

Antônio Azeredo Coutinho Neto

Efeitos de diferentes fontes de nitrogênio e do déficit hídrico
sobre o desenvolvimento e a modulação do metabolismo ácido
das crassuláceas (CAM) em plantas atmosféricas de
Guzmania monostachia

Effects of different sources of nitrogen and water deficiency
on development and modulation of crassulacean acid
metabolism (CAM) in atmospheric plants of
Guzmania monostachia

São Paulo
2017

Antônio Azeredo Coutinho Neto

Efeitos de diferentes fontes de nitrogênio e do déficit hídrico sobre o desenvolvimento e a modulação do metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) em plantas atmosféricas de

Guzmania monostachia

Effects of different sources of nitrogen and water deficiency on development and modulation of crassulacean acid metabolism (CAM) in atmospheric plants of *Guzmania monostachia*

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências na Área de Botânica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Helenice Mercier

Versão corrigida da dissertação de mestrado. A versão original encontra-se na biblioteca da USP.

São Paulo
2017

Ficha Catalográfica

Coutinho Neto, Antônio Azeredo.

Efeito de diferentes fontes de nitrogênio e do déficit hídrico sobre o desenvolvimento e a modulação do metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) em plantas atmosféricas de *Guzmania monostachia*. / Antônio Azeredo Coutinho Neto; orientadora Helenice Mercier. – São Paulo, 2017.

Número de páginas: 85f.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

1. Nitrogênio 2. Metabolismo ácido das crassuláceas – CAM 3. Metabolismo antioxidante 4. Bromeliaceae 5. Bromélia epífita atmosférica. I. Título. II. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

LC:

Comissão Julgadora:

Prof (a). Dr (a).

Prof (a). Dr (a).

Orientadora Prof^a. Dr^a. Helenice Mercier

Dedicatória

À minha mãe que sempre me apoiou.

Epígrafe

Do mesmo modo que existem, como é costume dizer, muitos caminhos na floresta, encontrei, com muita vantagem, o caminho da metamorfose, a perspectiva é suficientemente espiritual, e, como a ideia se presta a ser preenchida pela experiência e se sujeita a verificação, devo reconhecer que se trata de um modo de representação que sempre me deu muito contentamento.

[Carta de Johann Wolfgang Von Goethe a J. G. Schlosser 30 de agosto de 1799. In: GOETHE, J. W. V. **A metamorfose das plantas**. Tradução de Friedhelm Zimpel. 4^o. ed. Antroposófica, 2005].

Agradecimentos

Agradeço sinceramente...

À minha mãe (Lucinéia Vicente) por apoiar e ajudar nas decisões que tomei e sempre me incentivar na busca da realização dos meus sonhos.

À Prof^ª. Dr^ª. Helenice Mercier pela orientação, ensinamentos, confiança, disponibilidade em me guiar durante esta jornada e pela amizade.

À Prof^ª. Dr^ª. Gladys Flávia de Albuquerque Melo de Pinna que me ensinou e apoiou em todas as análises anatômicas e por ser uma amiga querida.

À Dr^ª. Ana Zangirólame Gonçalves que me ensinou, acompanhou nas análises estatísticas, discussões ecofisiológicas, se tornando uma amiga querida.

À Dr^ª. Cassia Ayumi Takahashi que me ensinou as técnicas relacionadas com enzimologia prática no metabolismo do nitrogênio, além de outras técnicas laboratoriais, e que me apoiou e aconselhou nos momentos difíceis do meu trabalho e vida. Mais uma amiga que ganhei durante a pós-graduação.

À Dr^ª. Maria Elisabeth Abreu e MsC. Victória de Carvalho que me ensinaram e forneceram todo o suporte a respeito das técnicas de antioxidantes. São amigas que também ganhei nesse período.

Ao Prof. Dr. Paulo Tamaso Miotto e à amiga Dr^ª. Paula Natália Pereira pelos ensinamentos laboratoriais e técnicas relacionadas ao CAM.

À Dr^ª. Sabrina Latansio Costa Ribeiro pelos conhecimentos teóricos e práticos sobre o metabolismo fotossintético e por sua amizade aconchegante.

Ao Prof. Dr. Gilberto Barbante Kerbauy, à Prof^ª. Dr^ª. Catarina Carvalho Nievola e à Prof^ª. Dr^ª. Fanly Fungyi Chow Ho pelas preciosas contribuições prestadas na banca de qualificação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sodek Ladslav por me permitir usar o laboratório de fisiologia molecular de plantas e pelos ensinamentos transmitidos em relação à dosagem de aminoácidos. À Dr^ª Sarah Caroline Ribeiro de Souza que também me auxiliou neste assunto.

Ao Prof. Dr. Rafael Silva Oliveira que disponibilizou o seu laboratório para que as análises isotópicas fossem iniciadas, fornecendo todo apoio possível nessas análises.

Ao Prof. Dr. Luís Eduardo Soares Netto pelo auxílio nos cálculos enzimáticos antioxidantes e discussão sobre protocolos.

Ao MsC Fábio Alves Ortiz, especialmente, durante boa parte do desenvolvimento desta dissertação por acompanhar, ajudar e escutar as minhas mazelas durante esta etapa.

Aos meus amigos e colegas, que mesmo de longe, acompanharam meu trabalho, sempre me incentivando e compreendendo as minhas recorrentes ausências.

Aos alunos do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal que contribuíram diretamente ou indiretamente: Dr^a. Alejandra Matiz Lopez, MsC. Bruno Nobuya Katayama Gobara, Dr^a. Carolina Krebs Kleingesinds, Dêvisson Luan Oliveira Dias, Dioceni Mancilha, MsC. Filipe Christian Pikart, MsC. Frederico Rocha Rodrigues Alves, Dr. Paulo Marcelo Rayner Oliveira, Priscila Pires Bittencourt, MsC. Priscila Primo Andrade Silva, MsC. Rafael Zuccarelli, Renata Callegari Ferrari e Dr. Ricardo Ernesto Bianchetti.

Aos amigos do Laboratório de Algas Marinhas, Camila Lopes Lira, Mariana Sousa de Melo, MsC. Sabrina Gonçalves Raimundo e a todos não citados nominalmente aqui.

Aos técnicos: Dr^a. Aline Bertinatto Cruz, à minha amiga querida Ana Maria Rodrigues, à amiga Fernanda Oliveira Menezes, à amiga querida Mayara Cristina Folgati Silva e ao Willian da Silva Oliveira, agradeço.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Botânica: Carlos Alberto Ramos de Oliveira, Norberto Palacios, Danilo Bonamin e Kamila Nery Pecorari, agradeço.

Aos funcionários da seção de pós-graduação em especial: Érika Harumi Takamoto de Camargo e ao Gilmar Silva Neves, que sempre me ajudaram.

À bibliotecária Maria Inês Conte que esclareceu dúvidas e forneceu suporte quanto à formatação desta dissertação.

Aos alunos, funcionários e professores do Instituto de Biociências que tornaram de alguma forma este trabalho possível.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Projeto temático – Processo: 2011/50637-0) pelo apoio financeiro ao Laboratório.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Bolsa de mestrado proc. n^o: 2015/134123-8) pela bolsa recebida.

Muito

obrigado!

Índice

Introdução Geral	9
Hipóteses e objetivos dos capítulos	15
Referências bibliográficas	17
Capítulo 01 – Efeito de fontes de nitrogênio inorgânicas e orgânicas sobre a anatomia, o crescimento e desenvolvimento de plantas atmosféricas de <i>G. monostachia</i> cultivadas in vitro.....	21
Resumo	21
Abstract	22
Introdução	23
Material e métodos	26
Obtenção do material vegetal e condições de cultivo in vitro	26
Medidas morfométricas.....	26
Análises anatômicas foliares	26
Análises fisiológicas	28
Discussão	33
Referências bibliográficas	39
Figuras	45
Capítulo 02 – Efeitos de diferentes fontes de nitrogênio e do déficit hídrico sobre o grau de expressão do CAM em plantas atmosféricas de <i>Guzmania monostachia</i> cultivadas in vitro.....	56
Resumo	56
Abstract	57
Introdução	58
Material e métodos	62
Obtenção do material vegetal e cultivo em diferentes fontes de N	62
Tratamento com deficiência hídrica.....	63
Resultados	67
Discussão	69
Referências bibliográficas	74
Tabelas	79
Figuras	80
Resumo Geral	84
Abstract	85

Introdução Geral

A sobrevivência das plantas no ambiente terrícola encontrou diversos desafios, como a fusão de gametas, dispersão de propágulos, estabelecimento de plantas jovens, a absorção, o transporte e a assimilação de água e nutrientes. Os mesmos desafios encontrados na conquista do ambiente terrícola foram encontrados no ambiente atmosférico por plantas que são denominadas epífitas (LÜTTGE, 1989). As epífitas vasculares compreendem cerca de 24 mil espécies distribuídas em várias famílias (NADKARNI; MERWIN; NIEDER, 2001). De acordo com o Brazil Flora Group – BFG (2015), cerca de 3.425 espécies de epífitas foram registradas no Brasil em 2015, distribuídas na Floresta Atlântica, Floresta Amazônica, Cerrado, Caatinga, Pampa e Pantanal.

O ambiente epifítico é caracterizado por apresentar intermitência de água e nutrientes, e uma das famílias de plantas mais adaptadas a esse ambiente é a família Bromeliaceae (PADILHA, 1973; BENZING, 1987). Essa família tem cerca de 3.352 espécies distribuídas em 58 gêneros que ocorrem ao longo das zonas tropical e subtropical, desde o sul dos Estados Unidos até o Sul do Chile e Argentina, com uma única espécie na África Ocidental (JACQUES-FÉLIX, 2000; GIVINISH et al., 2011; LUTHER, 2010). No Brasil ocorrem cerca de 1.307 espécies de bromélias ao longo dos diferentes ambientes e habitats (BFG, 2015).

