  $\text{NO}_3^-$  resultasse das plantas controle (baixa intensidade luminosa), devido à redução da atividade enzimática. Sendo assim, sugere-se que acúmulo de  $\text{NO}_3^-$  nas plantas cultivadas sob alta PAR ocorreu pela influência de outro fator.

Uma possibilidade é o aumento da taxa de transpiração. Fallovo *et al* (2009) associaram o acúmulo de nitrato foliar em plantas de duas espécies de *Brassica* cultivadas sob alta PAR a um aumento na taxa de transpiração, que pode ter reduzido a temperatura foliar, assim como a atividade da enzima nitrato redutase.



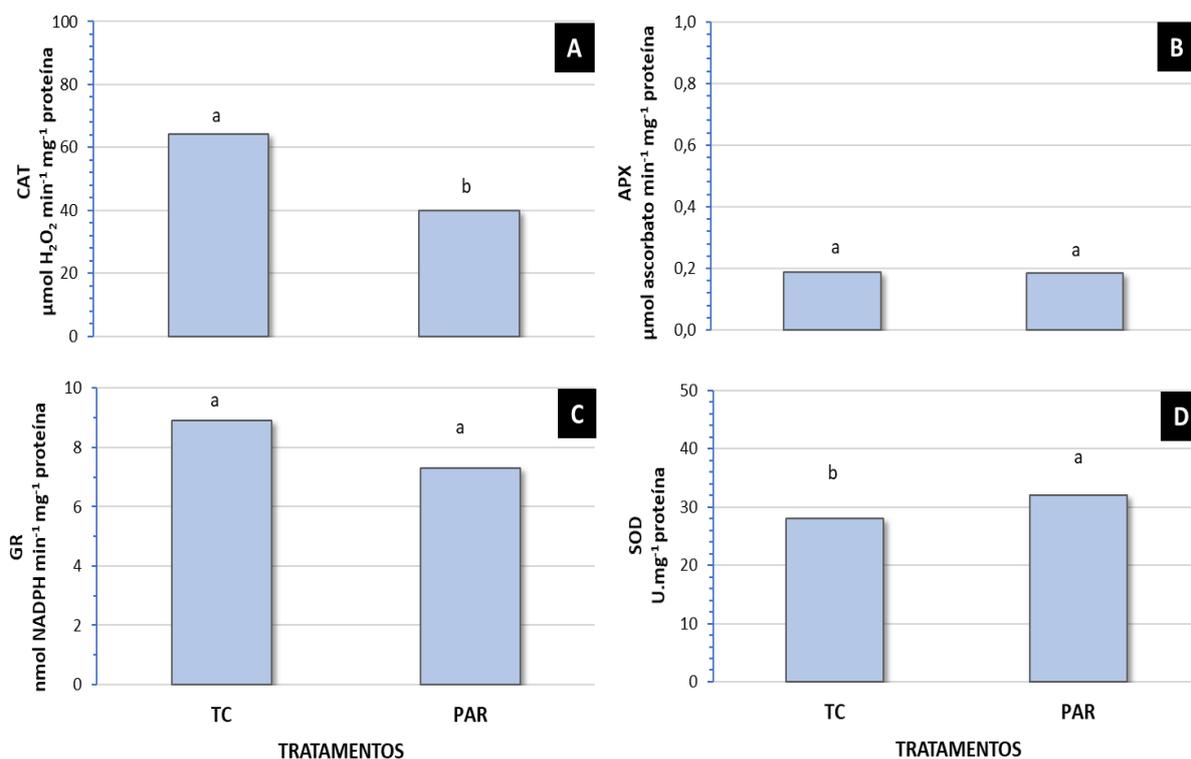
**Figura 21.** Teores de amônio e nitrato ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$ ) em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo *in vitro* sob alta PAR ( $700 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) e controle ( $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.4.5. Enzimas antioxidantes

A atividade da enzima CAT em plantas mantidas sob alta PAR foi inferior ao das plantas controle (Figura 22-A). Este resultado sugere que a produção e acúmulo de ROS em *A. imperialis* é maior quando as plantas estão expostas à baixa irradiância. No entanto, os resultados não apresentaram diferenças significativas para APX e GR (Figura 22-B e C).

Altas atividades da CAT indicam eficiência na conversão do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$ , não sendo necessário o aumento da atividade das enzimas do ciclo ascorbato – glutatona, por isso não houve alterações na atividade das enzimas APX e GR.

A enzima SOD apresentou maior atividade nas plantas cultivadas em alta PAR (Figura 22-D). Resultado esperado, pois a alta luminosidade está entre as condições de estresse que aumentam a atividade desta enzima em várias espécies vegetais (Buchanan *et al.* 2015)



**Figura 22.** Atividade das enzimas antioxidantes em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carri\u00e8re) Harms ap\u00f3s 6 meses de cultivo *in vitro* sob alta PAR ( $700 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) e controle ( $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). A) Catalase (CAT), B) Ascorbato peroxidase (APX), C) Glutaciona redutase (GR) e D) Super\u00f3xido dismutase (SOD). Letras distintas indicam diferen\u00e7as significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

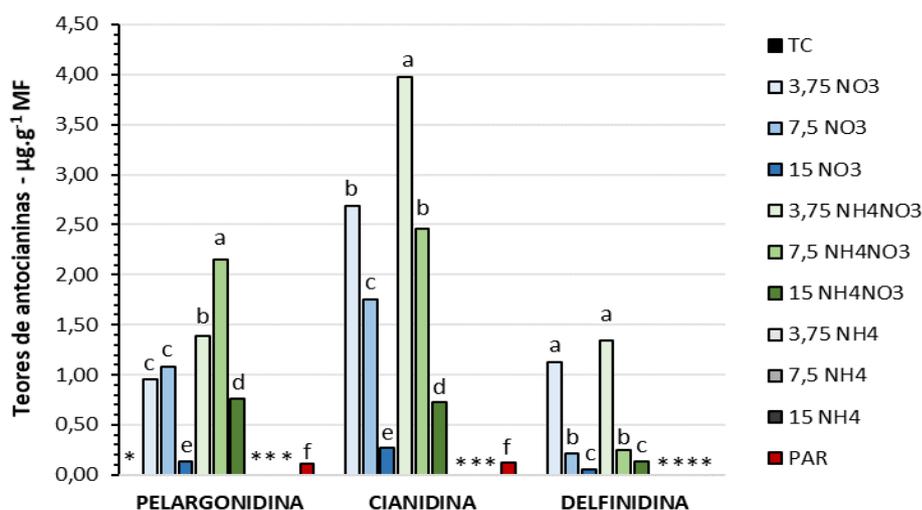
#### 4.1.5. Comparativo dos resultados obtidos no cultivo *in vitro*

Os resultados obtidos na comparação entre os experimentos com as fontes nitrogenadas e alta PAR mostraram que o nitrogênio o fator que mais influenciou no acúmulo de ACNs em plantas de *A. imperialis* (Figura 23). Conforme descrito anteriormente, dentre as fontes de N utilizadas apenas  $\text{NH}_4^+$  não influenciou no acúmulo de ACNs.

Ao avaliar os resultados em conjunto, constatou-se que independente da fonte ( $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) o acúmulo do pigmento seguiu a mesma tendência para os três glicosídeos identificados (Figura 23).

Para os glicosídeos de cianidina e delphinidina os teores foram maiores na menor concentração de N (3,75 mM), diminuindo conforme o incremento do nutriente (Figura 23). No entanto, o glicosídeo de pelargonidina, não seguiu a mesma tendência. Para esta ACN os maiores teores ocorreram em plantas cultivadas na concentração 7,5 mM de N.

Por fim, avaliando estes resultados (Figura 23) percebe-se que a fonte  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  foi a que mais influenciou no acúmulo de ACNs em plantas de *A. imperialis* durante o cultivo *in vitro*.

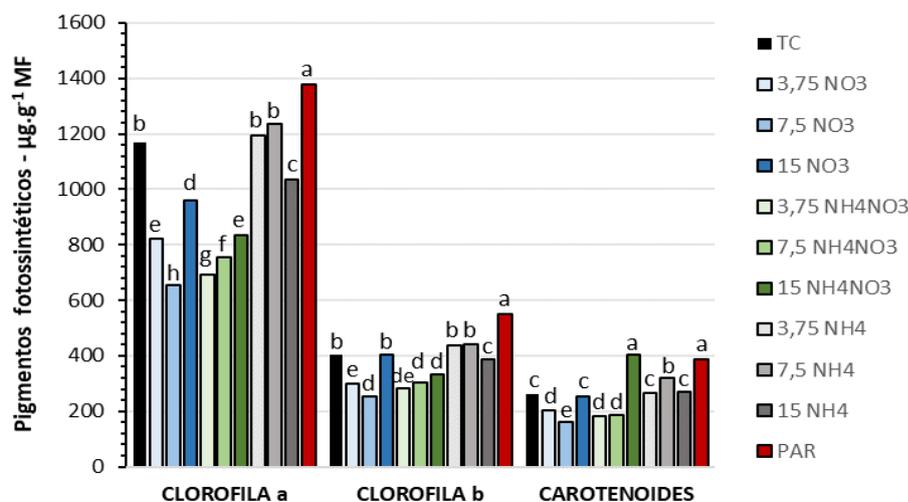


**Figura 23.** Antocianinas foliares identificadas em folhas de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms cultivadas *in vitro* por 6 meses nos experimentos com diferentes fontes nitrogenadas ( $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) e radiação fotossinteticamente ativa (PAR). Letras distintas indicam diferenças significativas dentro de uma mesma variável de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). \*Plantas não acumularam antocianinas.

Observando os teores de pigmentos fotossintéticos, constatou-se que as plantas com acúmulo de ACNs ( $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) apresentaram redução nos teores de clorofilas (Figura 23). Este resultado poderia ser considerado como o esperado, pois em trabalhos com doses crescentes de N, espera-se uma correlação positiva entre os teores de clorofilas e o incremento da fonte nitrogenada (Prado 2008); tendência encontrada para essas plantas.

No entanto, ao verificar que o conteúdo destes pigmentos foram inferiores aos obtidos em plantas cultivadas com exclusividade de  $\text{NH}_4^+$ , sugere-se que este resultado esteja relacionado a presença de ACNs. Isso porque em plantas cultivadas com N amoniacal, esperam-se teores reduzidos de clorofila devido a diminuição da biomassa em função da degradação foliar, pela presença de clorose e senescência (Helali *et al.* 2010).

De acordo com Karageorgou & Manetas (2006), folhas vermelhas tendem a apresentar menor atividade fotossintética e maior capacidade de dissipação de energia, indicando que os resultados obtidos para plantas rubras de *A. imperialis* podem estar relacionados a presença de ACNs.



**Figura 24.** Pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides) em folhas de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms cultivadas *in vitro* por 6 meses nos experimentos com diferentes fontes nitrogenadas ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) e radiação fotossinteticamente ativa (PAR). Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Após verificar o tratamento mais eficiente para o acúmulo de ACNs foi analisado os dados referentes as variáveis comprimento foliar e massa seca das partes aérea e radicular, a fim de constatar qual tratamento influenciou de forma significativa no crescimento das plantas (Figura 25).

As maiores folhas resultaram das plantas cultivadas em 15 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , seguido das plantas mantidas em 15 mM de  $\text{NO}_3^-$ . Notou-se que as plantas mantidas nas concentrações 3,75 e 7,5 mM não apresentaram diferenças significativas entre si, tanto para o experimento  $\text{NO}_3^-$ , quanto  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Os resultados do tratamento contendo  $\text{NH}_4^+$  mostraram plantas com folhas menores em relação ao tratamento contendo apenas  $\text{NO}_3^-$ .

De acordo com alguns autores, a redução no comprimento foliar em plantas adubadas com  $\text{NH}_4^+$  pode ser atribuída à diminuição da absorção de elementos essenciais como o

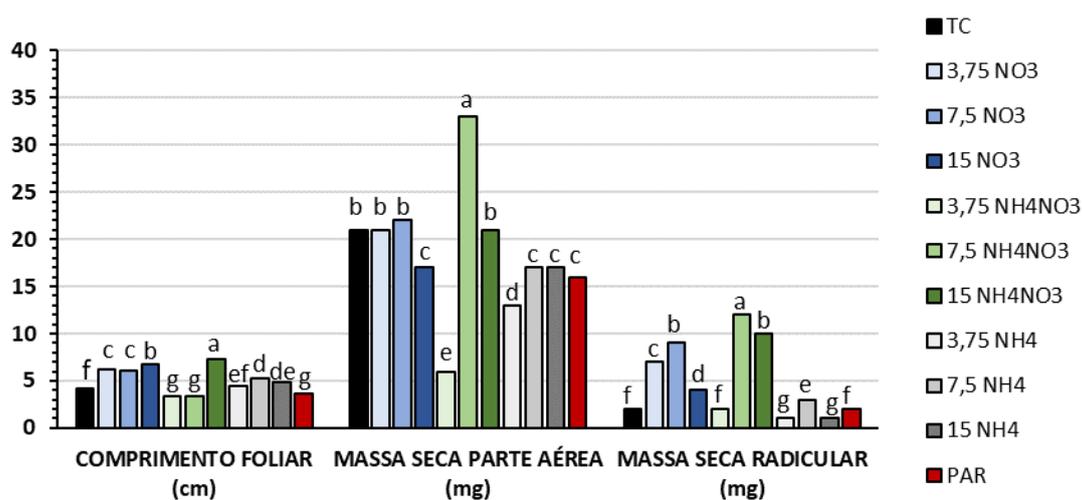
potássio ( $K^+$ ), cálcio ( $Ca^{2+}$ ) e magnésio ( $Mg^{2+}$ ) (Helali *et al.* 2010, Andrews *et al.* 2013), refletindo de forma negativa na regulação osmótica, que é importante para expansão celular (Guo *et al.* 2007).

Em relação a biomassa, a concentração que mais influenciou foi 7,5 mM  $NH_4NO_3$ , apresentando os maiores valores tanto para a parte aérea, quanto radicular. O resultado obtido para a concentração 3,75 mM de  $NH_4NO_3$  chamou a atenção, por ser o tratamento com o menor acúmulo de massa, apresentando valores inferiores aos das plantas cultivadas com amônio, que geralmente apresenta menor acúmulo de massa, quando comparado ao cultivo com outras fontes nitrogenadas (Britto & Kronzucker 2002).

Analisando os resultados obtidos nas variáveis utilizadas nesta comparação, entende-se que 3,75 mM de  $NH_4NO_3$  não foi uma concentração adequada ao cultivo de *A. imperialis*, embora tenha apresentado altos teores de ACNs. De acordo com os resultados, sugere-se que a concentração não supriu às exigências nutricionais das plantas.

Yuan *et al.* (2009) investigaram o controle regulatório da produção de ACNs em oito cultivares (verde e roxo) de *Brassica oleracea* var. *capitata*. Ao examinarem a expressão de genes biossintéticos e reguladores de ACNs, constataram que ao serem expostos a estresse nutricional (ausência de N ou P) a expressão dos genes, assim como o acúmulo de ACNs, aumentou tanto em repolho verde quanto vermelho, indicando uma relação entre o estresse nutricional e acúmulo de ACNs.

Vale ressaltar que as plantas cultivadas no experimento com alta PAR apresentaram valores inferiores a maioria das fontes e concentrações de N (Figura 25).