As bromélias apresentam suas folhas organizadas em roseta, podendo, em algumas plantas adultas, formar um reservatório (tanque) com capacidade de armazenar água e nutrientes. Na superfície foliar das bromélias existem estruturas epidérmicas especializadas (figura 1), conhecidas como tricomas (BENZING, 2000). Esses tricomas atuam na absorção de água e nutrientes, na função de reflexão da luz e diminuição da temperatura foliar, além de reduzir a transpiração (BENZING; SEEMANN; RENFROW, 1978). Por meio dos tricomas distribuídos desde o ápice até a base da folha, as bromélias, então, conseguem absorver água e nutrientes depositados no interior do tanque, sendo que principalmente as bases foliares teriam uma semelhança funcional com raízes de plantas terrícolas (BENZING, 2000; ZOTZ; HIETZ, 2001; TAKAHASHI; MERCIER, 2011). Por sua vez, as raízes reduzidas das bromélias

epífitas já foram descritas como órgão principalmente relacionado à fixação da planta ao substrato (PITTENDRIGH, 1948; BENZING, 2000). As pesquisadoras Nievola e Mercier (1996) obtiveram resultados de maior absorção de nitrato por meio das folhas em comparação com as raízes na espécie adulta *Vriesea fosteriana*, sugerindo que possivelmente as raízes seriam funcionalmente ativas, mas teriam pouca importância nesse processo. Entretanto, sabe-se, atualmente, que a funcionalidade das raízes de bromélias do gênero *Vriesea* pode variar entre as espécies ou ainda ao longo do estágio de desenvolvimento (fase jovem até a fase adulta) (VANHOUTTE et al., 2017).

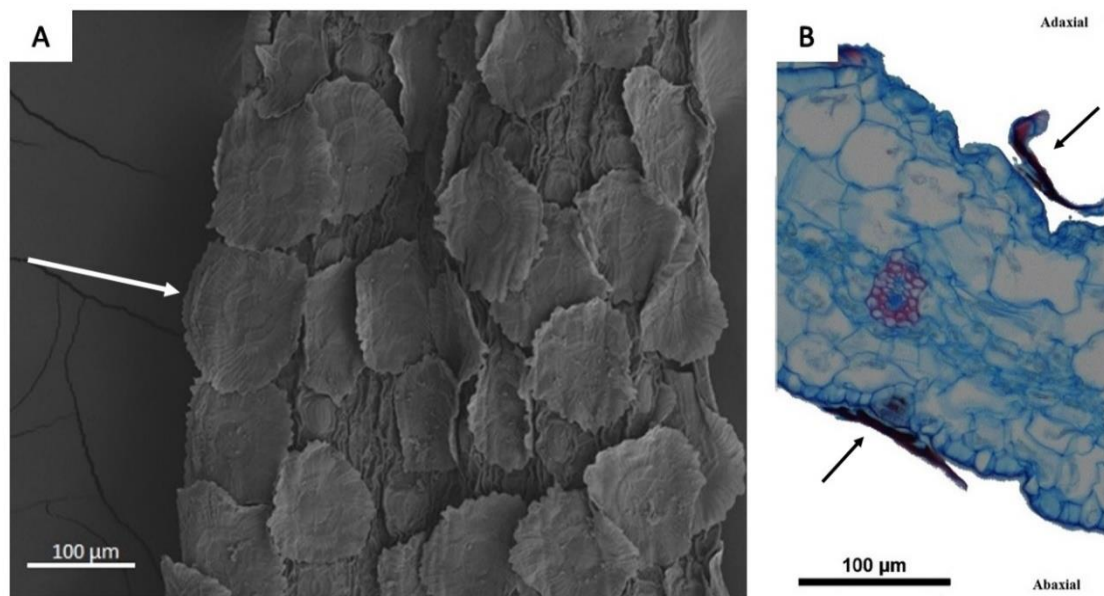


Figura 1: **A** – Aspecto geral da face abaxial da epiderme em MEV mostrando a distribuição dos tricomas. **B** – Secção transversal da folha atmosférica na região mediana mostrando tricomas em ambas as faces.

De acordo com Pittendrigh (1948), as bromélias podem ser subdividas em quatro grandes tipos ecológicos, no qual o tipo I é caracterizado por plantas com o sistema radicular altamente desenvolvido e geralmente com função na absorção d'água e nutrientes do solo (terrícolas); no Tipo II a absorção ocorre tanto por meio das raízes quanto pelas folhas (tanque); no Tipo III observa-se a presença do tanque e absorção de nutrientes e água, que ocorrem basicamente pelos tricomas nas folhas que formam esse tanque, e o tipo IV em que as plantas não apresentam tanque e presume-se que absorvam toda a água e nutrientes necessários pelos tricomas foliares (bromélias conhecidas como atmosféricas). Devido estas diferentes características ecofisiológicas das bromélias, existem espécies habitando os mais variados ambientes, inclusive as

plantas totalmente independentes de um substrato (solo) para obter nutrientes e água, essas são ditas como totalmente atmosféricas (CRAYN; WINTER; SMITH, 2004).

Algumas espécies de bromélias apresentam mudanças morfológicas e ecofisiológicas ao longo de sua ontogenia, conhecida como heteroblastia, na qual a bromélia juvenil possui um estágio atmosférico (tipo ecofisiológico IV) em sua fase inicial e, ao longo do seu crescimento e desenvolvimento, apresenta tanque (tipo III) ao chegar na fase adulta (ZOTZ; WILHELM; BECKER, 2011). Outras modificações também ocorrem da fase atmosférica para a fase com tanque, como: as bromélias atmosféricas apresentam quantidade uniforme de tricomas ao longo das folhas, enquanto na fase tanque existe um gradiente crescente do ápice para as bases; a existência de um acúmulo de água e nutrientes num reservatório externo na fase de tanque, enquanto não há esse acúmulo na fase atmosférica (SAKAI; SANFORD, 1980; ADAMS III; MARTIN, 1986).

A família Bromeliaceae atualmente apresenta oito subfamílias (Brocchinioideae, Lindmanioideae, Hechtioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae, Bromelioideae e Tillandsioideae), dentro dessas subfamílias estão distribuídos distintos gêneros e espécies com características morfológicas, de crescimento e de desenvolvimento em diferentes habitats (BENZING; BURT, 1970; GIVINISH et al., 2011). Dentro da subfamília Tillandsioideae, o gênero *Guzmania* possui 200 espécies e a espécie *Guzmania monostachia* (L.) Rusby ex. Mez. (figura 2), por exemplo, apresenta desenvolvimento heteroblástico (MARTINELLI et al., 2008). Essa espécie ocupa florestas tropicais em partes da Flórida, oeste da América do Sul e em subpopulações vulneráveis no nordeste do Brasil, nos estados do Ceará e Pernambuco (MARTINELLI; MORAES, 2013; GOVAERTS; LUTHER; GRANT, 2016).

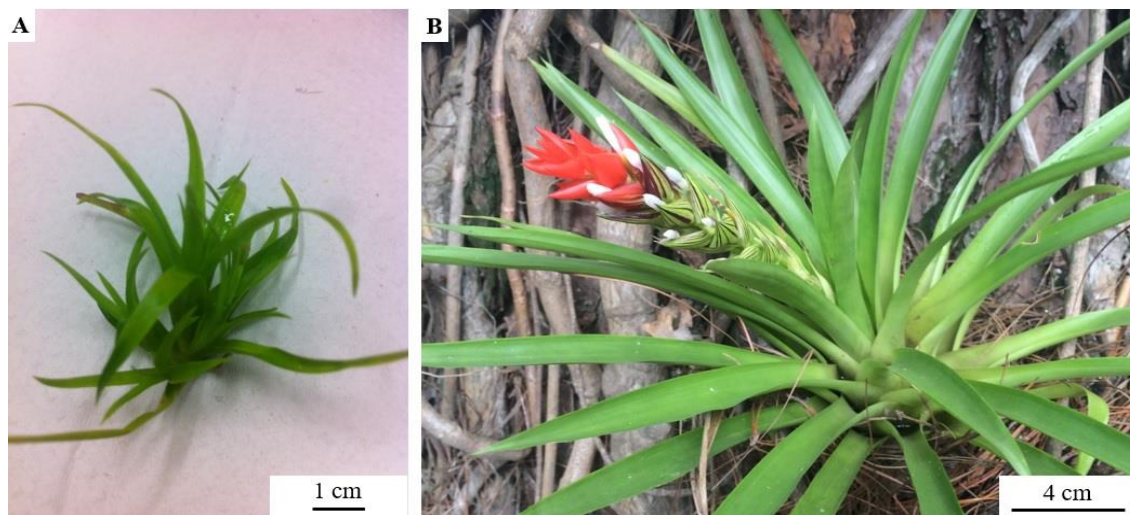


Figura 2: Características gerais da espécie *Guzmania monostachia* (L.) Rusby ex. Mez.. **A** – Planta no estágio atmosférico após nove meses de cultivo in vitro. **B** – Planta adulta com tanque em floração após, aproximadamente, três anos de cultivo em casa de vegetação.

Assim como outras bromélias do gênero, *G. monostachia* possui tanque em sua fase adulta a partir da sobreposição e expansão das bainhas foliares, acumulando água e podendo abrigar microorganismos (*Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Paenibacillus*, *Burkholderia* e outros gêneros bacterianos) que podem contribuir para a nutrição nitrogenada das plantas (KLEINGESINDS, 2016). No tanque, pode-se acumular ainda matéria orgânica e inorgânica provenientes de restos de organismos mortos e excretas de animais, constituindo-se fontes potenciais de nutrientes para as bromélias (RICHARDSON, 1999; LEROY et al., 2009). Estudos conduzidos por Takahashi e Mercier (2011) demonstraram que a bromélia epífita *Vriesea gigantea* pode assimilar ureia do tanque, sendo essa absorvida com mais rapidez em relação às fontes nitrogenadas inorgânicas (nitrato e amônio), possivelmente devido a adaptações dessa espécie de bromélia em obter nutrientes provenientes de anuros que visitam os seus tanques quando adultas (ROMERO et al., 2010; GONÇALVES et al., 2016).