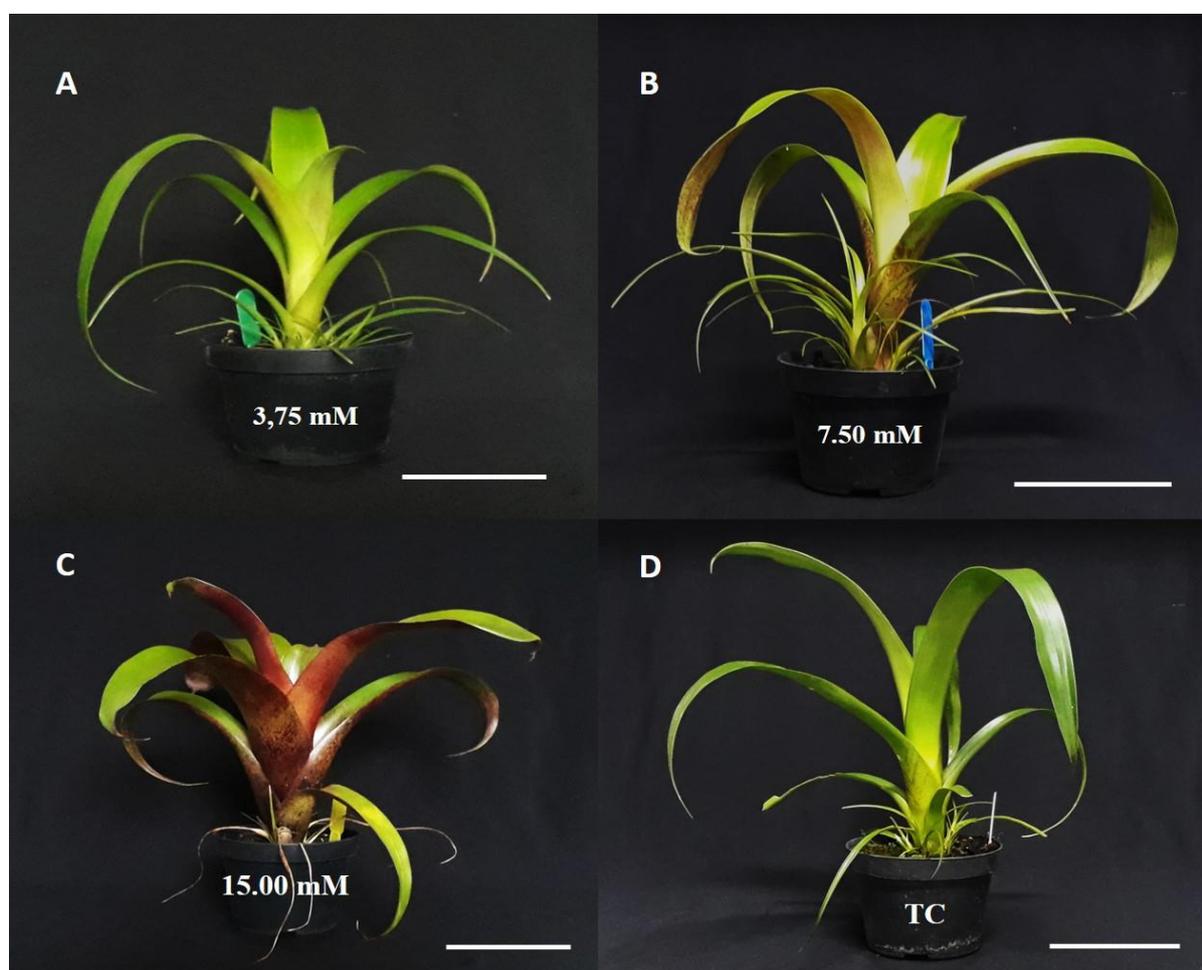
**Figura 25.** Comprimento foliar (cm), massa seca da parte aérea e radicular ( $mg.g^{-1}MS$ ) de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms cultivadas *in vitro* por 6 meses nos experimentos com diferentes fontes nitrogenadas ( $NO_3^-$ ,  $NH_4^+$  e  $NH_4NO_3$ ) e radiação fotossinteticamente ativa (PAR). Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 4.2. Aclimatização das plantas rubras obtidas no cultivo *in vitro*

As plantas cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  responderam bem ao processo de aclimatização com 100% de sobrevivência, confirmando que bromélias obtidas *in vitro*, não apresentam dificuldades para aclimatização, tal como relatado por Mercier & Kerbaux (1994). Como as plantas cultivadas em diferentes concentrações de  $\text{NH}_4^+$  não apresentaram acúmulo de ACNs e o experimento com alta PAR não apresentou resultado satisfatório, não foi realizado o processo de aclimatização, conforme previsto e descrito no item 3.3.3.

### 4.2.1. Plantas cultivadas com $\text{NO}_3^-$

#### 4.2.1.1. Antocianinas



**Figura 26.** Presença de antocianinas em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 12 meses de cultivo em casa de vegetação sob adubação com diferentes concentrações  $\text{NO}_3^-$ . A) 3,75 mM de  $\text{NO}_3^-$ , B) 7,50 mM de  $\text{NO}_3^-$ , C) 15,00 mM de  $\text{NO}_3^-$  e D) Planta controle (TC). Barra = 10 cm.

Em relação ao acúmulo de ACNs, a coloração se manteve nas plantas cultivadas nos tratamentos com alterações de N durante todo o experimento (Figura 26). Embora as plantas tenham mantido a coloração rubra, percebeu-se uma tendência distinta do cultivo *in vitro*, ou seja, o maior acúmulo de pigmentos não ocorreu nas plantas supridas com menos N, e sim, nas plantas mantidas em 15 mM de N (Tabela 17).

Avaliando os dados cromatográficos (anexo) foi possível verificar que todos os picos apresentaram aumento na concentração de ACNs, conforme o incremento de N. Resultado semelhante foi obtido por Simões-Gurgel *et al.* (2011) ao trabalharem com suspensão de células de *Cleome rosea* em meio MS e diluições (MS ½ e MS ¼). Os autores verificaram que o maior acúmulo de ACNs ocorreu nas células mantidas em MS ½ e não na menor concentração (MS ¼).

Ainda que a presença de ACNs tenha se intensificado com o aumento na disponibilidade de N ( $3,75 \leq 7,50 \leq 15,00$  mM), essa tendência não se manteve para as plantas mantidas em TC (60 mM de N) (Figura 26).

A ausência de ACNs em plantas cultivadas com 60 mM de N, pode estar relacionada com as fontes de N utilizadas na composição do adubo, ou seja,  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ . Conforme relatado por alguns autores, a presença de  $\text{NH}_4^+$  na solução de cultivo influencia de forma negativa na produção e acúmulo de ACNs (Simões *et al.* 2012, Konczak-Islam *et al.* 2008, Dougall & Frazier 1989).

**Tabela 17.** Quantificação das antocianinas identificadas em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms cultivadas em casa de vegetação por 12 meses em diferentes concentrações de  $\text{NO}_3^-$  e tratamento controle (TC).

Variável	Tratamentos – $\text{NO}_3^-$			
	TC	3,75 mM	7,50 mM	15 mM
Pelargonidina <sup>1</sup>	0,00 c	1,17 b	1,01 b	14,00 a
Cianidina <sup>1</sup>	0,00 c	1,08 b	1,68 b	5,35 a
Delfinidina <sup>1</sup>	0,00 c	0,63 b	1,30 a	1,72 a

<sup>1</sup>Glicosídeo. Valores em  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\text{MF}$ .

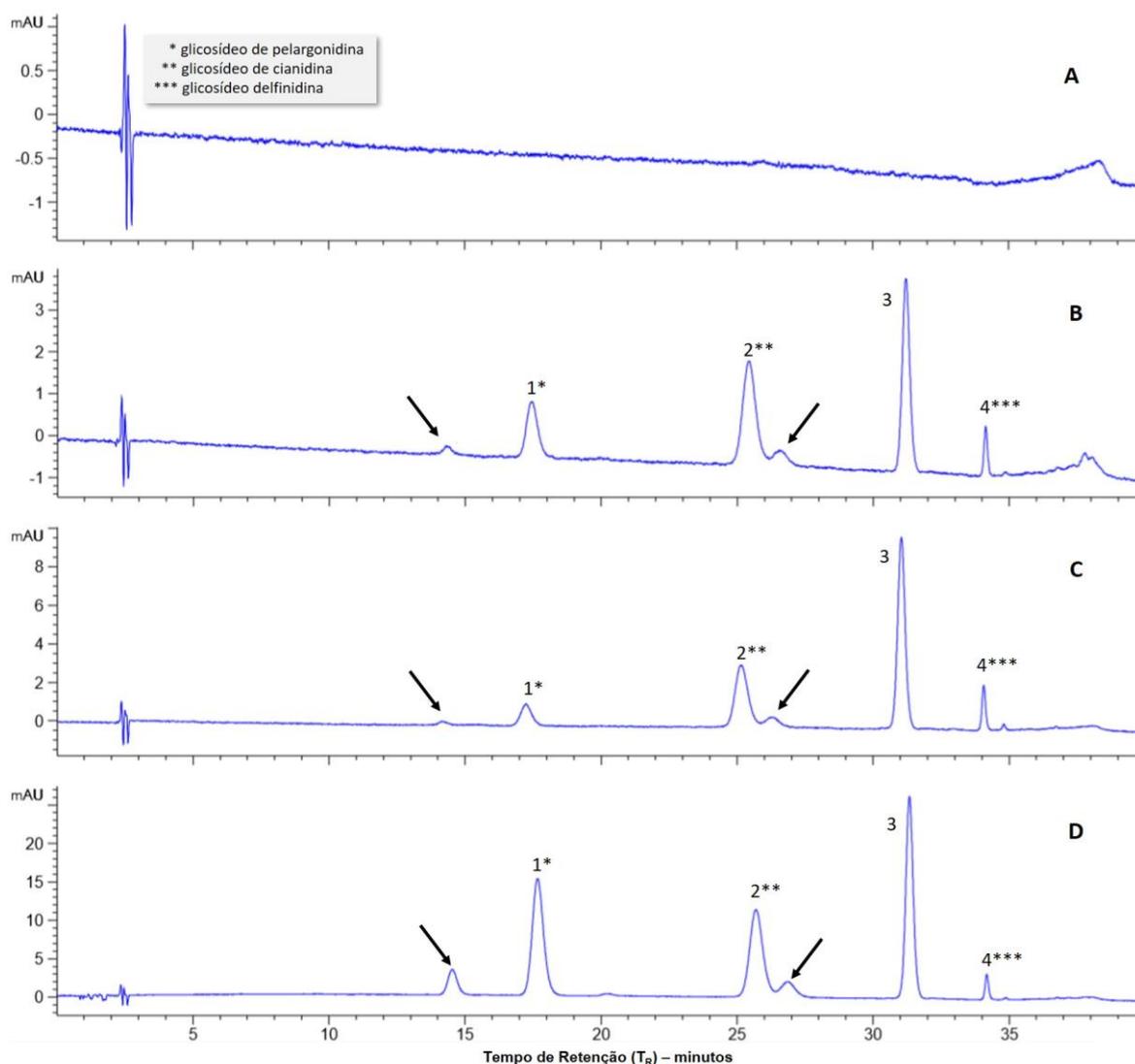
Dentro de cada linha, letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

O perfil cromatográfico das plantas mantidas em casa de vegetação também foi distinto em relação a presença de ACNs. Os resultados indicaram a presença de mais duas antocianinas (Figura 27), totalizando seis picos, enquanto as plantas *in vitro* apresentaram apenas quatro (Figura 8).

As ACNs identificados nas plantas cultivadas *in vitro* continuaram presentes, no entanto, houve uma alteração em relação a ACNs majoritária (Figura 27). Segundo Yuan *et al.* (2009) a expressão dos genes responsáveis pela biossíntese de ACNs pode mudar de acordo com o estágio de desenvolvimento. Tal informação esclarece a presença de novos picos.

Essa modificação no perfil cromatográfico pode estar relacionada a exposição das plantas a outros fatores ambientais que possam induzir o acúmulo de ACNs. Ao serem transferidas da sala de crescimento para casa de vegetação, as plantas passaram de um ambiente controlado para uma condição adversa com variações na temperatura, umidade e luminosidade, além da exposição a patógenos e herbivoria.

De acordo com Steyn *et al.* (2002) é comum plantas apresentarem acúmulo de ACNs no processo de aclimatização, em função das novas condições de cultivo, porém, tendem a desaparecer após adaptação das plantas ao ambiente. O relato dos autores corrobora com a hipótese de que os novos picos estejam relacionados a outros fatores que não seja nutricional. Entretanto, o acúmulo não apresentou caráter transitório, pois a presença da coloração manteve-se até o final do experimento.



**Figura 27.** Cromatogramas de antocianinas em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 12 meses de cultivo em casa de vegetação sob adubação com diferentes concentrações de  $\text{NO}_3^-$ . A) Tratamento controle, B) 3,75 mM de  $\text{NO}_3^-$ , C) 7,50 mM de  $\text{NO}_3^-$  e D) 15,00 mM de  $\text{NO}_3^-$ . Números indicam quantidade de picos e presença de glicosídeos de \*pelargonidina (pico 1), \*\*cianidina (pico 2) e \*\*\*delfinidina (pico 4). Setas indicam a presença de novas antocianinas após a aclimatização.

#### 4.2.1.2. Biometria e biomassa

O crescimento das plantas foi satisfatório em todos os tratamentos, pois mesmo nas menores concentrações de N as plantas sobreviveram por 12 meses de cultivo, sem mostrar sinais de senescência.

Dentre as concentrações de  $\text{NO}_3^-$  utilizadas, a que mais influenciou no crescimento das plantas foi 15 mM de N (Tabela 18), apresentando crescimento semelhante ao das plantas cultivadas em TC, considerado por Kurita & Tamaki (2014), o tratamento mais adequado ao crescimento de *A. imperialis*.

**Tabela 18.** Crescimento de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 12 meses de cultivo em casa de vegetação sob adubação com diferentes concentrações  $\text{NO}_3^-$  e tratamento controle (TC).

Variável	Tratamentos – $\text{NO}_3^-$			
	TC	3,75 mM	7,50 Mm	15,00 mM
Número de folhas	21,7±1,7 a	16,9±1,5 b	16,8±0,7 b	20,0±1,1 a
Número de raízes	*	*	*	*
Folha (cm)	42,5±4,2 a	32,3±0,8 b	31,8±2,0 b	33,9±1,3 a
Raiz (cm)	*	*	*	*
MF parte aérea (g)	77,4±15,1 a	29,3±5,1 b	24,5±4,7 b	38,9±4,2 a
MSE parte aérea (g)	9,9±3,3 a	2,7±0,4 b	2,2±0,5 b	4,1±0,7 a
MF raiz (g)	19,9±6,3 a	3,3±0,4 a	3,6±1,1 a	3,8±0,6 a
MSE raiz (g)	7,0±1,8 a	0,4±0,1 a	0,4±0,1 a	0,6±0,0 a

\*Raízes emaranhadas – impossibilitou a análise.

MF = massa fresca; MSE = massa seca.

Dentro de cada linha, letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.1.3. Pigmentos fotossintéticos

Os teores de pigmentos fotossintéticos (clorofilas e carotenoides) das plantas adubadas com as diferentes concentrações de  $\text{NO}_3^-$  não apresentaram diferenças entre os tratamentos, assim como, não apresentaram uma correlação positiva com a disponibilidade de N (Tabela 19), conforme o esperado (Prado 2008, Hikosaka & Osone 2009, Saleem *et al.* 2010), no entanto, vários trabalhos já descreveram que o conteúdo de pigmentos fotossintéticos não seguiu essa tendência, inclusive para bromélias (Silva *et al.* 2017, Andrade & Tamaki 2016).

Observando os resultados, notou-se uma relação antagônica entre o acúmulo de ACNs e pigmentos fotossintéticos. As plantas mantidas em 3,75, 7,5 e 15 mM de  $\text{NO}_3^-$  apresentaram uma tendência a redução nos teores dos pigmentos fotossintéticos e aumento no conteúdo de ACNs, conforme o incremento da fonte nitrogenada (Tabela 17 e 19), enquanto plantas controle apresentaram maior acúmulo de clorofilas e carotenoides e ausência de ACNs.

Plantas que acumulam ACNs tem a capacidade fotossintética comprometidas, porque esses pigmentos influenciam de forma significativa na quantidade e qualidade de luz incidente

nos cloroplastos (Gould *et al.* 2002), sendo assim, quanto maior a quantidade de pigmentos antociânicos nas folhas, menor será os teores de clorofilas, o que não quer dizer que as folhas estavam em período de senescência, como ocorre com algumas espécies de árvores decíduas (Koike 2004).

Liang & He (2018) também encontraram antagonismo entre esses pigmentos em estudo com a espécie *A. thaliana*, e o descreveram como sendo uma resposta adaptativa a limitação de N.

**Tabela 19.** Pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides) foliares em plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 12 meses de cultivo em casa de vegetação sob adubação com diferentes concentrações  $\text{NO}_3^-$  e tratamento controle (TC).