Para plantas terrícolas, como a bromélia *Ananas comosus*, quando cultivadas em diferentes fontes nitrogenadas, o nitrato (NO_3^-) favoreceu maiores ganhos de massa seca, conteúdo de clorofilas e carotenoides, quando comparado ao amônio (NH_4^+), que pode ter causado algum nível de toxicidade as plantas (SIDERIS; YOUNG, 1947). Ainda, as bromélias epífitas atmosféricas *Vriesea philippocoburgii* e a *Tillandsia pohliana*, quando cultivadas in vitro com amônio, apresentaram inibição da formação radicular e menores quantidades de brotos em relação às plantas crescidas em nitrato ou

glutamina (MERCIER et al., 1997). A espécie epífita *Vriesea gigantea* e a terrícola *Ananas comosus* foram cultivadas in vitro com amônio ou ureia, resultando numa maior assimilação do nitrogênio na forma de aminoácidos livres, como a asparagina, glutamina e maior conteúdo de clorofilas na presença do amônio (ENDRES; MERCIER, 2001). Também foi observado uma maior taxa de captação de amônio marcado isotopicamente com relação a outras fontes nitrogenadas (nitrato, glicina, glutamina e ureia) para a espécie *Vriesea gigantea* (INSELBACHER et al., 2007). Em algumas regiões geográficas do mundo, no dossel das árvores que não possuem epífitas, e assim não possuem retenção de substrato nos galhos das árvores, a quantidade de amônio supera a quantidade de nitrato (GARTEN, 1991; BENZING, 2000).

Além das condições intermitentes de nutrientes no ambiente epifítico, também existe maior presença de determinados tipos de nutrientes em maior quantidade do que de outro nutriente, por exemplo, no caso da fonte nitrogenada amônio e nitrato. Como já mencionado anteriormente, as bromélias epífitas ficam expostas a intermitência de água (PADILHA, 1973; BENZING, 1987). Essa intermitência pode ser fator desencadeador de alteração do tipo de fotossíntese realizada, como, por exemplo, de C_3 para CAM (BENZING, 2000). A *Guzmania monostachia* por apresentar o metabolismo C_3 -CAM facultativo, se mantém C_3 na condição bem hidratada e, em condições de deficiência hídrica altera para um metabolismo mais intenso, conhecido como CAM *idling*, quando, então, ocorre o fechamento total dos estômatos durante o dia e também durante a noite, reciclando o dióxido de carbono já existente no interior dos tecidos (FRESCHI et al., 2010; MATIZ et al., 2013).

Estudos com folhas isoladas de *G. monostachia* adultas submetidas ao déficit hídrico na presença de diferentes fontes de nitrogênio mostraram maior atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC), enzima associada à obtenção de dióxido de carbono (CO_2), quando as plantas estavam na presença de amônio. Ao contrário, a menor atividade foi encontrada quando as folhas receberam ureia e a segunda menor atividade quando receberam nitrato (RODRIGUES et al., 2014). A PEPC absorve o CO_2 , e após a descarboxilação concentra-o no sítio ativo da enzima ribulose bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), otimizando assim a função carboxilase da Rubisco (KELEY; RUNDEL, 2003). O processo ocorre da seguinte maneira, as moléculas de CO_2 da atmosfera ou advindos da respiração são fixados em moléculas de bicarbonato (HCO_3^-) através da atividade da enzima anidrase carbônica. O bicarbonato, então, é

fixado em oxaloacetato (OAA) e fosfoenolpiruvato (PEP) através da enzima PEPC. Em seguida, a enzima malato desidrogenase converte o OAA em ácido málico o qual é armazenado no vacúolo das células. O malato, ao ser descaboxilado no citosol, fornece o CO₂ para a enzima Rubisco em maiores concentrações, o que otimiza a função carboxilase desta enzima (OSMOND, 1978). Atividade conjunta dessas duas enzimas na obtenção e fixação de CO₂, assim como a abertura estomática no período noturno e o acúmulo de ácidos orgânicos no vacúolo, são características do metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) (WINTER; SMITH, 1996; LÜTTGE, 2004).

As deficiências hídrica e nutricional podem também gerar estresse oxidativo por meio da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (GILL; TUTEJA, 2010). O peróxido de hidrogênio (H₂O₂), por exemplo, é uma espécie reativa de oxigênio mais estável quando comparada ao óxido nítrico (NO) ou superóxido (O₂^{•-}), devido a sua característica de não ser um radical livre. Sugere-se que o H₂O₂ está presente na transição do metabolismo fotossintético C₃ para o metabolismo CAM em *Mesembryanthemum crystallinum* (Aizoaceae), já que ocorre um aumento da concentração de H₂O₂ em massas celulares indiferenciadas com capacidade autotrófica sob condição luminosa, e aumento também em condição salina (SLESÁK; MISZALSKI, 2003; SLESÁK et al., 2007). Uma hipótese levantada com relação ao aumento na quantidade de H₂O₂ em determinadas plantas sob determinadas condições ambientais, é que essa ROS sirva como doadora precoce de elétrons para o funcionamento do fotossistema II (PS II) em plantas superiores (OLSON; BLANKENSHIP, 2004). Entretanto são necessários mais estudos relacionando os teores de H₂O₂ na condição do CAM (SLESÁK et al., 2007).

Na espécie suculenta *Rosularia elymaitica* (Crassulaceae), outra espécie C₃-CAM facultativa, observou-se um aumento na atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e ascorbato peroxidase (APX) quando submetidas ao déficit hídrico (HABIBI; HAJIBOLAND, 2011). Alguns estudos sugerem que as espécies reativas de oxigênio podem participar da sinalização durante a transição do metabolismo C₃ para o CAM. Presume-se que o CAM produziria o malato, o qual ao ser descarboxilado propiciaria um aumento de CO₂ que poderiam funcionar como moléculas receptoras de elétrons, reduzindo assim os níveis de ROS e as atividades das enzimas antioxidantes.

De acordo com Hessini et al. (2013), a planta halófila *Spartina alterniflora* (Poaceae) cresceu melhor na presença de amônio quando submetidas ao estresse salino e apresentaram maior atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT) e menores teores de peróxido de hidrogênio e um metabólito resultante da peroxidação de membranas lipídicas, o malondialdeído (MDA). A redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio, por meio do aumento das atividades enzimáticas antioxidantes, possibilita a planta lidar melhor com a condição adversa e investir em crescimento. Entretanto, ainda são necessários estudos que correlacionem o déficit hídrico e a exposição das plantas a distintas fontes nutricionais na indução de um maior ou menor grau de CAM, assim como o envolvimento das ROS e das enzimas antioxidantes na sinalização (BORLAND; MAXWELL; GRIFFITHS, 2006).

Nesta dissertação apresenta-se os efeitos de distintas fontes de nitrogênio inorgânicas (nitrato e amônio) e orgânicas (glutamina e ureia) sobre a anatomia, o crescimento e desenvolvimento de bromélias atmosféricas de *G. monostachia* cultivadas in vitro em condição hídrica favorável, além da temperatura, intensidade luminosa e fotoperíodo adequados. Também analisou-se o efeito do cultivo prévio das plantas atmosféricas em distintas fontes nitrogenadas, e com posterior imposição da deficiência hídrica, sobre a intensidade do CAM, produção de ROS (H₂O₂) e metabolismo enzimático antioxidante.

Hipóteses e objetivos dos capítulos

Capítulo 01: Sabe-se que as bromélias podem apresentar diferentes respostas fisiológicas nas diferentes condições nitrogenadas. Sabendo disso, o objetivo deste capítulo foi analisar o efeito das fontes inorgânicas (nitrato e amônio) e orgânicas (glutamina e ureia) sobre a anatomia, o crescimento e sobre o desenvolvimento das plantas atmosféricas de *G. monostachia* cultivadas in vitro. Presume-se que o nitrato e a glutamina sejam as fontes que mais contribuem para o crescimento dessa bromélia na fase atmosférica, já que essas fontes são menos tóxicas quando comparadas com o amônio, por exemplo. Entretanto, o nitrato e o amônio provavelmente são as fontes de nitrogênio mais disponíveis para essas plantas em ambientes naturais, visto que essas plantas em estágios iniciais de desenvolvimento não apresentam tanque e, portanto, pouco interagem com outros organismos e pouco acessam o nitrogênio orgânico. Ainda,

a glutamina pode ser prontamente utilizada, visto que não é necessário passar por vias iniciais de transformação para ser assimilada.

Capítulo 02: Quando folhas adultas isoladas e plantas inteiras na fase atmosférica de *G. monostachia* são submetidas a sete dias de déficit hídrico, o metabolismo dos tecidos passam da fotossíntese C₃ para a expressão do metabolismo ácido das crassuláceas (CAM). Sabe-se ainda que plantas previamente fertilizadas quando passam por uma situação de falta de água apresentam um menor CAM comparado aquelas que não foram previamente fertilizadas. Plantas nutridas com ureia apresentam uma menor expressão do CAM, enquanto que aquelas que são nutridas com amônio e nitrato. Com o objetivo de compreender a ligação entre a nutrição e o metabolismo CAM avaliamos se houve produção ou redução de espécies reativas de oxigênio (ROS) em condição de déficit hídrico quando *G. monostachia* atmosféricas receberam previamente fontes nitrogenadas (nitrato, amônio, glutamina ou ureia). Pressupõe-se com base na literatura para folhas destacadas de plantas adultas dessa espécie (*G. monostachia*), que em uma situação de déficit hídrico as plantas atmosféricas também expressem maior intensidade do CAM na fonte de nitrato e menor nos tratamentos de amônio e ureia. Uma vez que o amônio e a ureia aparentemente contribuem para a manifestação do CAM, esperamos encontrar uma maior produção de ROS em plantas que receberam estes compostos nitrogenadas quando comparado com nitrato e glutamina.

Referências bibliográficas

ADAMS III, W. W.; MARTIN, C. E. Physiological consequences of changes in life form of the Mexican epiphyte *Tillandsia deppeana* (Bromeliaceae). **Oecologia**, v. 70, n. 2, p. 298-304, 1986.

BENZING, D. H. Basic structure, function, ecology and evolution. In: BENZING, D. H. (Org.) **Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation**. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.

BENZING, D. H. Vascular epiphytism: taxonomy participation and adaptive diversity. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 74, n. 2, p. 183-204, 1987.

BENZING, D. H.; SEEMANN, J.; RENFROW, A. The foliar epidermis in Tillandsioideae (Bromeliaceae) and its role in habitat selection. **American Journal of Botany**, v. 65, n. 3, p. 359-365, 1978.

BENZING D. H.; BURT K. M. Foliar permeability among twenty species of the Bromeliaceae. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 97, n. 5, p. 269-279, 1970.

BFG. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015.

BORLAND, A. M.; MAXWELL, K.; GRIFFITHS, H. Ecophysiology of plants with crassulacean acid metabolism. In: LEEGOOD, R. C.; SHARKEY, T. D.; VON CAEMMERER, S. (Eds.). **Photosynthesis: physiology and metabolism**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2006.

CRAYN, D. M.; WINTER, K.; SMITH, J. A. C. Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the Neotropical family Bromeliaceae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 10, p. 3703-3708, 2004.

ENDRES, L.; MERCIER, H. Ammonium and urea as nitrogen sources for bromeliads. **Journal Plant Physiology**, v. 158, n. 2, p. 205-212, 2001.

FRESCHI, L. et al. Specific leaf areas of the tank bromeliad *Guzmania monostachia* perform distinct functions in response to water shortage. **Journal Plant Physiology**, v. 167, n. 7, p. 526-533, 2010.

GARTEN, C.T. JR. Nitrogen isotope composition of ammonium and nitrate and bulk precipitation and forest throughfall. **International Journal Environmental Analytical Chemistry**, v. 87, n. 1, p. 33-45, 1991.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

GIVINISH, T. J. et al. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 5, p. 01-24, 2011.

GONÇALVES, A. Z. et al. Trade-off between soluble protein production and nutritional storage in Bromeliaceae. **Annals of Botany**, v. 118, n. 6, p.1199-1208, 2016.

GOVAERTS, R.; LUTHER, H. E.; GRANT, J. World checklist of Bromeliaceae. Facilitated by the Royal Botanic Gardens. <http://apps.kew.org/wcsp/>, 2016.

HABIBI, G.; HAJIBOLAND, R. Comparison of water stress and UV radiation effects on induction of CAM and antioxidative defense in the succulent *Rosularia elymaitica* (Crassulaceae). **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, v. 53, n. 2, p. 15-24, 2011.

HESSINI, K. et al. Ammonium nutrition in the halophyte *Spartina alterniflora* under salt stress: evidence for a priming effect of ammonium?. **Plant and soil**, v. 370, n. 1-2, p. 163-173, 2013.

INSELSBACHER, E. et al. Microbial activities and foliar uptake of nitrogen in epiphytic tank bromeliad *Vriesea gigantea*. **New Phytologist**, v. 175, n. 2, p. 311-320, 2007.

JACQUES-FÉLIX, H. The discovery of a bromeliad in Africa: *Pitcairnia feliciana*. **Selbyana**, v. 21, n. 1-2, p. 118-124, 2000.

KELEY, J. E.; RUNDEL, F. W. Evolution of CAM and C4 carbon concentrating mechanisms. **International Journal of Plant Science**, v. 164, n. 3, 55-77, 2003.

KLEINGESINDS, C. K. **Bactérias diazotróficas em *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae): identificação, sinalização e colonização dos tecidos foliares**. 2016. 93 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

LEROY, C. et al. Potential sources of nitrogen in an ant-garden tank-bromeliad. **Plant Signaling & Behavior**, v. 4, n. 9, p. 868-870, 2009.

- LUTHER, H. E. **An alphabetical list of bromeliad binomials**. 12 ed. Sarasota: Sarasota Bromeliad Society and Marie Salby Botanical Gardens, 2010.
- LÜTTGE, U. Vascular epiphytes: setting the scene. In: LÜTTGE, U. (ed.). **Vascular Plants as Epiphytes**. Ecological Studies (Analysis and Synthesis), v. 76. Heidelberg: Springer, 1989.
- LÜTTGE, U. Ecophysiology of crassulacean acid metabolism (CAM). **Annals of botany**, v. 93, n. 6, p. 629-652, 2004.
- MARTINELLI, G. et al. Bromeliaceae da Mata Atlântica Brasileira Lista de Espécies, Distribuição e Conservação. **Rodriguesia**, v. 59, n. 1, p. 209-258, 2008.
- MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. **Bromeliaceae**. Livro vermelho da flora do Brasil. Rio de Janeiro: Centro nacional de conservação da flora, 2013.
- MATIZ, A. et al. CAM photosynthesis in bromeliads and agaves: what can we learn from these plants?. In: DUBINSKY, Z. (Ed.). **Photosynthesis**. In:Tech. 2013. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/photosynthesis/cam-photosynthesis-in-bromeliads-and-agaves-what-can-we-learn-from-these-plants->> Acesso em: 12 de agosto de 2017.
- MERCIER, H. et al. Growth and GDH and AAT isoenzyme patterns in terrestrial and epiphytic bromeliads as influenced by nitrogen source. **Selbyana**, v. 18, n. 1, p. 89-94, 1997.
- NADKARNI, N. M.; MERWIN, M. C.; NIEDER, J. Forest Canopies: Plant diversity. In: LEVIN, S. (Ed.). **Encyclopedia of biodiversity**. San Diego: Academic Press, p. 27-40, 2001.
- NIEVOLA, C. C.; MERCIER, H. A importância dos sistemas foliar e radicular na assimilação do nitrato em *Vriesea fosteriana*. **Revista Bromélia**, v. 3, n. 3, p. 14-18, 1996.
- OLSON, J. M.; BLANKENSHIP, R. E. Thinking about the evolution of photosynthesis. **Photosynth Res.**, v. 80, p. 373-396, 2004.
- OSMOND, C. B. Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 29, p. 379-414, 1978.
- PADILHA, V. **Bromeliads**. New York: Crow Publishers Inc., 1973.
- PITTENDRIGH, C. S. The Bromeliad-Anopheles-Complex in Trinidad, the Bromeliad Flora. **Society for the Study of Evolution**, v. 2, n. 1, p. 58-89, 1948.

RODRIGUES, M. A. et al. Interactions between nutrients and crassulacean acid metabolism. In: LÜTTGE, U; BEYSCHLAG, W.; CUSHMAN, J. (Eds.). **Progress in Botany (Genetics – Physiology – Systematics – Ecology)**, v. 75. Heidelberg: Springer, 2014.

RICHARDSON, B. A. The bromeliad microcosm and the assessment of faunal diversity in a neotropical forest. **Biotropica**, v. 31, n. 2, p. 321-336, 1999.

ROMERO, G. Q. et al. Nitrogen fluxes from treefrogs to tank epiphytic bromeliads: an isotopic and physiological approach. **Oecologia**, v. 162, n. 4, p. 941-949, 2010.

SAKAI, W. S.; SANFORD, W. G. Ultrastructure of the water-absorbing trichomes of pineapple (*Ananas comosus*, Bromeliaceae). **Annals of Botany**, v. 46, n. 1, p. 7-11, 1980.

SIDERIS, C. P.; YOUNG, H. Y. Effects of nitrogen on chlorophyll, acidity, ascorbic acid, and carbohydrate fractions of *Ananas comosus* (L.) Merr. **Plant Physiology**, v. 22, n. 2, p. 97-116, 1947.

SLESIAK, I.; MISZALSKI, Z. Superoxide dismutase-like protein from roots of the intermediate C 3-CAM plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. in in vitro culture. **Plant Science**, v. 164, n. 4, p. 497-505, 2003.

SLESIAK, I. et al. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. **Acta Biochemistry Polonica**, v. 54, n. 1, p. 39-50, 2007.

TAKAHASHI, C. A.; MERCIER, H. Nitrogen metabolism in leaves of a tank epiphytic bromeliad: Characterization of a spatial and functional division. **Journal Plant Physiology**, v. 168, n. 11, p. 1208-1216, 2011.

VANHOUTTE, B. et al. Water and nutrient uptake in *Vriesea* cultivars: Trichomes vs. Roots. **Environmental and Experimental Botany**, v. 136, p. 21-30, 2017.

WINTER, K.; SMITH, J. A. C. An introduction to crassulacean acid metabolism. Biochemical principles and ecological diversity. In: WINTER K.; SMITH, J. A. C. (Eds.). **Crassulacean acid metabolism**. Ecological Studies (Analysis and Synthesis), Berlin: Springer-Verlag, v. 114, p. 1-13, 1996.

ZOTZ, G.; WILHELM, K.; BECKER, A. Heteroblasty - a review. **The Botanical Review**, v. 77, n. 2, p. 109-151, 2011.

ZOTZ, G.; HIETZ, P. The physiological ecology of vascular epiphytes: current knowledge, open questions. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 364, p. 2067-2078, 2001.

Capítulo 01 – Efeito de fontes de nitrogênio inorgânicas e orgânicas sobre a anatomia, o crescimento e desenvolvimento de plantas atmosféricas de *G. monostachia* cultivadas in vitro.