Variável	Tratamentos – $\text{NO}_3^-$			
	TC	3,75 mM	7,50 mM	15,00 mM
Clorofila <i>a</i>	1484±246 a	974±241 b	924±179 b	800±124 b
Clorofila <i>b</i>	803±130 a	453±124 b	458±103 b	320±59 b
Carotenoides	413±76 a	297±66 b	298±58 b	240±38 b

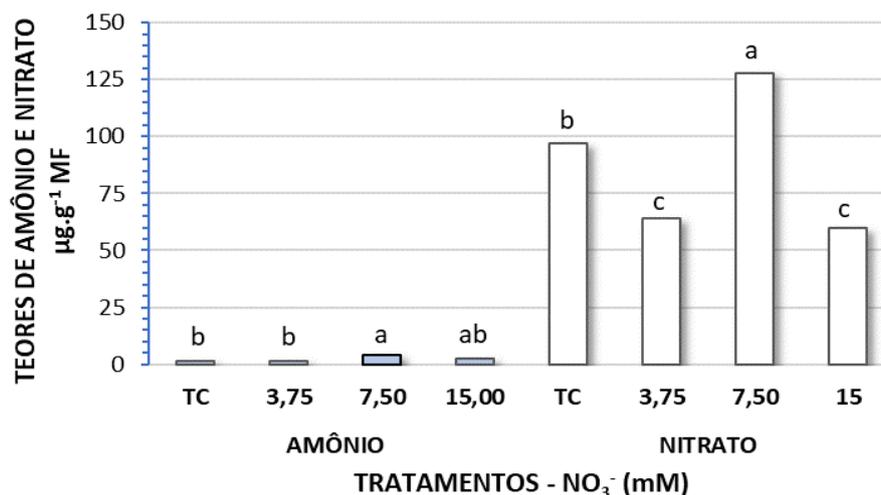
Valores em  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$ .

Dentro de cada linha, letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.1.4. Amônio e nitrato foliar

As concentrações de  $\text{NO}_3^-$  influenciaram de forma significativa nos teores de  $\text{NH}_4^+$  foliar (Figura 28), sendo que o maior acúmulo ocorreu em plantas mantidas em 7,5 mM.

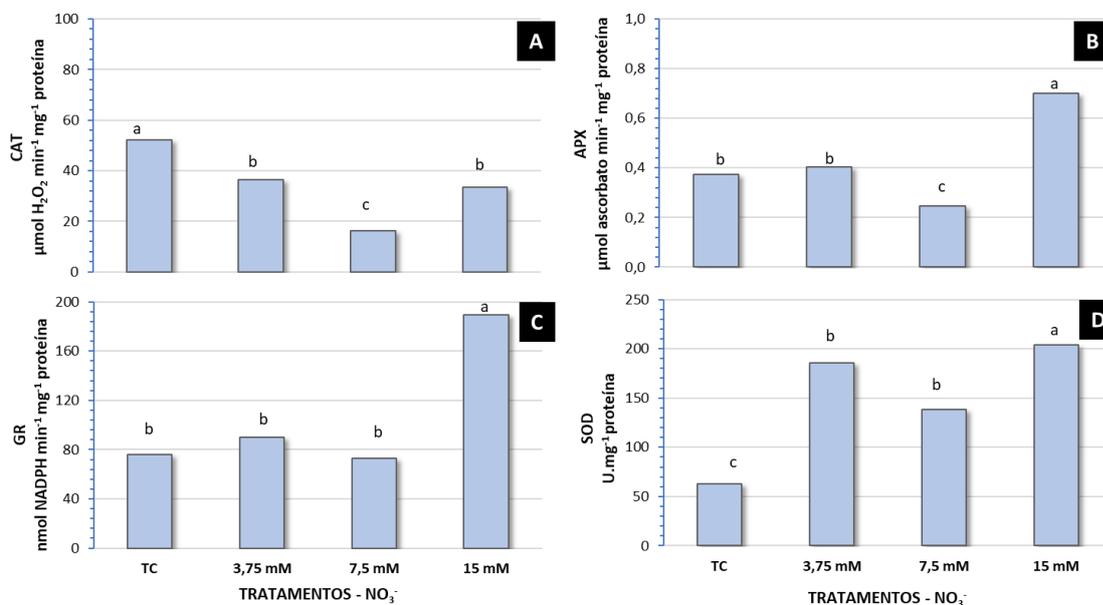
Os teores de  $\text{NO}_3^-$  nas folhas também foram maiores nas plantas cultivadas em 7,5 mM de  $\text{NO}_3^-$  (Figura 28). Baseando-se nos teores das demais concentrações (3,75 e 15 mM) que foram semelhantes, acredita-se que este aumento ocorreu por desequilíbrio entre a absorção e assimilação do N, possivelmente influenciado por fatores externo.



**Figura 28.** Teores de amônio e nitrato ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$ ) em folhas de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 12 meses de cultivo em casa de vegetação sob adubação com diferentes concentrações de  $\text{NO}_3^-$ . Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4.1.5. Atividade antioxidante

Para o sistema antioxidante, não foi observado correlação entre as enzimas e a disponibilidade de  $\text{NO}_3^-$  (Figura 29). Embora a atividade das enzimas não tenha seguido uma tendência, conforme o incremento do N no meio, notou-se uma maior atividade das enzimas APX, GR e SOD nas plantas adubadas com 15 mM de  $\text{NO}_3^-$  (Figura 22-B, C e D), o que indica maior produção e acúmulo de ROS.



**Figura 29.** Atividade das enzimas antioxidantes em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 12 meses de cultivo em casa de vegetação sob adubação com diferentes concentrações de  $\text{NO}_3^-$ . A) Catalase (CAT), B) Ascorbato peroxidase (APX), C) Glutaciona redutase (GR) e D) Superóxido dismutase (SOD). Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 4.2.2. Plantas cultivadas em $\text{NH}_4\text{NO}_3$

### 4.2.2.1. Antocianinas



**Figura 30.** Presença de antocianinas em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 12 meses de cultivo em casa de vegetação sob adubação com diferentes concentrações  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . A) 3,75 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , B) 7,50 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , C) 15,00 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e D) Planta controle (TC). Barra = 10 cm.

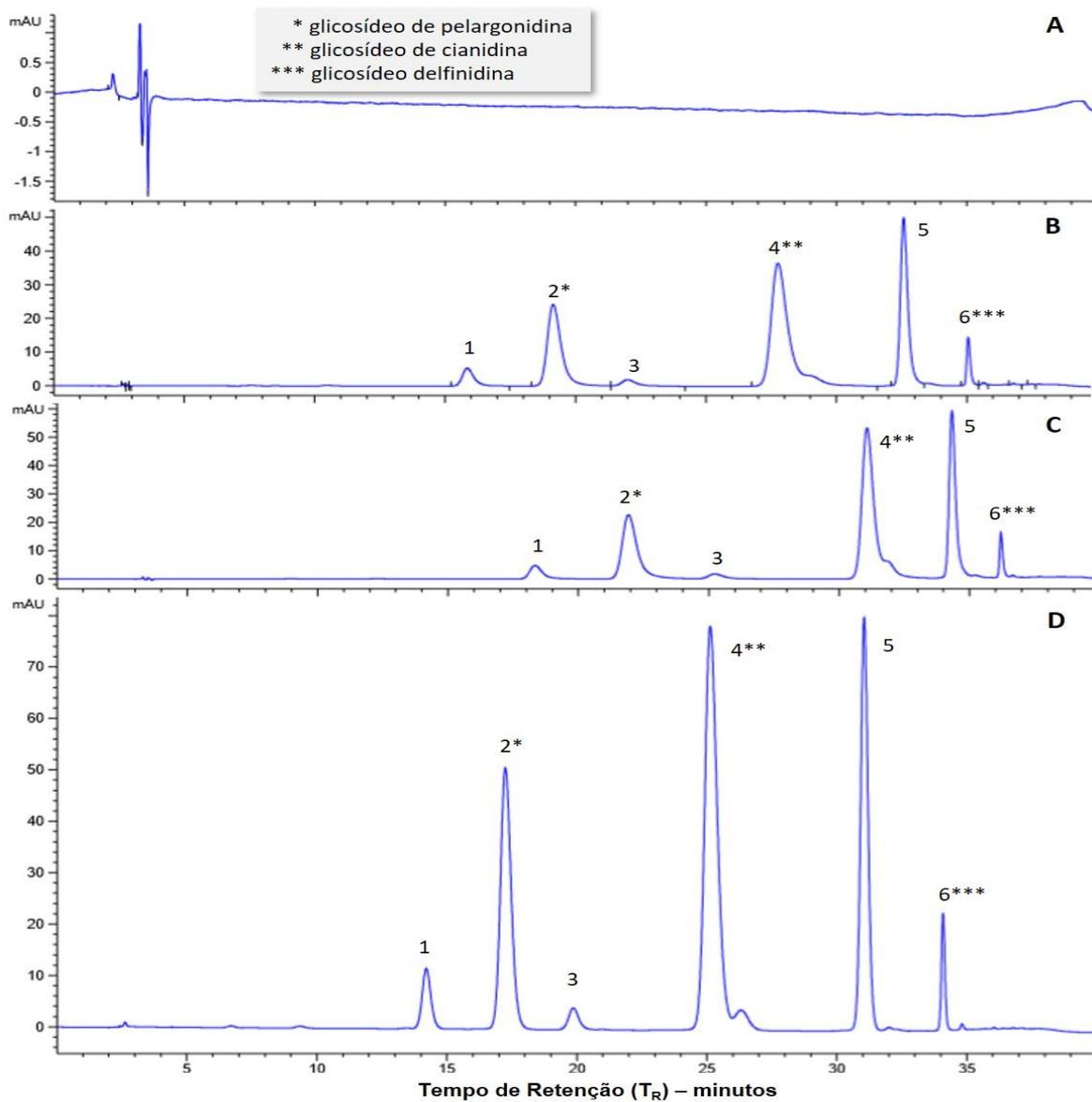
As plantas mantidas nas concentrações 3,75, 7,5 e 15 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  continuaram apresentando coloração rubra durante o cultivo em casa de vegetação (Figura 30).

Assim como observado no experimento com  $\text{NO}_3^-$ , o maior acúmulo de ACNs ocorreu nas plantas que adubadas com 15 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (Tabela 20), tendência distinta do observado nas plantas durante o cultivo *in vitro*. Embora tenha ocorrido esta diferença no acúmulo do pigmento, o perfil cromatográfico se manteve. As análises em HPLC mostraram a presença de seis picos e os glicosídeos pelargonidina, cianidina e delphinidina continuaram presentes (Figura 31).

Segundo Harbone (1965), o acúmulo de ACNs é de natureza transitória, podendo se limitar a fase juvenil (Murray *et al.* 1994), tendência não encontrada para as plantas de *A. imperialis*. Vale ressaltar que a presença da coloração continuou restrita a face abaxial das folhas, assim como nas plantas cultivadas *in vitro*.

Embora o aumento nos teores de ACNs, conforme o incremento de N na adubação, não seja o esperado, pode ocorrer por associação a outro fator que induza a síntese do pigmento ou por super expressão de algum gene, como relatado por Liang & He (2018). No entanto, não se descarta a possibilidade deste acúmulo ser resultado das perdas nutricionais que podem ocorrer durante o cultivo em casa de vegetação. Por não ser um ambiente controlado, assim como no cultivo *in vitro*, a redução do nutriente pode ocorrer devido a diluição e/ou evaporação da solução de adubação. Como a adubação das plantas de *A.*

*imperialis* era pelo tanque, a cada irrigação a concentração dos nutrientes era reduzida, justificando o maior acúmulo do pigmento nestas plantas.



**Figura 31.** Cromatogramas de antocianinas em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 12 meses de cultivo em casa de vegetação sob adubação com diferentes concentrações de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. A) Tratamento controle, B) 3,75 mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, C) 7,50 mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e D) 15,00 mM de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. Números indicam quantidade de picos e presença de glicosídeos de \*pelargonidina (pico 2), \*\*cianidina (pico 4) e \*\*\*delphinidina (pico 6).

**Tabela 20.** Quantificação das antocianinas identificadas em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms cultivadas em casa de vegetação por 12 meses sob diferentes concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e tratamento controle (TC).

Variável	Tratamentos – $\text{NH}_4\text{NO}_3$			
	TC	3,75 mM	7,50 mM	15 mM
Pelargonidina <sup>1</sup>	0,00 c	28,4 b	29,1 b	46,3 a
Cianidina <sup>1</sup>	0,00 c	23,8 b	25,4 b	36,3 a
Delfinidina <sup>1</sup>	0,00 c	7,65 b	8,25 b	12,1 a

<sup>1</sup>Glicosídeo. Valores em  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\text{MF}$ .

Dentro de cada linha, letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2.2. Biometria e biomassa

O crescimento das plantas foi satisfatório em todos os tratamentos, pois mesmo nas menores concentrações de N as plantas sobreviveram por 12 meses de cultivo, sem demonstrar sinais de senescência.

A concentração 15 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  foi a que mais influenciou no crescimento das plantas (Tabela 21), apresentando crescimento semelhante ao das plantas cultivadas em TC, considerado por Kurita & Tamaki (2014), o tratamento mais adequado ao crescimento de *A. imperialis*.

**Tabela 21.** Crescimento de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 12 meses de cultivo em casa de vegetação sob adubação com diferentes concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e tratamento controle (TC).

Variável	Tratamentos – $\text{NH}_4\text{NO}_3$			
	TC	3,75	7,50	15,00
Número de folhas	21,7±1,7 a	17,2±1,0 b	19,3±0,8 ab	20,5±2,8 a
Número de raízes	*	*	*	*
Folha (cm)	42,5±4,2 a	37,7±3,2 b	41,0±3,6 b	50,6±4,7 a
Raiz (cm)	*	*	*	*
MF parte aérea (g)	77,4±15,1 a	55,6±4,3 b	62,5±6,8 b	102,4±17,1 a
MSE parte aérea (g)	9,9±3,3 b	5,9±0,9 c	6,5±0,8 c	12,4±1,9 a
MF raiz (g)	19,9±6,3 b	14,4±1,8 c	17,4±1,6 b	28,3±6,7 a
MSE raiz (g)	7,0±1,8 a	2,0±0,4 b	2,1±0,3 b	4,2±0,9 b

MF = massa fresca; MSE = massa seca.

\*Raízes emaranhadas – impossibilitou análise.

Dentro de cada linha, letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2.3. Pigmentos fotossintéticos

Os teores de clorofila *a*, *b* e carotenoides não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos com as diferentes concentrações de N (Tabela 22).

Ao comparar os resultados com os obtidos em plantas controle, percebe-se que houve diferenças significativas apenas para os teores de clorofila *b* (Tabela 22).

Conforme mencionado no item 4.1.4, espera-se uma correlação positiva entre os teores de clorofilas e o aumento na disponibilidade de N (Prado 2008), entretanto, trabalhos comprovaram que esta tendencia não ficou evidente para algumas espécies.

**Tabela 22.** Pigmentos fotossintéticos foliares (clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides) em plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 12 meses de cultivo em casa de vegetação sob adubação com diferentes concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e tratamento controle (TC).

Variável	Tratamentos – $\text{NH}_4\text{NO}_3$			
	TC	3,75 Mm	7,50 mM	15,00 mM
Clorofila <i>a</i>	1484±246 a	1486±216 a	1130±175 a	1260±173 a
Clorofila <i>b</i>	803±130 a	411±14 b	482±171 b	549±63 b
Carotenoides	413±76 a	355±66 a	306±16 a	336±55 a

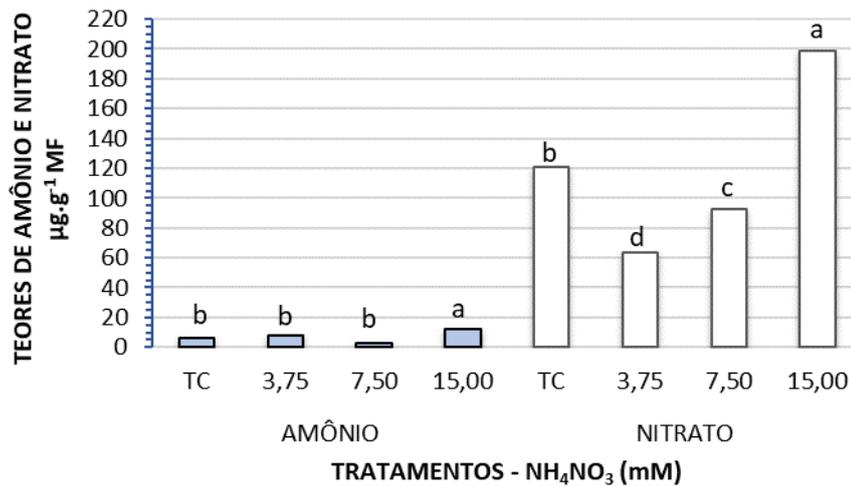
Valores em  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$ .

Dentro de cada linha, letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2.4. Amônio e nitrato foliar

O conteúdo de  $\text{NH}_4^+$  endógeno foi maior nas plantas mantidas em 15 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  com  $12,47 \pm 0,11 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$ , não apresentando diferenças significativas entre os demais tratamentos (Figura 32).

As diferentes concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  resultaram em aumento no conteúdo endógeno de  $\text{NO}_3^-$  nas folhas das plantas cultivadas em 3,75, 7,5 e 15 mM, seguindo a mesma tendência das plantas cultivadas *in vitro*. Embora o TC contenha 60 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  em sua composição, o acúmulo de  $\text{NO}_3^-$  nas plantas não seguiu a mesma tendência, apresentando teores inferiores ao das plantas mantidas em 15 mM (Figura 32).



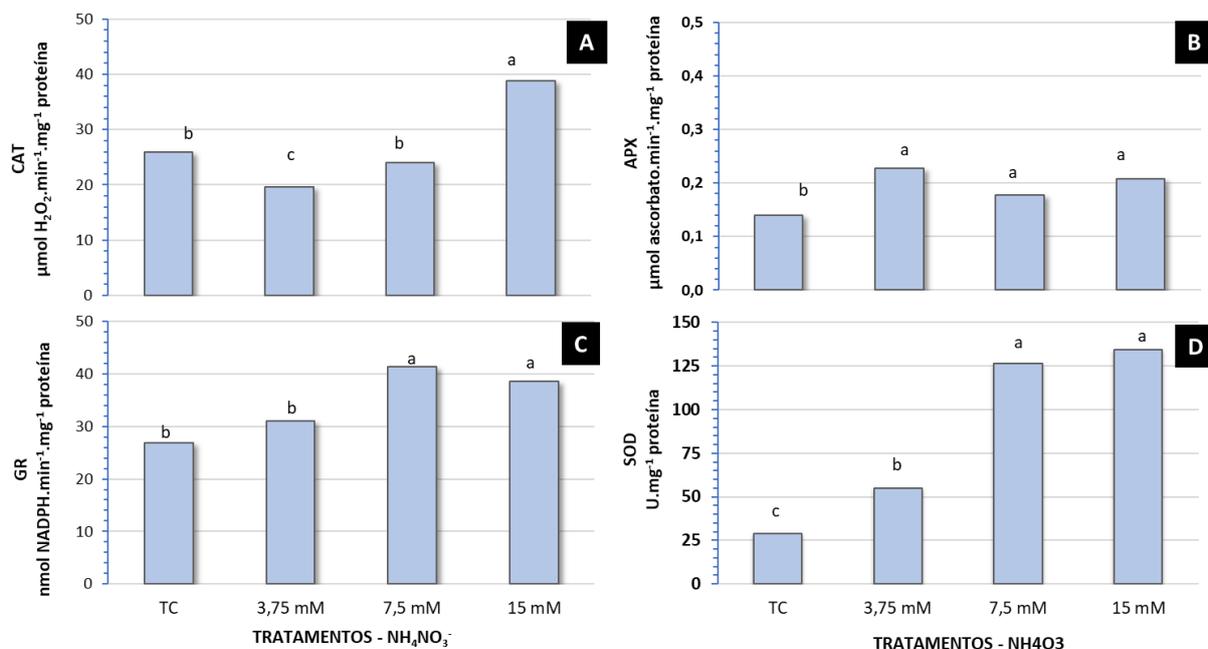
**Figura 32** Conteúdo endógeno de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$ ) em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 12 meses de cultivo em casa de vegetação sob adubação com diferentes concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2.5. Enzimas antioxidantes

Em relação ao sistema antioxidante, foi observado uma maior atividade das CAT nas plantas cultivadas com 15 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , não havendo diferenças entre as concentrações para a atividade da enzima APX (Figura 33-A e B).

Para as enzimas GR e SOD (Figura 33-C e D) a atividade foi maior nas plantas adubadas com 7,5 e 15 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

Observou-se que as plantas cultivadas com  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  apresentaram menor atividade das enzimas (CAT, APX, GR e SOD) em comparação as plantas adubadas com  $\text{NO}_3^-$  (Figura 29).

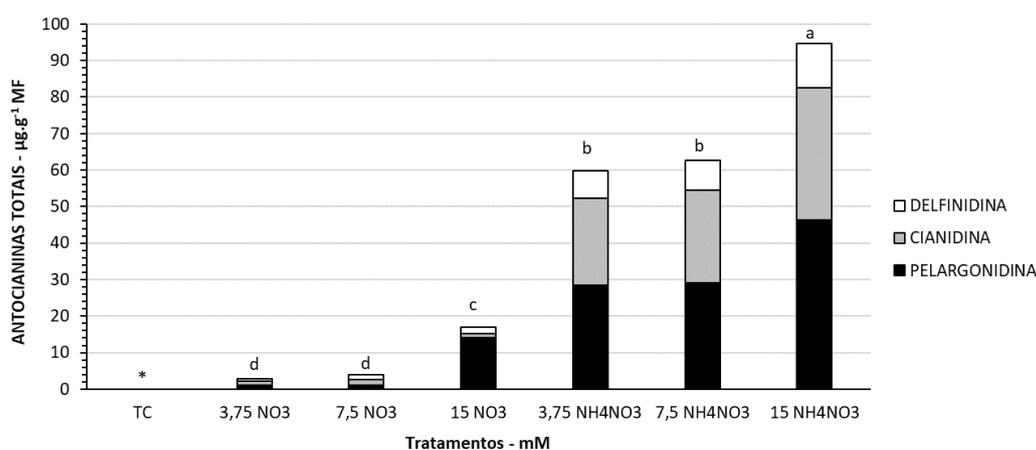


**Figura 33.** Atividade das enzimas antioxidantes em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carri\u00e8re) Harms ap\u00f3s 12 meses de cultivo em casa de vegeta\u00e7\u00e3o sob aduba\u00e7\u00e3o com diferentes concentra\u00e7\u00f5es de  $\text{NO}_3$ . A) Catalase (CAT), B) Ascorbato peroxidase (APX), C) Glutaciona redutase (GR) e D) Super\u00f3xido dismutase (SOD). Letras distintas indicam diferen\u00e7as significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

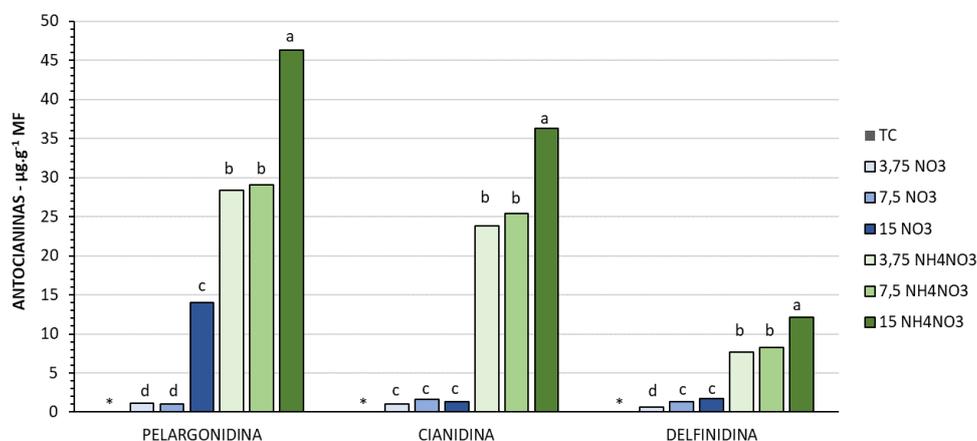
### 4.2.3. Comparativo dos resultados obtidos na aclimatização das plantas rubras

A fonte nitrogenada  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  foi a que mais influenciou no acúmulo de ACNs. As plantas mantidas nas três concentrações (3,75, 7,5 e 15 mM) apresentaram valores superiores aos obtidos em plantas cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  (Figura 34). Dentre os glicosídeos identificados, o maior acúmulo do pigmento ocorreu em 15 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , sendo a pelargonidina a ACNs majoritária, seguida de cianidina e delphinidina (Figura 35).

Embora os teores nas plantas cultivadas em 3,75, 7,5 e 15 mM de  $\text{NO}_3^-$  tenham sido inferiores, foi observado que o acúmulo do pigmento seguiu a mesma tendência do tratamento com a fonte  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , ou seja, os teores foram semelhantes nas concentrações 3,75 e 7,5 mM, com aumento significativo em 15 mM (Figura 34).



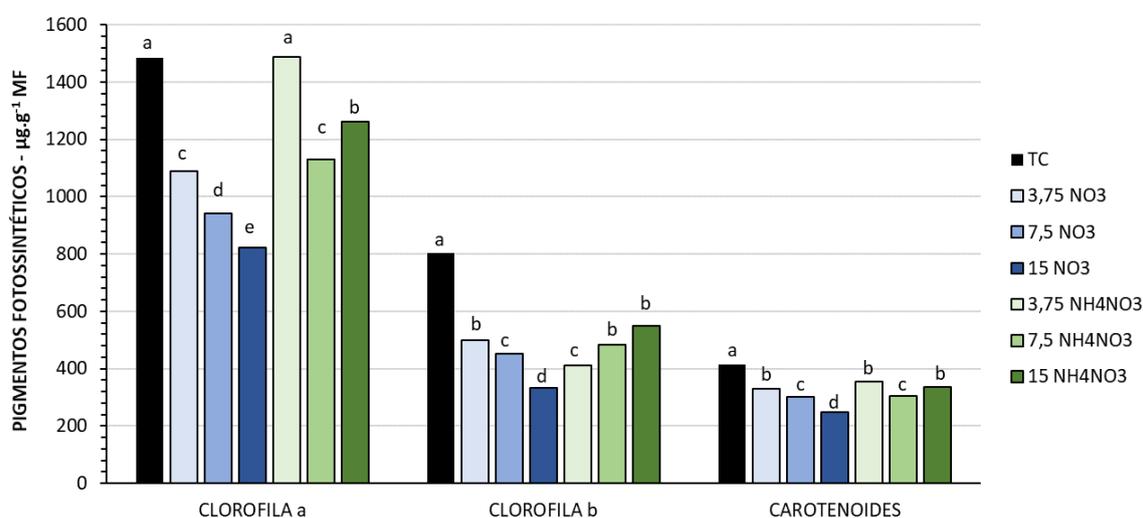
**Figura 34.** Teores de antocianinas totais (pelargonidina, cianidina e delphinidina) em folhas de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms aclimatizadas e cultivadas em casa de vegetação por 12 meses nos experimentos com diferentes fontes nitrogenadas ( $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ). Letras distintas indicam diferenças significativas entre as variáveis de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). \*Ausência de antocianinas.



**Figura 35.** Antocianinas foliares identificadas em folhas de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms aclimatizadas e cultivadas em casa de vegetação por 12 meses nos experimentos com diferentes fontes nitrogenadas ( $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ). Letras distintas indicam diferenças significativas entre as variáveis de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). \*Ausência de antocianinas.

A análise de pigmentos fotossintéticos mostrou uma redução no conteúdo de clorofilas e carotenoides, conforme o incremento da fonte  $\text{NO}_3^-$ . Entretanto, para as plantas adubadas com  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  não foi observado esta tendência, pois a variável clorofila *a* apresentou teores superiores em plantas cultivadas em 3,75 mM, com redução em 7,5 mM, seguido de aumento em 15 mM, ou seja, o conteúdo não seguiu uma correlação com a disponibilidade de N, diferentemente do observado para clorofila *b*.

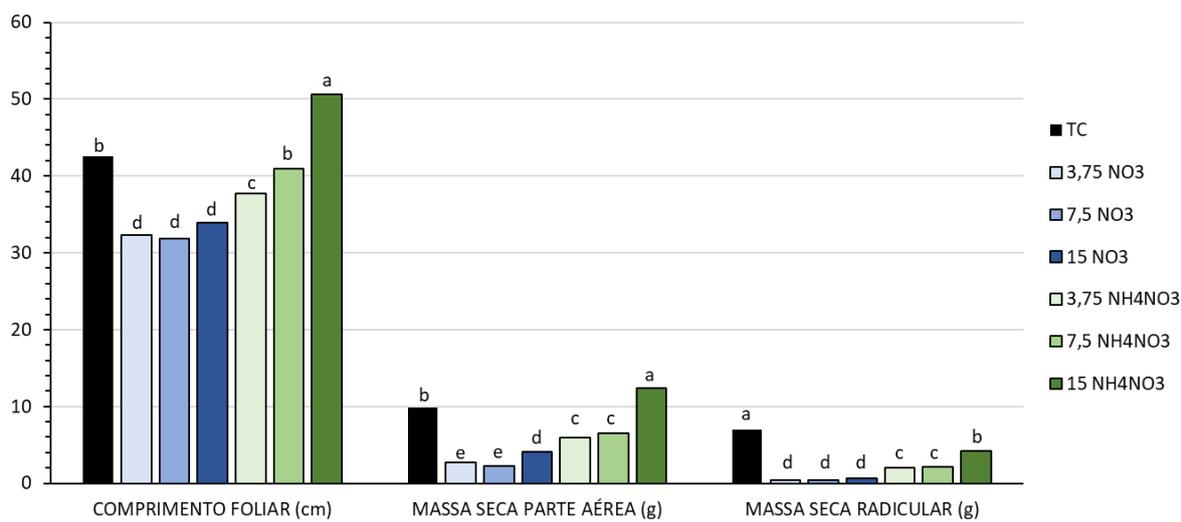
Os resultados obtidos na concentração 3,75 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , assim com as demais concentrações desta fonte de N, mostraram uma tendência distinta do cultivo *in vitro*, onde os teores de clorofilas foram inferiores em plantas que apresentaram acúmulo de ACNs, assim como observado nos resultados oriundos do tratamento com a fonte  $\text{NO}_3^-$  (Figura 36).



**Figura 36.** Pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides) em folhas de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms aclimatizadas e cultivadas em casa de vegetação por 12 meses nos experimentos com diferentes fontes nitrogenadas ( $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ). Letras distintas indicam diferenças significativas entre as variáveis de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Avaliando as variáveis comprimento foliar e acúmulo de biomassa (Figura 37), constatou-se que  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  foi a fonte nitrogenada que mais influenciou no crescimento das plantas. Embora todas as concentrações tenham influenciado de forma significativa em relação a  $\text{NO}_3^-$ , 15 mM foi a concentração mais eficiente ao crescimento de plantas *A. imperialis* (Figura 37).

Segundo Oliveira *et al.* (2008), os tratamentos formulados com o balanceamento dos íons  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$ , disponibilizam mais N, elevando a produtividade.



**Figura 37.** Comprimento foliar (cm), massa seca da parte aérea e radicular ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{MS}$ ) de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms aclimatizadas e cultivadas em casa de vegetação por 12 meses nos experimentos com diferentes fontes nitrogenadas ( $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ). Letras distintas indicam diferenças significativas entre as variáveis de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 4.3. Plantas cultivadas sob diferentes intensidades de radiação UV-B

#### 4.3.1. Antocianinas

Ao término do experimental todas as câmaras apresentaram plantas com acúmulo de ACNs. A presença do pigmento nas plantas teve início após 2 meses de exposição, mantendo o padrão dos experimentos anteriores, ou seja, pontos aleatórios, iniciando pela base foliar, estendendo-se em direção ao ápice (Figura 38-A). A coloração foi restrita a superfície abaxial, assim com as plantas cultivadas sob diferentes concentrações de N. Após 6 meses de cultivo a distribuição das ACNs não era apenas em pontos aleatórios, mas também em manchas, indicando um maior acúmulo de pigmento (Figura 38-B).



**Figura 38.** Plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms mantidas no tratamento UV+ indicando a presença de antocianinas. A) Planta após 2 meses de cultivo e B) Planta após 6 meses de cultivo.

O perfil cromatográfico das plantas que acumularam ACNs apresentou seis ACNs, das quais três foram identificadas como glicosídeos de pelargonidina (pico 2\*), cianidina (pico 4\*\*) e delphinidina (pico 6\*\*\*). Assim como nos experimentos anteriores a ACN majoritária foi um glicosídeo de cianidina (Figura 39).