Resumo

As bromélias são plantas que podem utilizar o nitrogênio em suas formas inorgânica e orgânica. Algumas delas apresentam comportamento heteroblástico, isto é, na fase adulta apresentam a sobreposição das folhas que forma um reservatório (tanque) de captação de água e nutrientes, destacando-se o nitrogênio orgânico. Já na fase juvenil, não há formação desse tanque e essas bromélias são chamadas de atmosféricas. Para a espécie heteroblástica *Guzmania monostachia*, só há uma citação na literatura que faz referência à preferência por N amoniacal e ureídica pelas plantas adultas na natureza. No entanto, para as atmosféricas não existem ainda estudos a respeito. Neste trabalho, buscou-se conhecer quais fontes nitrogenadas são mais propícias para o crescimento, o desenvolvimento e sobre a anatomia de plantas atmosféricas de *Guzmania monostachia* cultivadas in vitro na presença de fontes inorgânicas (nitrato ou amônio) ou orgânicas (glutamina ou ureia). Foram realizadas análises morfométricas e anatômicas, como: altura da planta, diâmetro da roseta, número de folhas e de raízes, área foliar, número de tricomas, espessura do mesofilo, espessura dos parênquimas aquíferos adaxial/abaxial e do parênquima clorofiliano. Além dessas, parâmetros fisiológicos foram também considerados, como: teor de clorofilas e carotenoides, conteúdo de proteínas solúveis totais e teor de aminoácidos livres. As plantas cultivadas na presença de amônio tiveram as menores alturas e áreas foliares. Já as plantas em nitrato apresentam maior espessura do mesofilo, parênquimas aquíferos adaxial/abaxial e parênquima clorofiliano. A fonte nítrica também proporcionou às plantas atmosféricas de *G. monostachia* uma maior produção de clorofilas e carotenoides. Os aminoácidos livres predominantemente encontrados foram a asparagina e a lisina. Encontrou-se um gradiente crescente de tricomas da região apical para região basal das folhas. O nitrato parece ter tido efeito positivo sobre o número de tricomas na região mediana da face adaxial. Assim, os resultados de cultivo in vitro apontam que diferentes fontes nitrogenadas modificam metabolicamente e estruturalmente a bromélia *Guzmania monostachia*, sendo a fonte nítrica a mais apropriada para uma adequada estocagem de água e produção de pigmentos, promovendo um melhor desenvolvimento das plantas no estágio atmosférico. Dessa maneira, pode-se sugerir que a bromélia em fase atmosférica apresentou semelhanças às características de comportamento fisiológico da bromélia terrícola *Ananas comosus*. Tal fato talvez seja devido à falta de um tanque e, portanto, à falta de acesso às fontes nitrogenadas orgânicas como, por exemplo, a ureia. Já a fonte amoniacal e ureídica não estimularam o crescimento e desenvolvimento das plantas nesse estágio ontogenético, ao contrário do encontrado para a fase adulta com tanque de outras bromélias epífitas. Talvez a toxicidade do NH_4^+ , quando esse íon não é assimilado rapidamente em aminoácidos, tenha prejudicado o crescimento e a formação dos tecidos de *G. monostachia*.

Palavras chave: Bromeliaceae, bromélia epífita, fontes nitrogenadas, nutrição nitrogenada, cultivo in vitro, nitrato, amônio, glutamina, ureia.

Abstract

Bromeliads are plants that can use nitrogen in their inorganic and organic forms. Some of them feature heteroblastic behavior, that is, in adulthood have the overlapping of leaves that form a reservoir (tank) of water and nutrient uptake, highlighting the organic nitrogen. Already at the juvenile stage, there is no formation of this tank and these bromeliads are called atmospheric. For the specie *Guzmania monostachia*, there is only one citation in the literature that makes reference to the preference for N ammoniacal and ureídica by adult plants, in nature. However, there are no studies on atmospheric bromeliads. This work, sought to know which nitrogenous sources are more conducive to the growth, development and about the anatomy of atmospheric plants *Guzmania monostachia* cultivated in vitro in the presence of inorganic sources (ammonium or nitrate) or organic (glutamine or urea). Morphometric and anatomical analyses were carried out and, as: plant height, rosette diameter, number of leaves and roots, leaf area, number of trichomes, thickness of the mesophyll, adaxial/abaxial parenchyma thickness aquifers and parenchyma chlorophyll. In addition, physiological parameters were also considered, such as: chlorophylls and carotenoids content, total soluble protein content and amino acids free content. The nitrate source also gave the atmospheric plants *G. monostachia* a higher production of chlorophylls and carotenoids. The predominantly found free amino acids were asparagine and lysine. A growing gradient of trichomes from the apical region to the basal region of the leaves was found. Nitrate seems to have had a positive effect on the number of trichomes on the middle of the adaxial face. Thus, the results of in vitro cultivation point that different nitrogenous sources metabolically and structurally modify the bromeliad *Guzmania monostachia*, representing the most suitable nitric source for proper storage of water and pigment production, promoting best development of plants in the atmospheric stage. That way, it can be suggested that the atmospheric phase bromeliad showed similarities to the characteristics of physiological behavior of the terrestrial bromeliad *Ananas comosus*. This might be due to the lack of a tank and, therefore, to the lack of access to nitrogenous organic sources such as urea. Already the ammoniacal and ureídica source did not stimulate the growth and development of plants in this ontogenetic stage, contrary to what was found in adulthood with tank in other epiphytic bromeliads. Maybe the toxicity of NH_4^+ , when this ion is not quickly assimilated into amino acids, has hindered the growth and the formation of *G. monostachia*.

Keywords: Bromeliaceae, epiphytic bromeliad, nitrogenous sources, nitrogen nutrition, in vitro cultivation, nitrate, ammonia, glutamine, urea.

Introdução

No ambiente epifítico, as plantas possuem disponibilidade intermitente de água e nutrientes para o seu crescimento e desenvolvimento, portanto a oligotrofia é uma característica importante desse ambiente (ZOTZ; THOMAS, 1999). Dentre os macronutrientes, um dos mais relevantes e utilizado em maior quantidade pelas plantas é o nitrogênio (BARKER; PILBEAM, 2015). Observa-se uma concentração de 71,4 mM de nitrogênio em alguns tecidos frescos vegetais, de maneira geral, enquanto todos os outros macronutrientes (fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre) juntos somam 37,2 mM nesses mesmos tecidos (BUCHANAN; GRUISSEN; JONES, 2015).

As bromélias apresentam espécies epífitas que lidam com as condições adversas desse ambiente epifítico. Essas bromélias podem apresentar a sobreposição e expansão das bases foliares formando um tanque ou cisterna que acumula água e nutrientes. Entretanto, algumas dessas bromélias epífitas em uma fase juvenil (não formam o tanque, sendo chamadas de atmosféricas, passando a apresenta-lo na fase adulta. Essas plantas que possuem durante o seu desenvolvimento essa transformação morfológica são ditas serem heteroblásticas (SCHIMIDT; ZOTZ, 2001).

Além do tanque, outra característica importante das bromélias epífitas para ocupação do ambiente epífita é a cobertura das folhas por células epidérmicas especializadas conhecidas como tricomas. Normalmente encontram-se tricomas do tipo peltados em bromélias, esses possuem uma projeção celular da epiderme formando um disco celular na região externa à folha e um pedúnculo inserido na epiderme até próximo dos vasos condutores. Geralmente os tricomas peltados têm um conjunto de 4 células centrais responsáveis por absorverem água e nutrientes, rodeado de outras células anelares, seguidas de células alongadas e abaixo dessas células alongadas passa a água absorvida que é conduzida pela células formadoras do pedúnculo até os vasos condutores (BENZING, 2000). A espécie heteroblástica *Guzmania monostachia*, quando cultivada em casa de vegetação, na fase atmosférica possui distribuição praticamente uniforme de tricomas ao longo das suas folhas. No entanto, na fase adulta existe um gradiente crescente de tricomas do ápice para a base foliar (RODRIGUES et al., 2016).

As bromélias de hábito epífita em condições naturais obtêm os seus nutrientes, como por exemplo, o nitrogênio da água que escorre do tronco do forófito, da decomposição de folhas no tanque e de macro e microrganismos (BENZING, 2000). A disponibilidade de nitrogênio e a fonte nitrogenada disponível no dossel das árvores, que servem como forófito às bromélias, são variáveis, especialmente pela quantidade de material oriundo de deposição de folhas, animais, excretas que acumulam-se nos galhos das árvores que servem como forófito para as plantas epífitas (HIETZ et al., 2002; CARDÉLUS; MACK, 2010).

No ambiente epífita, existe maior disponibilidade de amônio que nitrato, mas o amônio pode ser uma fonte nitrogenada tóxica quando em altas concentrações, enquanto o nitrato pode ser rapidamente absorvido pelas plantas (BENZING, 2000). Em bromélias adultas com tanque pode haver acúmulos de até 80 % de nitrogênio orgânico com relação a 20 % de nitrogênio inorgânico (nitrato e amônio) no tanque (RICHARDSON et al., 2000). Uma das hipóteses sobre a toxicidade do amônio para a maioria das plantas diz que há uma redução na concentração de outros cátions, como, na de potássio, cálcio e magnésio nos tecidos, comparadas a plantas cultivadas em nitrato. Por outro lado, a absorção de amônio pode provocar um aumento de ânions, como o cloreto, sulfato e fosfato. Além disso, na presença de amônio é frequente observar um aumento na acidez no meio externo à planta, sugerindo uma extrusão de prótons para compensar o desequilíbrio de cargas nas células (BRITTO; KRONZUCKER, 2002).

A espécie atmosférica *Tillandsia pohliana* cultivada in vitro durante 12 meses com somente amônio na concentração de 1,5 mM apresentou um aumento muito forte da atividade da enzima glutamato desidrogenase (GDH-NADH) (TAMAKI; MERCIER, 2001). É discutido por essas pesquisadoras que esse aumento na atividade enzimática pode ser uma forma de proteção das células vegetais contra os efeitos tóxicos de altos níveis de amônio endógeno. De acordo com Osuji, Reyes e Mangaroo (1998), a atividade da GDH-NADH é dita ser muito importante na reassimilação do amônio endógeno e pode ter a sua atividade aumentada em condições de estresse, como, por exemplo, durante o déficit hídrico, temperatura extremas, metais tóxicos, herbicidas e estado nutricional.

Em condições experimentais, a espécie heteroblástica *Vriesea gigantea* no estágio atmosférico em cultivo in vitro apresentou absorção rápida de nitrato por meio

das raízes em comparação com o amônio ou ureia (TAKAHASHI, 2014). Essa mesma espécie na fase adulta com tanque teve preferência por amônio e ureia em relação ao nitrato ou glutamina (INSELBACHER et al., 2007; TAKAHASHI; MERCIER, 2011). Os pesquisadores Endres e Mercier (2001) ao cultivarem por dois meses em condições experimentais in vitro as espécies *Ananas comosus* (terrícola) e *V. gigantea* (epífita) relatam que as duas bromélias preferiram a fonte inorgânica amônio à fonte orgânica ureia, já que produziram mais clorofilas totais, amino ácidos totais e cresceram mais vigorosamente. Porém, Mercier et al. (1998), ao cultivar três espécies (*Pitcairnia flammaea* - terrícola, *Vriesea philippocoburgii*- epífita com tanque, *Tillandsia pohliana*- epífita atmosférica) de bromélias in vitro por seis meses na presença de 8 mM de nitrogênio total, exclusivamente na forma de nitrato, amônio, glutamina e ureia, observaram melhores resultados de números de folhas e comprimento na presença de glutamina. Para a bromélia atmosférica *Tillandsia pohliana* a menor quantidade de folhas e com menor comprimento foi obtida em cultivo na presença de amônio e nessa mesma fonte não houve formação de raízes enquanto que o nitrato propiciou uma melhor formação radicular.