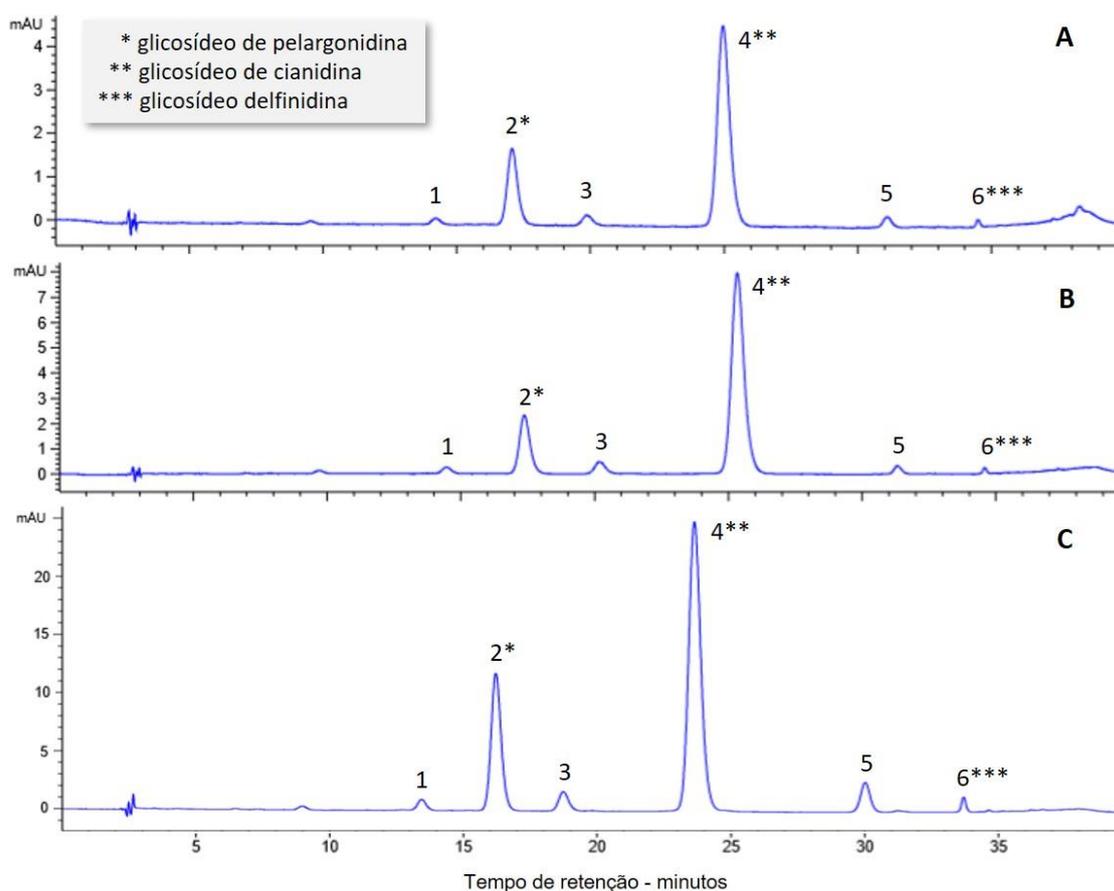
Os maiores de teores de ACNs resultaram das plantas cultivadas na câmara com intensificação de UV-B, seguido dos tratamentos UV- e UV ambiente (Tabela 23).

**Tabela 23.** Quantificação das antocianinas identificadas em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms cultivadas por 6 meses em câmaras sob diferentes intensidades de radiação UV-B.

Variável	Intensidades de Radiação UV-B		
	UV- (4,7 kJ.m <sup>-2</sup> .h <sup>-1</sup> )	UV ambiente (11,8 kJ.m <sup>-2</sup> .h <sup>-1</sup> )	UV+ (101,9 kJ.m <sup>-2</sup> .h <sup>-1</sup> )
Pelargonidina <sup>1</sup>	0,18 b	0,10 b	0,66 a
Cianidina <sup>1</sup>	3,59 b	0,95 c	10,75 a
Delfinidina <sup>1</sup>	0,17 b	0,01 c	0,82 a

<sup>1</sup>Glicosídeos. Valores em µg.ml<sup>-1</sup>MF.

Dentro de cada linha, Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Figura 39.** Cromatogramas de antocianinas em plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo sob diferentes intensidades de radiação UV-B. A) UV ambiente (11,8 kJ.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>), B) UV- (4,7 kJ.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>) e C) UV+ (101,9 kJ.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>).

Embora as plantas expostas à radiação UV-B tenham apresentado acúmulo de ACNs, não é possível afirmar se o resultado é consequência, única e exclusivamente, das variações na intensidade de radiação UV-B, pois o experimento foi comprometido por herbivoria (Figura 40).

A fim de evitar a presença de herbívoros, principalmente mariposas e borboletas, foram instaladas barreiras físicas (telas), porém sem sucesso. Mesmo com as telas o lote do tratamento UV+ sofreu perdas em função de novos ataques. Acredita-se que o comprometimento deste lote ocorreu pela presença da luz UV.

É importante ressaltar que apesar da ocorrência de ataques, optou-se por não utilizar nenhum tipo de controlador químico, pois poderia gerar alterações ainda mais significativas no metabolismo das plantas, comprometendo todo o experimento e não apenas das plantas predadas.



**Figura 40.** Plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms mantidas no experimento UV-B durante predação. Setas e círculos indicam presença de lagartas de lepidópteros. Barras = 1 cm

#### 4.3.2. Biometria e biomassa

As plantas de *A. imperialis* sobreviveram ao cultivo sob diferentes intensidades de radiação UV-B, porém os níveis não influenciaram de forma significativa no crescimento das plantas, apenas a variável comprimento foliar apresentou diferenças entre os tratamentos (Tabela 24).

As plantas mantidas em UV+ apresentaram maior comprimento foliar, assim como folhas mais espessas e pontos de necrose e clorose.

Alterações como redução do crescimento e espessamento de folhas e cutículas, são relatadas como consequências da exposição ao UV-B. Entretanto, os danos estão relacionados com a intensidade, período de exposição e sensibilidade da espécie (Reboredo & Lidon 2012).

Diferente do resultado obtido com plantas de *A. imperialis* a intensificação de UV-B em plantas *O. sativa* reduziu o crescimento da parte aérea (Almeida *et al.* 2012).

**Tabela 24.** Crescimento de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo em câmaras sob diferentes intensidades de radiação UV-B.

Variável	Intensidades de Radiação UV-B		
	UV- (4,7 kJ.m <sup>-2</sup> .h <sup>-1</sup> )	UV ambiente (11,8 kJ.m <sup>-2</sup> .h <sup>-1</sup> )	UV+ (101,9 kJ.m <sup>-2</sup> .h <sup>-1</sup> )
Número de folhas	11,2±4,3 a	9,2±1,7 a	10,2±0,8 a
Número de raízes	*	*	*
Comprimento foliar (cm)	19,8±2,1 b	21,4±1,5 b	24,4±0,5 a
Comprimento radicular (cm)	*	*	*
MF parte aérea (g)	16,2±2,4 a	21,3±4,9 a	23,4±2,1 a
MSE parte aérea (g)	1,5±0,1 a	2,1±0,7 a	2,7±0,9 a
MF raiz (mg)	3,4±1,0 a	5,0±0,4 a	4,4±0,1 a
MSE raiz (mg)	0,3±0,1 a	0,6±0,1 a	0,5±0,0 a

MF = massa fresca; MSE = massa seca.

\*As raízes estavam entrelaçadas impossibilitando a quantificação.

Dentro de casa linha, Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.3. Pigmentos fotossintéticos

Os teores de pigmentos fotossintéticos não mostram diferenças entre as plantas mantidas nas câmaras UV- e UV+, os resultados foram superiores aos das plantas controle (UV ambiente) (Tabela 25).

Estudos mostram que em ambiente natural a fotossíntese em plantas terrícolas não é significativamente afetada por mudanças na radiação UV-B. Embora a espécie *A. imperialis* não seja uma espécie terrícola, sugere-se que os teores de clorofilas e carotenoides se mantiveram estáveis, entre os tratamentos, devido a uma resposta adaptativa, já que se trata de uma espécie é rupícola. De acordo com Reboredo & Lidon (2012) plantas nativas de locais com grandes altitudes são tolerantes a UV-B, devido a seleção natural.

**Tabela 25.** Pigmentos fotossintéticos foliares (clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides) em plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo em câmaras sob diferentes intensidades de radiação UV-B.

Variável	Intensidades de Radiação UV-B		
	UV- (4,7 kJ.m <sup>-2</sup> .h <sup>-1</sup> )	UV ambiente (11,8 kJ.m <sup>-2</sup> .h <sup>-1</sup> )	UV+ (101,9 kJ.m <sup>-2</sup> .h <sup>-1</sup> )
Clorofila <i>a</i>	2138±434 a	1657±202 b	2264±561 a
Clorofila <i>b</i>	703±217 b	539±98 c	820±211 a
Carotenoides	564±89 a	612±75 a	590±163 a

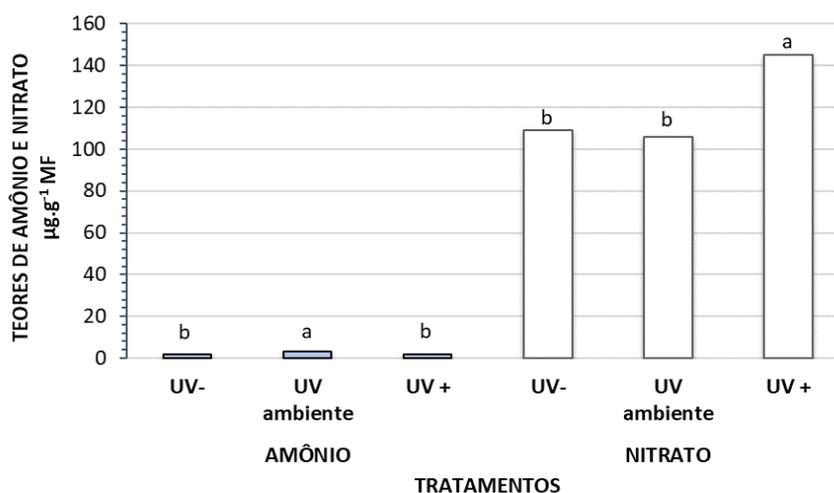
Valores em µg.g<sup>-1</sup>MF.

Dentro de cada linha, Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.4. Amônio e nitrato foliar

Os níveis de radiação UV-B não influenciaram no conteúdo endógeno de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Os teores obtidos para os tratamentos UV- e UV+, foram 1,84±0,1 e 1,68±0,1 µg.g<sup>-1</sup>MF, respectivamente. Valores inferiores aos obtidos em plantas mantidas em UV ambiente que apresentaram 3,2±0,6 µg.g<sup>-1</sup>MF (Figura 41).

O aumento na intensidade de UV-B resultou em maior acúmulo de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> foliar. Plantas mantidas na câmara UV+, apresentaram teores de nitrato próximos a 145±12µg.g<sup>-1</sup>MF (Figura 41).

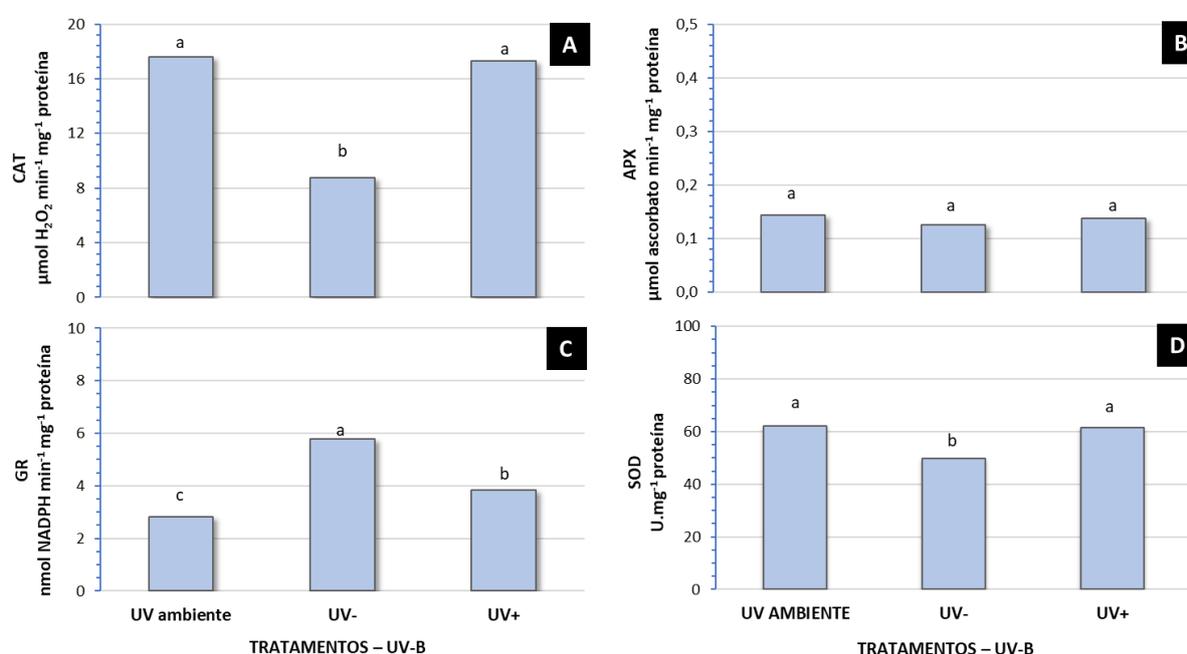


**Figura 41.** Conteúdo endógeno de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms cultivadas por 6 meses em câmaras sob diferentes intensidades de radiação UV-B. Tratamentos: UV- (4,7 kJ.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>), UV ambiente (11,8 kJ.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>) e UV+ (101,9 kJ.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>). Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 4.3.5. Enzimas antioxidantes

As diferentes intensidades de radiação UV-B influenciaram nas atividades das enzimas antioxidantes, com exceção da APX que apresentou atividade semelhante nas plantas em todos os tratamentos (Figura 42-B).

As plantas mantidas nos tratamentos UV ambiente e UV+ apresentaram maior atividade das enzimas CAT e SOD (Figura 42-A e D). Este aumento na atividade das duas enzimas indica uma maior produção e acúmulo de ROS nas plantas. Sugere-se que este aumento esteja relacionado não apenas as doses de UV-B com também a alta PAR, uma vez que estas plantas estavam em câmaras com PAR ambiente.



**Figura 42.** Atividade das enzimas antioxidantes em folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo em câmaras sob diferentes intensidades de radiação UV-B. A) Catalase (CAT), B) Ascorbato peroxidase (APX), C) Glutaciona redutase (GR) e D) Superóxido dismutase (SOD). Tratamentos: UV- ( $4,7 \text{ kJ} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ), UV ambiente ( $11,8 \text{ kJ} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ) e UV+ ( $101,9 \text{ kJ} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ). Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A bromélia *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms é uma espécie rupícola, portanto, suas plantas estão expostas a diversos fatores considerados estressantes, como baixa disponibilidade de água e nutrientes, alta radiação fotossinteticamente ativa, radiação UV-B e variações de temperatura (Giulietti *et al.* 1997, Giulietti *et al.* 2000, Versieux & Wanderley 2015). Coincidentemente, alguns desses fatores estão relacionados à produção de ACNs, talvez seja por isso, que em ambiente natural, observa-se plantas com folhas de coloração verde, assim como vermelha.

Por isso, neste trabalho foram utilizados três dos principais fatores relacionados a síntese de ACNs: a nutrição nitrogenada; alta radiação fotossinteticamente ativa; e radiação UV-B.

Com as diferentes fontes e concentrações de N foi constatado que as plantas de *A. imperialis* acumulam ACNs quando cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Embora as plantas de *A. imperialis* não tenham acumulado ACNs no cultivo com as diferentes concentrações de  $\text{NH}_4^+$ , as plantas mostraram-se tolerantes à fonte nitrogenada, pois sobreviveram pelos 6 meses de cultivo, sem apresentar alterações nos teores de pigmentos fotossintéticos. O acúmulo do pigmento em plantas cultivadas com  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , corrobora com o resultado obtido por Kurita & Tamaki (2014). De acordo com Deroles (2009), no cultivo *in vitro*, a fonte e a concentração de N presentes no meio de cultura influenciam de forma significativa no acúmulo de ACNs.

Os diferentes tratamentos influenciaram nos teores das três ACNs identificadas, no entanto, observou-se que a influência não foi apenas da fonte nitrogenada, mas também da concentração. Para pelargonidina os teores foram maiores em plantas cultivadas em 7,5 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , enquanto para cianidina os maiores resultados foram obtidos em plantas cultivadas em 3,75 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Para delphinidina as plantas cultivadas em 3,75 mM de N, independente da fonte, apresentaram os maiores teores, não havendo diferenças estatísticas entre os tratamentos. Ao comparar os tratamentos, nota-se que o glicosídeo de delphinidina é o que apresenta menor acúmulo do pigmento nesta condição de cultivo.

Foi observado que as fontes nitrogenadas (nas diferentes concentrações), afetaram o sistema antioxidante enzimático (SOD, CAT, APX e GR) das plantas de *A. imperialis*, assim como relatado por Medici *et al.* (2004) e Zhang *et al.* (2006). Para Li *et al.* (2013) as diferentes formas de N causam diferentes efeitos nos níveis de ROS, assim como, na atividade das enzimas antioxidantes. Segundo os autores, a atividade da CAT é maior quando a fonte

nitrogenada possui íons  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ , corroborando com os resultados obtidos para as plantas mantidas em  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Foi observado que as enzimas APX e GR apresentaram maior atividades quando a fonte era exclusivamente  $\text{NO}_3^-$ , não havendo relação com a concentração, apenas com a forma disponível. A atividade da SOD foi superior nas plantas cultivadas em  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , entretanto, constatou-se uma redução, conforme o aumento nas concentrações da fonte nitrogenada. Não foi observado, no cultivo *in vitro*, uma relação entre o acúmulo de ACNs e a atividades das enzimas antioxidantes.

Embora o processo de aclimatização seja a etapa mais crítica do cultivo *in vitro* (Faisal & Anis 2010), as plantas de *A. imperialis* responderam bem ao processo com 100% de sobrevivência.

Em relação a presença de ACNs, o principal objetivo deste trabalho, constatou-se que as plantas mantiveram a coloração rubra até o término do experimento, com exceção das plantas adubadas com TC (60 mM de N). Assim como observado no cultivo *in vitro*, as plantas controle aclimatizadas não acumularam o pigmento, portanto, sugere-se que essas plantas não apresentaram ACNs, por ser a concentração de N adequada aos requerimentos nutricionais da espécie.

Ao comparar os dois tratamentos ( $\text{NO}_3$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), constatou-se que a adubação com as duas fontes de N foi mais eficiente ao acúmulo de ACNs.

Ao relacionar o acúmulo de ACNs com a concentração da fonte nitrogenada, não foi observado diferenças entre os teores das plantas mantidas em 3,75 e 7,5 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . No entanto, ao avaliar os teores das plantas cultivadas em 15 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , constatou-se um aumento significativo, alterando a tendência encontrada no cultivo *in vitro*, onde os teores de ACNs apresentavam um correlação negativa com a concentração da fonte nitrogenada. Com esses resultados, é possível inferir que as plantas adubadas com 15 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  acumularam ACNs em resposta a uma diminuição da fonte nitrogenada, isso porque as plantas aclimatizadas são irrigadas diariamente, resultando em uma diluição da solução nutritiva armazenada no tanque.

A deficiência de N aumenta os níveis de mRNA dos genes que codificam enzimas associadas à biossíntese de ACNs (Treutter 2010, Soubeyrand *et al.* 2014, Lea *et al.* 2007). A expressão desses genes sob baixo fornecimento de N tem sido estudada em plantas modelo, como *A. thaliana*, (Zhou *et al.* 2012, Soubeyrand *et al.* 2014), tanto no cultivo *in vitro*, como em casa de vegetação, e tem fornecido subsídios para um melhor entendimento a respeito da via biossintética desses pigmentos.

Por fim, a regulação transcricional de genes estruturais por fatores de transcrição parece ser o principal mecanismo no controle da biossíntese de ACNs (Broun 2005).

Embora, pouco se saiba sobre a expressão dos genes envolvidos na biossíntese de ACNs em bromélias, acredita-se que após ativação dos genes responsáveis a coloração se mantenha, independente da concentração de N. Infere-se essa possibilidade, pois em experimento teste (dados não fornecidos), foi observado que as plantas obtidas do cultivo *in vitro*, aclimatizadas e adubadas com as diferentes concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (3,75, 7,5 e 15 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) mantiveram a presença de ACNs mesmo sob adubação com adubo comercial (Peters 20 20 20), enquanto as plantas do TC continuaram sem o acúmulo do pigmento.

Por fim, este trabalho mostrou que algumas antocianinas podem ser identificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) sem o uso de espectrometria de massa, baseando-se apenas em padrões analíticos.

## CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, recomenda-se o uso de 15 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  como fonte de nitrogênio para o cultivo da bromélia *A. imperialis*.

Nesta concentração foi possível induzir o acúmulo de antocianinas foliares, tornando as plantas desta espécie ainda mais ornamental, além de conseguir plantas maiores, com crescimento semelhante ao das plantas controle (cultivadas em 60 mM de N), indicando eficiência desta formulação.

Essa redução no consumo de fontes nitrogenadas é um fator positivo para a produção de plantas ornamentais, pois se mantém a produtividade com custo reduzido. Neste caso em específico, com a espécie *A. imperialis*, além de diminuir os gastos, consegue-se agregar valor ao produto em função da alteração na coloração foliar.

## REFERÊNCIAS

- Agati, G. & Tattini, M.** 2010. Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New Phytol.*, 186(4):786-93.
- Almeida, S.L., Schmidt, E.C., Rodrigues, A.C. & Bouzon, Z.L.** 2012. Effects of Natural Radiation, PAR and Artificial ultraviolet radiation-B on the Ultrastructure and histochemistry of leaf of *Oryza sativa* L. *American Journal of Plant Sciences*, 3, 1361-1368.
- Amaral, T.L., Jasmim, J.M., Nahoum, P.I., Freitas, C.B. & Sales, C.S.** 2009. Adubação nitrogenada e potássica de bromeliáceas cultivadas em fibra de coco e esterco bovino. *Horticultura Brasileira*, 27: 286-289.
- Andrade, S.V. & Tamaki, V.** 2016 *In vitro* growth of *Nidularium minutum* Mez (Bromeliaceae) in different concentrations of nitrogen, phosphorus, potassium, and calcium. *Journal of Plant Nutrition*, 39(11): 1634-1643
- Andrews, M., Raven, J.A. e Lea, P.J.** 2013. Do plants need nitrate? The mechanisms by which nitrogen form affects plants. *Annals of Applied Biology*, pp. 1-26.
- Andriolo, J.L.** 1999. *Fisiologia das culturas protegidas*. Santa Maria: UFSM, 142p.
- Aoyama, E.M., Versieux, L.M., Nievola, C.C. & Mazzoni-Viveiros, S.C.** 2012. Avaliação da eficiência da propagação de *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) cultivada *in vitro* e *ex vitro*. *Rodriguésia* 63(2): 321-331.
- Araújo, A.A.C. & Deminicis, B.B.** 2009. Fotoinibição da Fotossíntese. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, 7(4): 463-472.
- Araújo, V.A., Melo, S.K., Araújo, A.P.A., Gomes, M.L.M. & Carneiro, M.A.A.** 2007. Relationship between invertebrate fauna and bromeliad size. *Brazilian Journal of Biology*, 67(4): 611-617.
- Balen, B., Tkalec, M., Pavokovic, D., Pevalek-Kozlina, B. & Krsnik-Rasol, M.** 2009. Growth Conditions in *In Vitro* Culture Can Induce Oxidative Stress in *Mammillaria gracilis* Tissues. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28: 36-45.
- Ballaré, C.L. Caldwell, M.M. Flint, S.D., Robinson, S.A. & Bornman, J.F.** 2011. Effects of solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. Patterns, mechanisms, and interactions with climate change. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 10: 226-241.
- Barker, A.V. & Pilbeam, D.J.** 2007. *Handbook of Plant Nutrition*. USA: CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Barreto, D.C.S., Gonçalves, J.F.C., Santos-Júnior, U.M., Fernandes, A.V., Bariani, A. & Sampaio, P.T.B.** 2007. Biomass accumulation, photochemical efficiency of photosystem II, nutrient contents and nitrate reductase activity in young rosewood plants (*Aniba rosaeodora* Ducke) submitted to different  $\text{NO}_3^-$ - $\text{NH}_4^+$  ratios. *Acta Amazonica*, 37(4):533-542.

- Bastos, M.J.S.M., Bastos, L.P., Souza, E.H., Soares, T.L., Morais, D.V., Souza, F.V.D. & Costa, M.A.P.C.** 2017. Floral and reproductive biology of *Alcantarea nahoumii* (Bromeliaceae), a vulnerable endemic species of the Atlantic Forest. *Acta Botanica Brasilica*, 31(4): 665-676.
- Beauchamp, C. & Fridovich, I.** 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44: 276-287.
- Benzing, D.H.** 2000. Bromeliaceae: profile of na adptative radiation. UK: Cambridge University Press. p. 690.
- Bienert, G.P., Møller, A.L.B.‡, Kristiansen, K.A., Schulz, A., Møller, I.M., Schjoerring, J.K. & Jahn, T.P.** 2006. Specific Aquaporins Facilitate the Diffusion of Hydrogen Peroxide across Membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(2): 1183-1192.
- Boeger, M.R.T. & Poulson, M.** 2006. Efeitos da radiação ultravioleta-B sobre a morfologia foliar de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 20(2): 329-338.
- Bogs, J., Ebadi, A., McDavid, D., Robinson, S.P.** 2006. Identification of the Flavonoid Hydroxylases from Grapevine and Their Regulation during Fruit Development. *Plant Physiology*, 140: 279-291.
- Bradford, M.M.** 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Britto, D.T. & Kronzucker, H.J.** 2002. NH<sub>4</sub><sup>+</sup> toxicity in higher plants: a critical review. *Journal of Plant Physiology*, 159: 567-584.
- Broun, P.** 2005. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: a complex network of conserved regulators involved in multiple aspects of differentiation in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology*, 8: 272-279.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L.** 2015. *Biochemistry & Molecular Biology of plants*. 2<sup>nd</sup> ed. Wiley Blackwell, Wesr Sussex, UK.
- Bunn, E., Turner, S.R. & Dixon, K.W.** 2011. Biotechnology for saving rare and threatened florain a biodiversity hotspot. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 47: 188–200.
- Byrne, C., Maher, M.J., Hennerty, M.J., Mahon, M.J. & Walshe, P.A.** 2002. Reducing the nitrate content of protected lettuce. Irish Agriculture and Food Development Authority. University College, Dublin, p.19.
- Cao, C. L., Li, S. X. & Zhang, Z. P.** 2003. Effect of N form on the activity of protectase and wheat yield at the vegetative and reproductive growth stage. *China Journal Soil Science*. 14 (1): 294-298.
- Carneiro, D. N. M., Paiva, P. D. O. Cecília E. R. A. C., Carneiro, L. F. & Paiva, E.** 2009. Adubação foliar e via substrato no desenvolvimento inicial de mudas de bromélia imperial. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, 15(1): 23-28.
- Carvalho, V., Santos, D.S. & Nievola, C.C.** 2014. *In vitro* storage under slow growth and *ex vitro* acclimatization of the ornamental bromeliad *Acanthostachys strobilacea*. *South African Journal of Botany*, 92: 39-43.

- Cataldo, D.A., Maroon, M., Schrader, L.E. & Youngs, V.L. 1975.** Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 6(1): 71-80.
- Chen, J-W., Yang, Z-Q., Zhou, P., Hai, M-R., Tang, T-X., Liang, Y-L. & An, T-X. 2012.** Biomass accumulation and partitioning, photosynthesis, and photosynthetic induction in field-grown maize (*Zea mays* L.) under low- and high-nitrogen conditions. *Acta Physiology Plant* 35:95–105.
- Close, D.C. & Beadle, C.L. 2003.** The ecophysiology of foliar anthocyanin. *The Botanical Review* 69(2): 149-161.
- Conn, S., Franco, C. & Zhang, W. 2010.** Characterization of anthocyanic vacuolar inclusions in *Vitis vinifera* L. cell suspension cultures. *Planta*. 231:1343-1360.
- Cruz, J.L., Pelacani, C.R. & Araújo, W.L. 2008.** Influência do nitrato e do amônio sobre a fotossíntese e a concentração de compostos nitrogenados em mandioca. *Ciência Rural*, 38(3): 643-649.
- Cruz, B. P., Chedier, L. M., Peixoto, P. H. P., Fabri, R. L. & Pimenta, D. S. 2012.** Effects of light intensity on the distribution of anthocyanins in *Kalanchoe brasiliensis* Camb. and *Kalanchoe pinnata* (Lamk.) Pers. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 84(1): 211-217.
- Delgado-Vargas, F. & Paredes-Lopez, O. 2000.** Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains - Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(3):173-289.
- Deroles, S. 2009.** Anthocyanin biosynthesis in plant cell cultures: A potential source of natural colourants. *In: Anthocyanins: Biosynthesis, functions, and applications*. Springer. pp. 107-167.
- Do, C.B. & Cormier, F. 1990.** Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic potential in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspensions. *Plant Cell Reports*, 9: 143-146.
- Do C.B. & Cormier, F. 1991** Effects of high ammonium concentrations on growth and anthocyanin formation in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension cultured in a production medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 27: 169-174.
- Droste, A. Sasamori, M.H. & Júnior, D.R. 2016.** Baixas concentrações de macronutrientes beneficiam a propagação *in vitro* de *Vriesea incurvata* (Bromeliaceae), uma espécie endêmica da Floresta Atlântica, Brasil. *Rodriguésia* 67(4): 1071-1081.
- Endres, L & Mercier, H. 2007.** Influence of nitrogen forms on the growth and nitrogen metabolism of bromeliads. *Journal of Plant Nutrition*. 24(1): 29-42.
- Epstein, E. & Bloom, A.J. 2006.** Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas. Ed. Planta, Londrina, pp. 58-64.
- Faisal, M. & Anis, M. 2010.** Effect of light irradiations on photosynthetic machinery and antioxidative enzymes during *ex vitro* acclimatization of *Tylophora indica* plantlets. *Journal of Plant Interactions*, 5: 21-27.

- Falovo, C., Colla, G. Schreiner, M. Krumbein, A. & Schwarz, D.** 2009. Effect of nitrogen form and radiation on growth and mineral concentration of two *Brassica* species. *Scientia Horticulturae*, 123: 170-177.
- Fan, X-X., Xu, Z-G., Liu, X-Y., Tang, C-M., Wang L-W. & Han, X-I.** 2013. Effects of light intensity on the growth and leaf development of young tomato plants grown under a combination of red and blue light. *Scientia Horticulturae*, 153: 50-55.
- Ferreira, C.A., Paiva, P.D.O., Rodrigues, T.M., Ramos, D.P., Carvalho, J.G. & Paiva, R.** 2007. Desenvolvimento de mudas de bromélia (*Neoregelia cruenta* (R. Graham) L. B. Smith) cultivadas em diferentes substratos e adubação foliar. *Ciência e Agrotecnologia*, 31(3): 666-671.
- Fini, A., Brunettia, C., Ferdinando, M-D, Ferrinia, F. & Tattinia, M.** 2011. Stress-induced flavonoid biosynthesis and the antioxidant machinery of plants. *Plant Signaling & Behavior* 6(5): 709-711.
- Forzza, F.C., Costa, A.F. & Leme, E.M.C.** 2013. Bromeliaceae. *In*: Martinelli, G., Moraes, M.A. (eds.) Livro vermelho da flora do Brasil. 1st. ed. Rio de Janeiro, Centro Nacional da conservação da flora. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. pp. 315-396.
- Fu, Y., Li, H-Y., Yu, J., Liu, H., Cao, Z-Y. & Manukovsky, N. S.** 2017. Interactions effects of light intensity and nitrogen concentration on growth, photosynthetic characteristics and quality of lettuce (*Lactuca sativa* L. Var.youmaicai). *Scientia Horticulturae*, 214: 51-57.
- Garnett, T. Conn, V. & Kaiser, B.N.** 2009. Root based approaches to improving nitrogen use efficiency in plantspce. *Plant, Cell and Environment*, 32: 1272-1283.
- Giampaoli, P., Santos, D.S., Mollo, L., Kanashiro, S. & Tavares, A.R.** 2017. Effect of fertilisation with urea on development in the ornamental bromeliad *Aechmea fasciata*. *Revista Ciência Agronômica*, 48(4): 657-662.
- Giulietti, A. M., Pirani, J. R. & Harley, R. M.** 1997. Espinhaço range region, eastern Brazil. *In* Centres of plant diversity: aguide and strategy for their conservation. Vol. 3. Edited by S.D. Davis, V.H. Heywood, O. Herrera-MacBryde, J. Villa-Lobos, and A.C. Hamilton. IUCN Publication Unity, Cambridge. pp. 397-404.
- Giulietti, A. M., Harley, R. M., Queiroz, L. P., Wanderley, M. G. L. & Pirani, J.R.** 2000. Caracterização e endemismos nos campos rupestres da cadeia do espinhaço. *In* Tópicos Atuais em Botânica. Edited by T.B. Cavalcanti and B.M.T. Walter. SBB/ Embrapa, Brasília. pp. 311-318.
- Givnish, T.J., Barfuss, M.H.J., Van, E.B., Riina, R., Schulte, K., Horres, R., Gonsiska, P.A., Jabaily, R.S., Crayn, D.M., Smith, J.A.C. et al.** 2011. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *American Journal of Botany* 98: 872-895.
- Givnish, T.J., Barfuss, M.H.J., Van, E.B., Riina, R., Schulte, K., Horres, R., Gonsiska, P.A., Jabaily, R.S., Crayn, D.M., Smith, J.A.C. et al.** 2014. Adaptive radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 71: 55-78.