Sabe-se por meio da quantificação de nitrogênio isotópico (^{15}N) que plantas de *G. monostachia* adultas preferem amônio e ureia comparativamente ao nitrato ou glicina quando estão crescendo na natureza (ZOTZ, 2016). Entretanto, ainda não há conhecimento sobre os efeitos de diferentes condições nutricionais nessa espécie em sua fase atmosférica, questões como quais fontes nitrogenadas contribuiriam mais para o crescimento e desenvolvimento ainda não foram respondidas. Além disso, não há indicações claras se a heteroblastia estaria associada a mudanças fisiológicas, como, por exemplo, alterar o tipo de preferência da forma nitrogenada entre as fases juvenil e adulta com tanque. Assim, no presente estudo objetivou-se analisar o efeito de diferentes fontes de nitrogênio – nitrato, amônio, glutamina e ureia - sobre a anatomia, o crescimento e desenvolvimento de plantas atmosféricas de *G. monostachia*, cultivadas in vitro. Optou-se pelo cultivo asséptico, por assegurar que não houvesse transformação das formas nitrogenadas oferecidas às plantas por microrganismos.

Material e métodos

Obtenção do material vegetal e condições de cultivo in vitro

Sementes de *Guzmania monostachia* (L.) Rusby ex. Mez. foram germinadas in vitro em frascos de vidro, do tipo frascos de palmito, com tampas plásticas transparentes contendo uma rolha central que permite maior troca gasosa com o ambiente externo. As plantas cresceram e se desenvolveram em meios de cultura com 20g/L de sacarose, 2 g/L de phytigel, pH $5,8 \pm 1$, com macronutrientes de acordo com a formulação de Knudson (1946) modificada quanto às fontes nitrogenadas: presença exclusiva de nitrato, amônio, glutamina ou ureia (tratamentos). A concentração total de N utilizada foi de 5 mM e todos os meios foram adicionados de 1 μM de cloreto de níquel. Os micronutrientes usados foram os descritos na formulação de Murashige e Skoog (1962). As plantas foram mantidas por nove meses (sem trocas de meios) nos frascos em sala de cultivo com temperatura a $25^\circ\text{C} \pm 2$, umidade relativa do ar 50 %, fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de aproximadamente $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Medidas morfométricas

Após os nove meses de crescimento in vitro sob as condições descritas acima, mediu-se a altura, diâmetro, número de folhas e número de raízes de dez plantas cultivadas em dois frascos, contendo cinco plantas por frasco de cada um dos tratamentos. A partir do centro da roseta, onde ocorrem as folhas mais jovens, em direção às folhas mais velhas na região mais externa da roseta, foi determinada e usada a sexta folha de cada planta. Mediu-se a área total de cada uma das dez folhas do 6° nó (n=10), amostradas das diferentes plantas em cada tratamento e utilizou-se o software ImageJ para tratamento das imagens geradas.

Análises anatômicas foliares

As folhas do sexto nó foram coletadas das plantas cultivadas em cada tratamento, utilizando três folhas, as quais foram fixadas em ácido fórmico-acético-etanol 50 % (FAA) por 48 horas e, depois, mantidas em etanol 70 %. As triplicatas foliares foram seccionadas em três regiões de aproximadamente igual proporção, a mais próxima da roseta dita como basal e as demais, mediana e apical. Essas 3 porções foram submetidas à desidratação em etanol/tert-butanol (50-100 %) e incluídas em parafina

(JOHANSEN, 1940). As secções transversais de cada uma das três regiões foliares (10 µm) foram obtidas com uso de micrótomo rotativo Autocut Reichert-Jung 1050, sendo posteriormente coradas em Safranina e Azul de Astra, de acordo com o método descrito em Bukatsch (1972). As lâminas permanentes foram montadas com bálsamo do Canadá. As imagens foram obtidas em microscópio óptico Leica DMLB acoplado com câmera DFC310FX e a visualização foi feita por meio do programa LAS V4.1.

Foram amostrados dez cortes transversais de cada uma das três regiões foliares ao longo da 30^a até a 35^a lâmina permanente, a partir desses cortes foram obtidas as medidas de espessura total do mesofilo; espessura do parênquima aquífero adaxial, espessura do parênquima aquífero abaxial e espessura do parênquima clorofiliano. Todas as medidas foram realizadas considerando a média realizada de duas aferições, uma entre o feixe principal e o feixe lateral esquerdo e a outra entre o feixe lateral direito e o feixe principal. A espessura do parênquima aquífero abaxial e adaxial, assim como do parênquima clorofiliano foram obtidas apenas para as regiões apical e mediana das folhas, pois na região basal observou-se um parênquima uniforme, sem distinção entre parênquima aquífero e clorofiliano.

Para as análises em microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram utilizadas amostras das três regiões foliares já mencionadas e a partir de três folhas do sexto nó de diferentes indivíduos de cada um dos tratamentos. O material foi submetido ao método já descrito por Silveira (1989) e, posteriormente, analisado em microscópio eletrônico de varredura Zeiss DS 900.

Para se obter a densidade de tricomas por região foliar (i.e., ápice, mediana e base), as folhas foram diafanizadas e coradas com Safranina, seguindo o método descrito por (STRITTMATTER, 1973). As lâminas semipermanentes foram montadas e a densidade dos tricomas foi medida em dez campos visuais de cada uma das regiões, utilizando-se três folhas do sexto nó por tratamento, por meio do aumento de 200 vezes em microscópio óptico Leica DMLB acoplado com câmera DFC310FX e com auxílio do programa LAS V4.1.

Análises fisiológicas

Teores de clorofilas e carotenoides

As clorofilas e carotenoides foram determinadas por meio do método de Porra, Thompson e Kriedemann (1989), com modificações de acordo com Wellburn (1994) e Minocha et al. (2009). Utilizaram-se 200 mg de tecido vegetal fresco de cada tratamento (aproximadamente três plantas por tratamento). Esse material foi pesado e triturado em nitrogênio líquido, dos quais 10 mg foram separados em microtubos, recebendo 1 mL de N, N Dimetilformamida (DMF). Os microtubos permaneceram no escuro a 4 °C por 24 horas, sendo, posteriormente, centrifugados por 10 minutos a 13000 rpm. As leituras de absorvância foram feitas em 664, 647 e 480 nm em espectrofotômetro. Os teores de clorofilas *a*, *b*, total e carotenoides foram calculados de acordo com as seguintes fórmulas:

Clorofila *a*

$$Ca = [(12 \times A_{664}) - (3,11 \times A_{647})]$$

Clorofila *b*

$$Cb = [(20,78 \times A_{647}) - (4,88 \times A_{664})]$$

Clorofila total

$$C_{total} = Ca + Cb$$

Carotenoides

$$Cc = \frac{1000A_{480} - 1,12 \times Ca - 34,07 \times Cb}{245}$$

245

Conteúdo de proteínas solúveis totais

As proteínas solúveis totais foram determinadas de acordo com Bradford (1976), com modificações propostas por Dissanayake et al. (2013). Utilizaram-se 500 mg de tecido vegetal fresco de cada tratamento (aproximadamente sete plantas por tratamento).

Esse material foi triturado em nitrogênio líquido, dos quais 25 mg foram separados em microtubos. As amostras dos microtubos receberam 0,5 mL de água, sendo agitadas durante cinco minutos. Em seguida, o material foi centrifugado por dez minutos a 4°C e 13000 rpm. Uma alíquota de 50 µL do sobrenadante foi coletada e adicionada a 250 µL de reagente de Bradford em placas ELISA®, as quais permaneceram em mesa agitadora a 3.000 rpm por cinco minutos. Ao fim da agitação, fez-se a leitura a 595 nm em espectrofotômetro. A concentração de proteínas totais de cada amostra foi calculada a partir de valores de absorvância obtidos com o auxílio de uma curva padrão, preparada com concentrações de 0 a 100 µg.mL⁻¹ de soro de albumina bovina (BSA) e expressa em µg de proteínas totais por mg de massa fresca.

Quantificação dos teores de aminoácidos-livres

A quantificação dos aminoácidos-livres foi realizada a partir de três réplicas, sendo cada dessas réplicas com 0,1 g de material fresco triturado em nitrogênio líquido, proveniente de aproximadamente duas plantas por tratamento. A extração inicial foi realizada com 1 mL de metanol/clorofórmio/água (MCW, 12/5/3, v/v/v) (BIELESKI; TURNER, 1966). Em seguida, o material permaneceu por três horas em agitação, sendo posteriormente centrifugado por 15 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi coletado e adicionou-se 0,1 mL de clorofórmio, posteriormente 0,15 mL de água destilada a cada 0,4 mL de sobrenadante. A solução foi centrifugada novamente a 10.000 rpm por 15 minutos, sendo a fase aquosa superior coletada e concentrada por meio de jatos de nitrogênio gasoso, a aproximadamente metade do volume. A separação e análise dos aminoácidos-livres foi determinada com base no sistema o-ftaldialdeído (OPA) (BENSON; HARE, 1975; JARRETT et al., 1986) e modificado (MARUR; SODEK; MAGALHÃES, 1994). Os aminoácidos individuais foram separados e quantificados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizou-se de 10 µl de extrato com 30 µl do padrão Sigma® AAS-18, com os aminoácidos: aspartato (asp), glutamato (glu), serina (ser), histidina (his), glicina (gly), treonina (thr), arginina (arg), alanina (ala), tirosina (tyr), metionina (met), valina (val), fenilalanina (phe), isoleucina (ile), leucina (leu) e lisina (lys) e ainda adicionou-se a parte a asparagina (asn), glutamina (gln) e o ácido gama-aminobutírico (gaba), todos na concentração de 50 nmol.mL⁻¹(PUIATTI; SODEK, 1999).

Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada por meio do teste one-way ANOVA. A comparação dos efeitos globais dos tratamentos foi realizada por análise multivariada de permutação (PERMANOVA), com o uso do pacote funcional do programa R Estatística (Oksanen et al. 2013). Empregou-se ainda outros pacotes da plataforma R (R Core Team 2014).

Resultados

As plantas atmosféricas de *Guzmania monostachia* mostraram maior crescimento em altura quando foram cultivadas com glutamina, entretanto não houve diferença estatística em relação ao nitrato ou ureia. Ao contrário, o amônio parece ter inibido mais fortemente o crescimento em altura, apesar de não haver diferença estatística entre os tratamentos com nitrato ou ureia (Fig. 1A). Quanto aos demais parâmetros de crescimento, como: o diâmetro das plantas, número de folhas e número de raízes, não houve diferenças entre os tratamentos nitrogenados a que as plantas foram submetidas (Fig. 1B, 1C, 1D).

A área da sexta folha das bromélias analisadas foi cerca de 37 % menor em amônio em relação aos tratamentos de nitrato ou glutamina e 34 % menor com relação ao tratamento com ureia. Porém, não houve variação significativa para esse parâmetro entre os tratamentos com nitrato, glutamina ou ureia (Fig. 2).

A densidade de tricomas foi maior na base das folhas em relação ao ápice e à mediana, indicando um gradiente crescente do número de tricomas da região apical para a basal (Figs. 3A, 3B, 3C). Dentre os tratamentos empregados, as plantas cultivadas em nitrato mostraram maior densidade de tricomas na porção mediana adaxial quando comparado às plantas que cresceram nos tratamentos com amônio, glutamina ou ureia (Fig. 3B). O número médio de tricomas foi semelhante entre os tratamentos em que as plantas cresceram em nitrato, amônio ou glutamina na região apical adaxial e basal abaxial, sendo diferentes do tratamento com ureia. Ainda na face adaxial apical e abaxial basal em média a quantidade de tricomas foi 35 % menor quando *G. monostachia* foi cultivada em ureia em comparação às plantas cultivadas em nitrato. (Fig. 3A, 3C). Na face abaxial apical o tratamento com glutamina mostrou maior quantidade de tricomas que o tratamento de amônio ou ureia, porém foi semelhante ao tratamento com nitrato, sendo que esse último tratamento não demonstrou diferença ao

ser comparado com amônio e ureia (Fig. 3A). Para a região mediana na face abaxial, houve maiores médias de número de tricomas nos tratamentos com nitrato ou glutamina, sendo esses semelhantes às plantas crescidas em amônio e esse último foi semelhante àquelas plantas que permaneceram em ureia (Fig. 3B). O número de tricomas na base das folhas e na face adaxial de plantas em nitrato, amônio ou glutamina foi semelhante, entretanto aquelas plantas em glutamina foram similares à ureia em questão de números de tricomas (Fig. 3C). Também foram observadas diferenças no número de tricomas na região adaxial versus a região abaxial para os tratamentos de glutamina ou ureia (Figs. 3A, 3B, 3C). Já nos tratamentos de nitrato adaxial versus abaxial (Tukey post-hoc test, $p = 0,861$) ou amônio adaxial versus abaxial (Tukey post-hoc test, $p = 0,492$) não houve diferenças entre as faces.

De modo interessante, observou-se maior espaçamento entre os tricomas dos ápices foliares de plantas que receberam amônio ou ureia, enquanto os tricomas das plantas que receberam nitrato ou glutamina, aparentemente, estão mais próximos um dos outros. Os tricomas em média no amônio ou ureia parecem ser menores em área do disco que os tricomas desenvolvidos na presença de nitrato ou glutamina (Figs. 4A, 4B, 4C, 4D, 5A, 5B, 5C, 5D). Um padrão semelhante ao descrito anteriormente para os ápices foliares, em que possivelmente existe maior espaçamento entre os tricomas de plantas cultivadas em amônio ou ureia e menor para plantas cultivadas em nitrato ou glutamina, se repetiu na região da mediana (Figs. 4E, 4F, 4G, 4H, 5E, 5F, 5G, 5H). Já nas bases foliares, essas distâncias foram menos evidentes na face abaxial (Figs. 4I, 4J, 4K, 4L, 5I, 5J, 5K, 5L).

As bromélias submetidas ao tratamento com nitrato apresentaram maiores espessamentos do mesofilo na região apical, seguido pelos tratamentos com glutamina e pelos tratamentos com amônio ou ureia, os quais foram semelhantes entre si (Fig. 6A). Na região mediana das folhas, o espessamento do mesofilo foi maior e semelhante entre si nos tratamentos com nitrato ou glutamina e menores e semelhantes nos tratamentos de amônio ou ureia (Fig. 6B). O espessamento do mesofilo nas bases foliares de bromélias cultivadas na presença de glutamina foi maior que nos demais tratamentos. A outra fonte que mais estimulou o surgimento de tecidos mais espessos foi o nitrato, o qual diferiu estatisticamente em relação às plantas que estavam em amônio ou ureia e esses dois últimos foram iguais entre si (Fig. 6C).

O tratamento com nitrato proporcionou maiores espessamentos dos parênquimas aquíferos (face adaxial e abaxial) e do clorofiliano em comparação com as outras fontes nitrogenadas (Figs. 7A, 7B, 7C). Ao se observar os parênquimas aquífero adaxial e abaxial, nota-se que, após a maior média obtida em nitrato, estão as médias das plantas cultivadas em amônio ou glutamina e ainda que a menor média desses parênquimas aquíferos foi vista no tratamento com ureia (Figs. 7A, 7C). Para o espessamento do parênquima clorofiliano na região apical, o valor obtido em nitrato foi quase o dobro daqueles vistos nas fontes amoniacal, com glutamina ou ureia e essas três últimas fontes mostraram valores estatisticamente iguais entre si (Fig. 7B). Assim como na região do ápice foliar, na mediana o maior espessamento do parênquima aquífero adaxial foi observado no tratamento com nitrato, que foi diferente dos outros tratamentos. A glutamina foi uma segunda fonte estimuladora. Já amônio e ureia apresentaram as menores médias e similares entre si (Fig. 7D). Quanto ao parênquima aquífero abaxial, a maior média pôde ser encontrada na fonte de glutamina comparada às demais (Fig. 7F). Observou-se que os maiores espessamentos do parênquima clorofiliano na região mediana das folhas foram encontrados nas fontes de glutamina, nitrato ou em amônio, porém os resultados obtidos para nitrato ou amônio não diferiram dos de ureia (Fig. 7E). Ressalta-se ainda que na base onde o tecido foliar é homogêneo, não observou-se distinção entre os parênquimas aquífero adaxial, clorofiliano e o aquífero abaxial. Nessa região basal, a glutamina proporcionou maior espessamento desse tecido homogêneo, seguido do nitrato, posteriormente amônio e ureia, os quais foram similares entre si (Fig. 6C).

As células nos tecidos das plantas cultivadas em nitrato, aparentemente, estão com maior turgor, que aquelas cultivadas nas outras fontes nitrogenadas e, possivelmente, possuem maiores vacúolos (Figs. 8A, 8E, 8I). Resultados semelhantes aos encontrados visualmente em nitrato, puderam ser vistos em glutamina se comparados às regiões do ápice, mediana e base com os resultados obtidos em amônio ou ureia (Figs. 8C, 8G, 8K). Nas fontes, amoniacal e ureídica pareceram possuir células com menor turgidez que aquelas dos tecidos das plantas cultivadas em nitrato ou glutamina (Figs. 8B, 8F, 8J, 8D, 8H, 8L).

As bromélias que cresceram na presença de nitrato apresentaram as maiores concentrações de clorofilas e carotenoides, seguido pelas plantas crescidas em amônio. Já os menores teores foram observados nas bromélias que receberam glutamina ou em

ureia. A concentração de clorofilas em plantas no tratamento de nitrato foi em média o dobro das concentrações nas plantas nos tratamentos de glutamina ou ureia. O teor de carotenoides no tratamento com nitrato foi quase o dobro comparado aos tratamentos de glutamina ou ureia (Fig. 9).

Quanto à concentração de proteínas solúveis, houve uma tendência favorável em ureia, mas não apresentou diferença estatística entre os tratamentos (Fig. 10).

A quantificação de aminoácidos- livres mostrou que os principais aminoácidos presentes nas plantas atmosféricas de *G. monostachia* foram a asparagina (asn), a lisina (lys) e a glutamina (gln). O amônio e a ureia foram as fontes que tiveram efeitos favoráveis ao surgimento de asn, em contrapartida, as fontes de nitrato ou glutamina propiciaram teores menores e similares entre si. A formação de lys foi favorecida na presença de amônio, glutamina ou ureia, mas os tratamentos de glutamina e ureia foram similares ao menor teor visto no tratamento de nitrato (Fig. 11).

Discussão

Os resultados obtidos nesta pesquisa acerca dos parâmetros altura média das plantas e área da sexta folha não mostraram diferenças significativas, no entanto, observou-se uma tendência de redução de crescimento na presença de amônio e um leve incremento da altura quando a glutamina foi acrescida ao meio de cultura. No ambiente natural, a lixiviação da água da chuva que desce da copa das árvores carrega nutrientes, incluindo aminoácidos, para o tanque das bromélias ou ainda disponibiliza para as raízes ou tricomas das plantas epífitas atmosféricas (BENZING, 1973). A glutamina utilizada como fonte única nitrogenada em condição laboratorial in vitro promoveu o crescimento das espécies epífitas *Vriesea philippocoburgii* e *Tillandsia pohliana* em termos de massa seca, altura das plantas e número médio das folhas (MERCIER; KERBAUY, 1998). Plantas de *Ananas comosus*, quando cultivadas com 8 mM de glutamina in vitro, apresentaram altas taxas de crescimento de brotos a partir de gemas caulinares laterais e também se observou um aumento nos teores da auxina ácido indolilacético (AIA) e da citocinina isopenteniladenina (iP), indicando uma possível sinalização positiva para a divisão celular (HAMASAKI; PURGATTO; MERCIER, 2005).