- Gould, K.S. 2004.** Nature's Swiss army knife: the diverse protective roles of anthocyanins in leaves. *Journal of Biomedicine Biotechnology*, 5:314-320.
- Gould, K.S., Neill, S.O. & Vogelmann, T.C. 2002.** A Unified Explanation for Anthocyanins in Leaves? *Advances in Botanical Research*, vol. 37, pp. 167-192.
- Guo, J., Han, W., Wang, M-H. 2008.** Ultraviolet and environmental stresses involved in the induction and regulation of anthocyanin biosynthesis: A review. *African Journal of Biotechnology*, 7(25): 4966-4972.
- Guo, S., Chen, G., Zhou, Y. & Shen, Q. 2007.** Ammonium nutrition increases photosynthesis rate under water stress at early development stage of rice (*Oryza sativa* L.) *Plant Soil*, 269: 115-124.
- Harbone, J.B. 1965.** Plant Polyphenols - XIV. *Phytochemistry*, 4: 107-120.
- Hatier, J-H. and Gould, K.S. 2007.** Black coloration in leaves of *Ophiopogon planiscapus* "Nigrescens". Leaf optics, chromaticity, and internal light gradients. *Funct. Plant Biology*, 34: 130-138.
- Hedrich, R. & Schroeder J.I. 1989.** The Physiology of ion channels and electrogenic pumps in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 40: 539-569.
- Helali, S.M., Nebli, H., Kaddour, R., Mahmoudi, H., Lachaâl, M. & Ouerghi, Z. 2010.** Influence of nitrate – ammonium ratio on growth and nutrition of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Soil*, 336:65-74.
- Hideg, É., Jansen, M.A.K. & Strid, A., 2013.** UV-B exposure, ROS and stress: inseparable companions or loosely linked associates? *Trends in Plant Science*, 18(2):107-115.
- Hikosaka, K. & Osone, Y. 2009.** A paradox of leaf-trait convergence: why is leaf nitrogen concentration higher in species with higher photosynthetic capacity? *Journal of Plant Research*, 122(3): 245-251.
- Hrazdina, G. & Jensen, R.A. 1992.** Spatial organization of enzymes in plant metabolic pathways. *Annual Review of Plant Biology*, 43(1): 241-267.
- Hrazdina, G., Zobel, A.M. & Hoch, H.C. 1987.** Biochemical, immunological, and immunocytochemical evidence for the association of chalcone synthase with endoplasmic reticulum membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84: 8966-8970.
- Kanashiro, S. 2005.** Nitrogênio, fósforo, potássio e cálcio e o crescimento de plântulas de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith *in vitro*. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. p.187.
- Kanashiro, S., Ribeiro, R.C.S. Gonçalves, A.N., Demétrio, V.A., Jocys, T. & Tavares, A.R. 2009.** Effect of calcium on the *in vitro* growth of *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Smith plantlets. *Journal of Plant Nutrition*, 32: 867-877.
- Karageorgou, P. & Manetas, Y. 2006.** The importance of being red when young: anthocyanins and the protection of young leaves of *Quercus coccifera* from insect herbivory and excess light. *Tree Physiology*, 26: 613-621.

- Khatami, F. & Ghanati, F.** 2011. Effects of UV irradiation on cell viability, anthocyanin, and flavonoid contents of callus-cultured *Malva neglecta* cells. International Conference on Life Science and Technology IPCBEE, vol. 3, IACSIT Press, Singapore.
- Kitamura, S., Shikazono, N. & Tanaka, A.** 2004. TRANSPARENT TESTA 19 is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in *Arabidopsis*. Plant Journal, 37:104-114.
- Klem, K., Holub, P., Stoch, M., Nezval, J., Spunda, V., Triska, J., Jansen, M.A.K., Robson, T.M. & Urban, O.** 2015. Ultraviolet and photosynthetically active radiation can both induce photoprotective capacity allowing barley to overcome high radiation stress. Plant Biochemistry, 93:74-83.
- Koike, T.** 2004. Autumn coloration, carbon acquisition and leaf senescence. In: Plant cell death processes. – Edited by Larry D. Noodén – Department of Biology – University of Michigan Elsevier Academic Press. 392.
- Konczak-Islam, I., Nakatani, M., Yoshinaga, M., Yamakawa, O.** 2001. Effect of ammonium ion and temperature on anthocyanin composition in sweet potato cell suspension culture. Plant Biotechnology, 18(2): 109-117.
- Kong, J.-M., Chia, L.-S., Goh, N.-K., Chia, T.F., Brouillard, R.** 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. Phitocheimistry, 64: 923-933.
- Kurita, F.M.K. & Tamaki, V.** 2014. *In vitro* growth of the bromeliad *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms with different concentrations of nitrogen. Acta Scientiarum Biological Sciences 36(3): 279-285.
- Lea, U.S, Slimestad, R., Smedvig, P. & Lillo, C.** 2007. Nitrogen deficiency enhances expression of specific MYB and bHLH transcription factors and accumulation of end products in the flavonoid pathway. Planta, 225: 1245-1253
- Lewis, C. E., Walker, J. R. L., Lancaster, J. E., Conner, A. J.** 1998. Light regulation of anthocyanins, flavonoid and phenolic acid biosynthesis in potato minitubers *in vitro*. Australian Journal of Plant Physiology, 25: 915-922.
- Li, B.H. & Shi, W.M.** 2007. Effects of elevated  $\text{NH}_4^+$  on *Arabidopsis* seedlings different in accessions. Acta Pedologica Sinica, 44: 508-515.
- Li, Q., LI, B-H., Kronzucker, H.J. & SHI, W.M.** 2010. Root growth inhibition by  $\text{NH}_4^+$  in *Arabidopsis* is mediated by the root tip and is linked to  $\text{NH}_4^+$  efflux and GMPase activitytype. Plant, Cell and Environment, 33: 1529-1542.
- Li, S-X., Wang, Z-H. & Stewart, B.A.** 2013. Responses of Crop Plants to Ammonium and Nitrate N. Advances in Agronomy, 118: 205-397.
- Liang, J. & He, J.** 2018. Protective role of anthocyanins in plants under low nitrogen stress. Biochemical and Biophysical Research Communication, 498: 946-953.
- Lichtenthaler, H.K. e Buschmann, C.** 2007. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS. Current Protocols in Food Analytical Chemistry F4.3.1-F4.3.8.

- Lima Filho, O. F. de, & Malavolta, E.** (1997). Sintomas de desordens nutricionais em estévia *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. *Scientia Agricola*, 54(1-2): 53-61.
- Liu, Y. & von Wirén, N.** 2017. Ammonium as a signal for physiological and morphological responses in plants. *Journal of Experimental Botany*. 68(10): 2581-2592.
- Long, W.J.** 2015. Analysis of anthocyanins in common foods using an Agilent Poroshell 120 SB-C18. Agilent Technologies, Inc. pp. 1-7.
- Lopes, T. J., Xavier, M. F., Quadri, M. G. N., Quadri, M. B.** 2007. Anthocyanins: a brief review of structural characteristics and stability. *Revista Brasileira de Agrociência*, 13(3): 291-297.
- Luck, H.** 1974. Catalases. 'Methods of Enzymatic Analysis Vol. 2'. (Ed HU Bregmeyer) pp. 885. (Academic Press: New York).
- Luther, H.E.** 2012. An alphabetical list of bromeliad binomials (13<sup>th</sup> ed., edited by Bruce Holst and Larry Rabinowitz). Marie Selby Botanical Gardens and Bromeliad Society International, Sarasota. pp. 44.
- Luz, G.L., Medeiros, S.L.P., Manfron, P.A., Amaral, A.D., Müller, L. Torres, M.G. & Mentges, L.** 2008. The nitrate issue in hydroponic lettuce and the human health. *Ciência Rural*, 38(8):2388-2394.
- Majer, P., Czégény, G., Sándor, G., Dix, P.J. & Hideg, E.** 2014. Antioxidant defence in UV-irradiated tobacco leaves is centred on hydrogen-peroxide neutralization. *Plant Physiology and Biochemistry*, 82: 239-243.
- Manetti, L.M., Delaporte, R.H. & Laverde Jr, A.** 2009. Metabólitos secundários da família Bromeliaceae. *Química Nova*, 32: 1885-1897.
- Março, P.H. Poppi, R.J. & Scarminio, I.S.** 2008. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. *Química Nova*, 31(5): 1218-1223.
- Markham, K.R., Gould, K.S., Winefield, C.S., Mitchell, K.A., Bloor, S.J., Boase, M.R.** (2000) Anthocyanic vacuolar inclusions: their nature and significance in flower colouration. *Phytochemistry*, 55: 327-336.
- Marschner, H.** 2012. Mineral Nutrition of Higher Plants. 3rd ed. London: Academic Press. pp.672.
- Martín, J., Navas, M.J., Jiménez-Moreno, A.M. & Asuero, A.G.** 2017. Anthocyanin Pigments: Importance, Sample Preparation and Extraction. Chapter from the book Phenolic Compounds – Natural Sources, Importance and Application. Published by INTECH. pp. 117-152.
- Martinelli, G., Moraes, M.A.** 2013. Livro vermelho da flora do Brasil. 1st. ed. Rio de Janeiro, Centro Nacional da conservação da flora. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. pp. 315-396.
- Martínez-Lüscher, J., Sánchez-Díaz, M., Delrot, S., Aguirreolea, J., Pascual, I., Gomès, E.** 2014. Ultraviolet-B radiation and water deficit interact to alter flavonol and anthocyanin profiles in Grapevine Berries through Transcriptomic Regulation. *Plant Cell Physiology*, 55(11): 1925-1936.
- Mccullough, H.** 1967. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clinica Chimica Acta*, 17(2):297-304.

- Medici, L.O., Azevedo, R.A., Smith, R.J. & Lea, P.J.**, 2004. The influence of nitrogen supply on antioxidant enzymes in plant roots. *Functional Plant Biology*, 31(1): 1-9.
- Mercier, H. & Kerbauy, 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.
- Ministério do Meio Ambiente.** 2014. Portaria 443. Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção.
- Mollo, L., Martins, M.C.M, Oliveira, V.F., Nievola, C.C., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2011. Effects of low temperature on growth and non-structural carbohydrates of the imperial bromeliad *Alcantarea imperialis* cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 107: 141-149.
- Munné-Bosch, S. & 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. & Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.
- Nakabayashi, R., Yonekura-Sakakibara, K., Urano, K., Suzuki, M., Yamada, Y, Nishizawa, T., Matsuda, F., Kojima, M., Sakakibara, H., Shinozaki, K., Michael, A.J., Tohge, T., Yamazaki, M. & Saito, K.** 2014. Enhancement of oxidative and drought tolerance in *Arabidopsis* by overaccumulation of antioxidant flavonoids. *The Plant Journal*, 77: 367-379.
- Nakamura, M.** 1989. Development of anthocyanoplasts in relation to coloration of ‘Kyoho’ grapes. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 58(3): 537-543.
- Nakamura, M.** 1993. Anthocyanoplasts in ‘Kyoho’ grapes. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 62: 353-358.
- Nakano, Y. & Asada, K.** 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant & Cell Physiology*, 22(5): 867-880.
- Naves, V.C.** 2001. *In vitro* propagation of imperial bromeliad *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms. Master’s Thesis, Federal University of Lavras, Lavras, Brazil.
- Negrelle, R.R.B., Mitchell, D. & Anacleto, A.** 2012. Bromeliad ornamental species: Conservation issues and challenges related to commercialization. *Acta Scientiarum*, 34(1): 91-100.
- Neill, S.O. & Gould, K.S.** 2003. Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants? *Function Plant Biology*, 30: 865-873.
- Neill, S., Desikan, R. & Hancock, J.** 2002. Hydrogen peroxide signaling. *Currents Opinions in Plant Biology*, 5: 388-395.
- Nievola, C.C., Mercier, H. & Majerowicz, N.** 2001. Levels of nitrogen assimilation in bromeliads with different growth habits. *Journal of Plant Nutrition* 24: 1387-1398.
- Nunes, J.V.C.** 2006. Bromeliads. In: *Sustainable Atlantic Forest: The Exploration of Its Forest Resources*, eds. L. L. Simões and C. F. Lino, pp. 119-132. São Paulo, Brazil: Senac.

- Oliveira, D.A., Neto, E.B, Nascimento, C.A, Fernandes, M.B., Silva, T. & Oliveira, R.A.** 2008. Alocação de biomassa em plantas de bambu em resposta a adubação mineral. *Scientia Agraria*, 9(2): 139-146.
- Oliveira, R.R.** 2004. Importância das bromélias epífitas na ciclagem de nutrientes da Floresta Atlântica. *Acta Botanica Brasilica*, 18(4): 793-799.
- Page, M., Sultana, N., Paszkiewicz, K. Florance, H. & SMIRNOFF, N.** 2012 The influence of ascorbate on anthocyanin accumulation during high light acclimation in *Arabidopsis thaliana*: further evidence for redox control of anthocyanin synthesis. *Plant, Cell and Environment*, 35: 388-404.
- Passeri, V., Koes, R. & Quattrocchio, F.M.** 2016. New Challenges for the Design of High Value Plant Products: Stabilization of Anthocyanins in Plant Vacuoles. *Frontier in Plant Science*, 7: 1-9.
- Peng, C.L., Lin, Z.F., Lin, G.Z. & Chen, S.W.** 2006. The anti-photooxidation of anthocyanin-rice leaves of a purple rice cultivar. – *Science in China Series C: Life Science*, 49: 543-551.
- Pereira, F.J., Magalhães, P.C., Souza, T.C., Castro, E.M. & Alves, J.D.** 2010. Atividade do sistema antioxidante e desenvolvimento de aerênquima em raízes de milho 'Saracura'. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 45(5): 450-456.
- Ponmozhi, P., Geethá, M., Saravana Kumar, M. & Suganya Devi, P.** 2011. Extraction of anthocyanin and analysing its antioxidant properties from *Pithecellobium dulce* fruit pericarp. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 4(1): 41-45.
- Prado, R.M.** 2008. *Nutrição de plantas*. São Paulo – Ed. Unesp, p. 407.
- Prior, R.L. & Wu, X.** 2006. Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radical Research*, 40(10): 1014-1028.
- Rodriguez-Amaya, D.B.** 2018. Update on natural food pigments - A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. *Food Research International*. pp. 1-12.
- Raven, P.H., Evert, R.F. & Eichhorn, S.E.** 2007. *Biologia vegetal*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Reboredo, F. & Lidon, F.C.** 2012. UV-B radiation effects on terrestrial plants – A perspective. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 24(6): 502-509.
- Rocha, C.F.D., Cogliatti-Carvalho, L., Almeida, D.R. & Freitas, A.F.N.** 1997. Bromélias: ampliadoras da biodiversidade. *Bromelia*, 4: 7-10.
- Rodrigues, T.M., Paiva, P.D.O., Rodrigues, C.R., Carvalho, J.G., Ferreira, C.A. & Paiva, R.** 2004. Desenvolvimento de mudas de bromélia-imperial (*Alcantarea imperialis*) em diferentes substratos. *Ciênc. agrotec., Lavras*, v. 28, n. 4, p. 757-763.
- Saito, N. & Harbone, J.N.** 1983. A cyanidin glycoside giving scarlet coloration in plants of the bromeliaceae. *Phytochemistry*. Volume 22, Issue 8, 1735-1740.
- Saleem, M.F., Ma, B.L., Voldeng, H. & Wang, T.-C.** 2010. Nitrogen nutrition on leaf chlorophyll, canopy reflectance, grain protein and grain yield of wheat varieties with contrasting grain protein concentration. *Journal of Plant Nutrition*, 33(11): 1681-1695.

- Sanches, L.V.C., Ludwig, F. Villas Bôas, R.L. & Mateus, C.M.A.** 2017. Growth of *Aechmea fasciata* plants in function of substrate base saturation and fertirrigation methods. *Ornamental Horticulture*, 23(4): 444-450.
- Santos, E.F.A., Reis, S.N., Frazão, J.E.M. & Nascimento, A.** 2015. Adubação nitrogenada via substrato no cultivo de bromélia. *Ornamental Horticulture*, 21(2): 185-192.
- Sarasan, V., Cripps, R., Ramsay, M.M., Atherton, C., Mcmichen, M., Prendergast, G. & Rowntree, J.K.** 2006. Conservation *in vitro* of threatened plants: progress in the past decade. *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 42(1): 206-214.
- Schaedle M. & Bassham, J.A.** 1977. Chloroplast glutathione reductase. *Plant Physiology*, 59: 1011-1012.
- Scogin, R.** 1985. Floral Anthocyanins in the Genus *Puya*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 13: 387-389.
- Shan, A.Y.K.V., Oliveira, L.E.M., Bonome, L.T.S. & Mesquita, A.C.** 2012. Assimilação metabólica de nitrogênio em plântulas de seringueira cultivadas com nitrato ou amônio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47(6): 754-762.
- Shi, M-Z & Xie, D-Y.** 2010. Features of anthocyanin biosynthesis in *pap1-D* and wild-type *Arabidopsis thaliana* plants grown in different light intensity and culture media conditions. *Planta*, 231: 1385-1400.
- Silva, P.P.A., Kurita, F.M.K. & Tamaki, V.** 2012. Growth of bromeliad *Ananas ananassoides* in different concentrations of nitrogen. *Communications in Plant Sciences (2237-4027)*, 2(3-4): 109-11.
- Silva, P.P.A., Kurita, F.M.K. & Tamaki, V.** 2017. *In vitro* propagation of *Ananas comosus* var. *ananassoides* (Baker) Coppens & F. Leal (Bromeliaceae). *Científica*, 45(3): 313-320.
- Silva Júnior, J.M., Rodrigues, M., De Castro, E.M., Bertolucci, S.K.V. & Pasqual, M.** 2013. Changes in anatomy and chlorophyll synthesis in orchids propagated *in vitro* in the presence of urea. *Acta Scientiarum Agronomy*, 35(1): 65-72.
- Simões-Gurgel, C., Cordeiro, L.S., Castro, T.C., Callado, C.H., Albarello, N. & Mansur, E.** 2011. Establishment of anthocyanin-producing cell suspension cultures of *Cleome rosea* Vahl ex DC. (Capparaceae). *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 106: 537-545.
- Simões, C., Albarello, N., Castro, N. A. & Mansur, E.** 2012. Production of Anthocyanins by Plant Cell and Tissue Culture Strategies. *Biotechnological Production of Plant Secondary Metabolites*, 67-86.
- Soledad, O.N., Florencia, M.M., Laura, F.M., Raúl, D.G., Balbina, A.A. & Pía, O. F.** 2015. *Plant Physiology and Biochemistry*, 88: 1-8.
- Soubeyrand, E., Basteaub, C., Hilbertb, G., Leeuwena, C.V., Delrota, S. & Gomèsa, E.** 2014. Nitrogen supply affects anthocyanin bio synthetic and regulatory genes in grapevine cv. Cabernet-Sauvignon berries. *Phytochemistry*. 103: 38-49.

- Souza, F.V.D., Souza, A.S., Santos-Serejo, J.A., Souza, E.H., Junghas, T.G. & Silva, M.J.** 2009. Micropropagação do abacaxizeiro e outras bromeliáceas. *In*: Junghas, T.G, Souza, A.S (ed). Aspectos práticos da micropropagação de plantas. vol. 1. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, pp.177-205.
- Souza, E.H., Carmello-Guerreiro, S.M., Souza, F.V.D., Rossi, M.L. & Martinelli, A.P.** 2016. Stigma structure and receptivity in Bromeliaceae. *Scientia Horticulture*, 203: 118-125.
- Steyn, W.J., Wand, S.J.E., Holcroft, D.M. & Jacobs, G.** 2002. Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist*, 155(3): 349-361,
- Sugiharto, B., K. Miyata, H. Nakamoto, H. Sasakawa & T. Sugiyama.** 1990. Regulation of expression of carbon-assimilating enzymes by nitrogen in maize leaf. *Plant Physiology*, 92: 963-969.
- Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R. & Miller, G.** 2012. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell and Environment*, 35(2): 259-267.
- Taiz, L. & Zeiger, E.** 2013. *Fisiologia Vegetal*. Porto Alegre: Artmed, pp. 918.
- Takahashi, S., Milward, S.E., Yamori, W., Evans, J.R., Hillier, W. & Badger, M.R.** 2010. The Solar Action Spectrum of Photosystem II Damage. *Plant Physiology*, 153: 988-993.
- Tamaki, V., Mercier, H. & Nievola, C.C.** 2007. 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., De Paula, S.M., Nievola, C.C. & Kanashiro, Shoey.** 2011. Soluções nutritivas alternativas para o cultivo de bromélias ornamentais. *O Mundo da Saúde*, São Paulo; 35(1): 91-97.
- Tanaka, Y., Sasaki, N. & Ohmiya, A.** 2008. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal*, 54: 733-749.
- Terashima, I. & Evans, J.R.** 1988. Effects of light and nitrogen nutrition on the organization of the photosynthetic apparatus in spinach. *Plant Cell Physiology*, 29: 143-155.
- Treutter, D.** 2010. Managing phenol contents in crop plants by phytochemical farming and breeding visions and constraints. *International Journal of Molecular Sciences*, 11: 807–857.
- Trojak, M. & Showron, E.** 2017. Role of anthocyanins in high-light stress response. *World Scientific News*, 81(2): 150-168.
- Turazi, C.M.V. Junqueira, A.M.R., Oliveira, S.A. & Borgo L.A.** 2006. Acúmulo de nitrato em alface em função da adubação, horário de colheita e tempo de armazenamento. *Horticultura Brasileira*, 24: 65-70.
- Vanhoutte, J., Ceusters, J. & De Proft, M.P.** 2016. The ‘tubing’ phenomenon in commercial cultivation of *Guzmania*: morphology, physiology and anatomy. *Scientia Horticulturae*, 205:112-118.
- Versieux, L. M. & Wanderley, M. G. L.** 2015. Bromélias-gigantes do Brasil. Offset Editora, p. 202.
- Versieux, L.M.** 2009. Sistemática, filogenia e morfologia de *Alcantarea* (Bromeliaceae). Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.

- Vieira, D.A.P., Portes, T.A, Stacciarini-Seraphin, E. & Teixeira, J.B.** (2010). Fluorescência e teores de clorofilas em abacaxizeiro cv. pérola submetido a diferentes concentrações de sulfato de amônio. *Rev. Bras. Frutic.*, 32(2): 360-368.
- Wang, H., Fan, W., Li, H., Yang, J., Huang, J. & Zhang, P.** 2013. Functional characterization of dihydroflavonol-4-reductase in anthocyanin biosynthesis of purple sweet potato underlies the direct evidence of anthocyanins function against abiotic stresses. *Plos One*, 4(8):11 .
- Weatherburn, M.W.** 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Laboratory of Hygiene, National Health and Welfare, Ottawa, Canada.* 39(8): 971-974.
- Weng, X-Y., Zheng, C-J. Xu, H-X. & Sun, J.Y.** 2007. Characteristics of photosynthesis and functions of the water-water cycle in rice (*Oryza sativa*) leaves in response to potassium deficiency. *Physiologia Plantarum*, 131: 614-621.
- Wiltshire, E.J. & Collings, D.A.** 2009. New dynamics in an old friend: dynamic tubular vacuoles radiate through the cortical cytoplasm of red onion epidermal cells. *Plant Cell Physiology*, 50: 1826-1839.
- Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E. & Prior, R. L.** 2006. Concentrations of anthocyanins in common foods in the united states and estimation of normal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 4069-4075.
- Xie, M-Z & Shie, D-Y.** 2010. Features of anthocyanin biosynthesis in pap1-D and wild-type *Arabidopsis thaliana* plants grown in different light intensity and culture media conditions. *Planta*, 231: 1385-1400.
- Xu, Z. & Rothstein, S.J.** 2018. ROS-Induced anthocyanin production provides feedback protection by scavenging ROS and maintaining photosynthetic capacity in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior*, 13:3.
- Xu, C., Chen, J., Sun H., Cai, X., Wang X.-L., Ge, C, Zheng, Y., Zhang, Z., Huang, S., Fei, Z. et al.** 2017. Draft genome of spinach and transcriptome diversity of 120 *Spinacia* accessions. *Nature Communications* 8.
- Xu, G., Fan, X. & Miller, A.** 2012. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annual Review of Plant Biology*, 63: 153-182.
- Yuan, Y., Chiu, L-W, Li, L.** 2009. Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in red cabbage. *Planta*, 230:1141–1153.
- Zhang, Y.P., Lin, X.Y., Zhang, Y.S., Li, G. & Yang, Y.J.** 2006. Effects of nitrogen forms on the growth and antioxidation enzyme activities of spinach. *Journal of Zhejiang University. (Agriculture & Life Science)*, 32(2): 139-144.
- Zhang, Q., Su, L.-J., Chen, J.-W., Zeng, X.-Q., Sun, B.-Y. & Peng, C.-L.** 2012. The antioxidative role of anthocyanins in *Arabidopsis* under high-irradiance. *Biologia Plantarum*, 56 (1): 97-104.
- Zhang, C., Jia, H., Wu, W., Wang, X., Fang, J. & Wang, C.** 2015. Function conservation analysis and expression modes of grape anthocyanin synthesis genes responsive to low temperature stress. *Gene*, 574(1): 168-177.

**Zhou, L-L., Shi, M-Z., & Xie, D-Y.** 2012 Regulation of anthocyanin biosynthesis by nitrogen in TTG1–GL3/TT8–PAP1-programmed red cells of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 236: 825-837.

## ANEXOS

**Tabela 1.** Concentrações de macronutrientes e micronutrientes ( $\text{g.L}^{-1}$ ) contidas na formulação do meio de Murashige & Skoog (MS) (1962).

Sais	Quantidade ( $\text{g.L}^{-1}$ )
<b>Macronutrientes</b>	
$\text{KNO}_3$	1,90
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1,65
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,44
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,37
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,17
<b>Micronutrientes</b>	
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,0223
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0086
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,0062
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,00025
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,000025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,000025

Conforme visualizado nos cromatogramas, ocorreram variações nos tempos de retenção que foram ocasionadas por fatores externos. A fim de garantir a confiabilidade dos resultados, optou-se por passar os padrões analíticos diariamente antes das análises. Assim foi possível monitorar o deslocamento dos picos e identificá-los em cada amostra analisada.

**Tabela 2.** Dados das análises cromatográficas de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms cultivadas *in vitro* por 6 meses sob diferentes concentrações de  $\text{NO}_3^-$ .

Tratamentos		Dados Cromatográficos			
$\text{NO}_3^-$	Pico	$T_R^1$ (min)	Largura (cm)	Altura (mAU)	Área (mAU*s)
<b>3,75 mM</b>	1	18,2	0,32	1,2	30,6
	2	26,3	0,41	6,3	198,8
	3	31,8	0,27	2,8	49,7
	4	34,8	0,14	2,3	20,4
<b>7,5 mM</b>	1	19,8	0,35	1,2	34,4
	2	28,8	0,43	3,7	129,3
	3	33,2	0,20	0,7	10,6
	4	35,7	0,11	0,3	2,2
<b>15 mM</b>	1	19,1	0,58	0,1	4,3
	2	27,8	0,62	0,5	20,1
	3	32,4	0,23	0,2	2,6
	4	34,8	0,16	0,1	1,0

<sup>1</sup>Tempo de Retenção

**Tabela 3.** Dados das análises cromatográficas de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms cultivadas *in vitro* por 6 meses sob diferentes concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

Tratamentos		Dados Cromatográficos			
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	Pico	$T_R^1$ (min)	Largura (cm)	Altura (mAU)	Área (mAU*s)
<b>3,75 mM</b>	1	14,793	0,43	0,35	9,1
	2	18,034	0,42	1,40	44,1
	3	20,659	0,55	0,30	9,8
	4	26,363	0,60	7,50	294,7
	5	31,712	0,30	2,60	50,7
	6	34,348	0,14	2,60	24,2
<b>7,50 mM</b>	1	14,550	0,47	0,44	12,3
	2	17,736	0,45	2,20	68,1
	3	20,363	0,51	0,19	5,8
	4	25,993	0,56	4,80	182,1
	5	31,536	0,29	0,77	15,1
	6	34,291	0,15	0,48	4,6
<b>15,00 mM</b>	1	14,828	0,40	0,10	2,5
	2	18,050	0,52	0,71	24,3
	3	20,701	0,56	0,05	1,8
	4	26,333	0,50	1,40	53,7
	5	31,693	0,26	0,63	11,9
	6	34,340	0,14	0,25	2,4

<sup>1</sup>Tempo de Retenção

**Tabela 4.** Dados obtidos nas análises cromatográficas de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms cultivadas em casa de vegetação por 12 meses sob diferentes concentrações de  $\text{NO}_3^-$ .

Tratamentos		Dados Cromatográficos			
$\text{NO}_3^-$	Pico	$T_R^1$ (min)	Largura (cm)	Altura (mAU)	Área (mAU*s)
<b>3,75 mM</b>	1	17,4	0,35	1,30	37,3
	2	25,4	0,40	2,39	79,5
	3	31,2	0,30	4,60	91,4
	4	34,1	0,14	1,19	11,4
<b>7,5 mM</b>	1	17,2	0,34	1,14	32,2
	2	25,1	0,47	3,19	124,8
	3	31,0	0,30	9,93	196,5
	4	34,0	0,15	2,36	23,6
<b>15 mM</b>	1	17,6	0,44	15,10	448,3
	2	25,7	0,48	11,37	397,1
	3	31,3	0,29	26,23	503,9
	4	34,1	0,15	3,27	31,2

<sup>1</sup> Tempo de Retenção

**Tabela 5.** Dados obtidos nas análises cromatográficas de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms cultivadas em casa de vegetação por 12 meses sob diferentes concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

Tratamentos		Dados Cromatográficos			
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	Pico	$T_R^1$ (min)	Largura (cm)	Altura (mAU)	Área (mAU*s)
<b>3,75 mM</b>	1	15,850	0,46	5,29	165,97
	2	19,146	0,56	24,16	899,28
	3	22,004	0,51	1,84	71,58
	4	27,759	0,71	36,50	1760,91
	5	32,577	0,31	49,93	1044,03
	6	35,054	0,14	14,23	139,08
<b>7,50 mM</b>	1	18,340	0,51	4,79	167,52
	2	21,923	0,61	22,59	921,61
	3	25,235	0,55	1,69	72,52
	4	31,068	0,52	53,11	1877,74
	5	34,324	0,27	58,89	1070,25
	6	36,203	0,14	15,83	149,69
<b>15,00 mM</b>	1	14,209	0,36	11,68	275,81
	2	17,251	0,44	50,83	1466,27
	3	19,869	0,40	4,20	115,21
	4	25,132	0,52	78,56	2682,15
	5	31,053	0,30	80,23	1603,17
	6	34,090	0,14	22,91	219,88

<sup>1</sup> Tempo de Retenção

**Tabela 6.** Dados obtidos nas análises cromatográficas de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms após 6 meses de cultivo *in vitro* sob alta PAR ( $700 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ ) e controle ( $50 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ ).

Tratamento	Dados Cromatográficos				
	Pico	T <sub>R</sub> <sup>1</sup> (min)	Largura (cm)	Altura (mAU)	Área (mAU*s)
PAR	1	19,114	0,53	0,10	3,41
	2	27,679	0,60	0,24	8,85
	3	32,501	0,32	0,06	1,29

<sup>1</sup> Tempo de Retenção

**Tabela 7.** Dados obtidos nas análises cromatográficas de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms cultivadas por 6 meses em câmaras sob diferentes intensidades de radiação UV-B.

Tratamentos		Dados Cromatográficos			
UV-B	Pico	T <sub>R</sub> <sup>1</sup> (min)	Largura (cm)	Altura (mAU)	Área (mAU*s)
UV ambiente	1	14,199	0,35	0,14	3,02
	2	17,072	0,40	1,75	48,22
	3	19,884	0,42	0,22	2,62
	4	24,957	0,48	4,60	70,05
	5	31,085	0,37	0,25	2,62
	6	34,498	0,20	0,18	1,07
UV-	1	14,465	0,37	0,25	5,67
	2	17,371	0,41	2,31	64,71
	3	20,175	0,48	0,49	14,26
	4	25,328	0,50	7,94	265,62
	5	31,338	0,33	0,32	6,51
	6	34,578	0,19	0,26	3,01
UV+	1	13,444	0,3671	0,95	20,90
	2	16,214	0,4024	11,83	310,86
	3	18,739	0,3780	1,66	42,97
	4	23,637	0,4879	24,92	794,61
	5	30,024	0,3759	2,55	63,57
	6	33,699	0,1758	1,28	14,77

<sup>1</sup> Tempo de Retenção