O menor crescimento observado na presença de amônio para a bromélia epífita *Guzmania monostachia* no estágio atmosférico talvez seja efeito da toxicidade que essa fonte nitrogenada pode causar. Johansen (2001) consideraram que as razões do amônio causarem toxicidade em algumas espécies ainda são pouco entendidas, no entanto acreditam que haver um alto custo energético para ocorrer a sua assimilação. Especula-se ainda que a captação de amônio possa estar associada à extrusão de prótons para fora das células, causando forte redução do pH do meio de cultura, influenciando negativamente a absorção de outros cátions (MERCIER et al., 1997a). Efeitos semelhantes quanto a essa possibilidade de toxicidade foram encontrados no cultivo in vitro da orquídea *Dactylorhiza incarnata* a partir da concentração de 4 mM de amônio (DIJK; ECK, 1995). Tendo em vista que a concentração que se utilizou nesta pesquisa foi de 5 mM de nitrogênio total para as diferentes fontes nitrogenadas, inclusive para o amônio, sugere-se que, possivelmente, houve algum nível de toxicidade às plantas atmosféricas.

Poucos são os trabalhos que demonstram a influência de fatores ambientais na alteração anatômica interna ou externamente nas folhas de bromélias independente do hábito dessas plantas. Uma das alterações anatômicas encontradas, em resposta ao crescimento em diferentes fontes nitrogenadas, foi a presença de maior número de tricomas nas três regiões foliares da face adaxial em plantas cultivadas em nitrato com relação àquelas cultivadas em ureia. Outro resultado interessante é o gradiente crescente de tricomas da região apical para região basal das folhas. Resultados, encontrados por Rodrigues et al. (2016), indicam haver um gradiente crescente de tricomas do ápice para a base foliar de plantas adultas de *G. monostachia*, porém relatam para essa mesma espécie na fase atmosférica, cultivada em casa de vegetação, ocorrer uma distribuição homogênea do número de tricomas ao longo de toda a superfície foliar.

De acordo com Takahashi, Ceccantini e Mercier (2007), ao cultivar a espécie *Vriesea gigantea* no estágio atmosférico in vitro, observaram 30 % menor quantidade de tricomas na região apical das folhas que na região basal e o dobro de estômatos na região apical comparativamente à basal. Os autores ainda sugerem que a maior densidade de tricomas na base das folhas estaria envolvida com a absorção nitrogenada, enquanto a maior quantidade de estômatos na região apical com a assimilação do N. De acordo com Scatena e Segecin (2005), ao estudar 12 espécies de *Tillandsias*, a maioria delas apresentou escamas epidérmicas com escudos assimétricos, que possivelmente

umentam a área de contato escudo/fluido, e quanto maior o número de escamas, provavelmente, maior será a capacidade de absorção de água e nutrientes, assim possibilitando recursos para estas espécies sobreviverem em ambientes sujeitos a dessecação por ventos constantes e exposição solar.

Os resultados aqui apresentados para as plantas atmosféricas de *G. monostachia* indicaram que as plantas com escudos ou discos mais numerosos em nitrato ou ainda mais próximos uns dos outros poderiam ter influenciado positivamente a obtenção das maiores espessuras dos parênquimas aquífero adaxial e abaxial. Possivelmente, a fonte nítrica que apresenta maiores números de tricomas quando compara-se com a fonte ureídica, pode conferir maior possibilidade de sobrevivência em um ambiente natural com escassez hídrica e exposição a luz solar.

Os nossos resultados indicam pela primeira vez que uma fonte nitrogenada pode ser responsável por modificações morfológicas/anatômicas em bromélias. As folhas da bromélia *Guzmania monostachia* seguem uma organização tecidual semelhante àquela encontrada na folha da espécie terrícola *Cryptanthus beuckeri* E. Morren (RIBEIRO; AOYAMA, 2015). Esses autores demonstraram que existe um parênquima aquífero adaxial, seguido de um parênquima clorofiliano e um parênquima aquífero abaxial. Essa mesma organização tecidual foi observada na espécie de bromélia epífita *Tillandsia adpressiflora* Mez. (BRAGA, 1977) e em outras espécies de *Tillandsias* (SCATENA; SEGECIN, 2005).

Para as plantas atmosféricas de *Guzmania monostachia*, observou-se que o NO_3^- como única fonte de N propiciou a maior espessura do mesofilo e também dos parênquimas aquífero adaxial e abaxial e do parênquima clorofiliano. Com relação à influência de diferentes fontes nitrogenadas sobre o crescimento em epífitas, apenas uma pesquisa com a orquídea *Laelia purpurata* relatou que quando cultivada in vitro na concentração 15 mM de ureia juntamente com 1,80 mM de nitrato de amônio ocorreu um aumento na espessura do mesofilo e reduções expressivas no número de células radiculares, como as do velame e exoderme, além das células do cilindro vascular e redução de 69 % das células da medula (SILVA JÚNIOR et al., 2013).

Uma possível explicação para esse fato do espessamento maior ou menor dos tecidos foliares nos tratamentos pode ser devido à indução de diferentes teores

hormonais nos tecidos e/ou, conseqüentemente, um aumento na divisão celular ou expansão celular. Mercier et al. (1997b) encontrou na bromélia *Vriesea philippocoburgii* e *Tillandsia pohliana* cultivadas in vitro durante seis meses em nitrato, maiores concentrações dos fitormônios auxinas e citocininas, os quais são estão envolvidos com a divisão e expansão celular. Teores maiores de citocininas foram encontrados em plantas cultivadas na presença de ureia ou amônio quando comparado com plantas cultivadas em nitrato. Especificamente para plantas cultivadas em ureia, houve maiores teores de auxinas para as duas espécies citadas acima.

A ureia é uma fonte nitrogenada que pode ser absorvida em plantas superiores, como *Arabidopsis thaliana*, através de transportadores de alta afinidade como o DUR3 (LIU et al., 2003). Em folhas de bromélias da espécie *Vriesea gigantea* adultas cultivadas na presença de ureia, sugere-se a participação de transportadores proteicos (aquaporinas) que não apresentaram saturação mesmo em altas concentrações dessa fonte nitrogenada, contribuindo também para a redistribuição de água ao longo da folha mesmo em condição hídrica limitante (MATIZ et al., 2017). Após ser absorvida, a ureia é clivada em duas moléculas de amônio e uma de dióxido de carbono por meio da atividade da enzima urease (INSELSBACHER et al., 2007). As moléculas de amônio são metabolizadas pela enzima glutamina sintetase (GS) com gasto de ATP e uso de cofatores catiônicos como o magnésio, manganês e cobalto (SODEK, 2008).

O nitrato além de ser utilizado para o incrementar o crescimento e o desenvolvimento das plantas, também pode influenciar na expressão gênica de aquaporinas; especificamente de aquaporinas da subfamília de proteínas intrínsecas da membrana plasmática (PIPs). Observou-se a indução da expressão gênica de ZmPIP1;5 em raízes de *Zea mays* (milho) após o cultivo com nitrato (GASPAR et al., 2003). De acordo com Wang, Garvin e Kochian (2001), foram encontrados sete genes relacionados aos canais transportadores de água, que na presença de nitrato são induzidos em plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). A condutividade hidráulica da raiz (Lpr) de plantas de *Arabidopsis thaliana* aumentou na presença de nitrato, assim como houve aumento na transcrição de genes PIP, fatos que possibilitaram aos tecidos maior aporte hídrico (LI et al., 2016). A expressão de genes da subfamília PIP de aquaporina e maior Lpr podem ter sido responsáveis, ao menos em partes, pelos resultados de melhor acúmulo de água, encontrado nas plantas

atmosféricas de *G. monostachia* que foram cultivadas in vitro na presença de 5 mM de nitrato.

A fonte nítrica também proporcionou para às plantas atmosféricas de *G. monostachia* uma maior produção de clorofilas e carotenoides. A segunda fonte nitrogenada que proporcionou maior teor de clorofilas e carotenoides foi o amônio. Endres e Mercier (2001), ao cultivar in vitro as espécies *Ananas comosus* e *Vriesea gigantea* na presença das fontes amônio ou ureia a 5mM, observaram maiores teores de clorofilas no tratamento com amônio. Além disso, os resultados de ganho de massas fresca e seca na espécie *Ananas comosus* também apontaram para o NO_3^- como uma boa fonte de N para estimular o crescimento de plantas jovens (SIDERIS; YOUNG, 1947). O nitrato é reduzido por meio das enzimas nitrato redutase (NR), nitrito redutase até amônio nos tecidos vegetais, seguindo a assimilação para produzir aminoácidos, e posteriormente, são sintetizados os ácidos nucleicos, proteínas, clorofilas, alcaloides, glicosídeos cianogênicos e glucosinolatos entre outras substâncias (BUCHANAN; GRUISSEN; JONES, 2015). Nas folhas, o nitrogênio proveniente do nitrato pode ser alocado principalmente em clorofilas e proporcionar um aparato fotossintético melhor às plantas, fato que pode ter ocorrido com o cultivo in vitro da espécie de bromélia *G. monostachia* na fase atmosférica.

Outro resultado interessante é referente aos principais aminoácidos presentes nos tecidos foliares das plantas atmosféricas de *G. monostachia*. Enquanto para a maioria dos vegetais asparagina (asn) e glutamina (gln) são as formas predominantes, para *G. monostachia* encontrou-se, além da asn, o aminoácido lisina (lys). Isso é pouco comum. Como mencionado por Sodek (2008), diferentes espécies podem ter a lisina como aa de transição na cascata da via do aspartato, ao atuar com regulador negativo da via de aminoácidos formadores de lisina, isoleucina, treonina, cisteína, leucina e valina, regulando assim o crescimento. A enzima ácido lisina-cetoglutárico redutase (LKR) condensa o aminoácido lys em ácido alfacetoglutárico, posteriormente utilizado no ciclo do ácido cítrico. Um mutante em LKR sugeriu que essa enzima pode estar ligada com a regulação do balanço de nitrogênio em plantas e a degradação de lisina com a síntese de proteínas (ARRUDA et al., 2000).

Gonçalves et al. (2016) analisaram a estocagem de nutrientes na forma de proteínas, taxa de crescimento das plantas, nitrogênio incorporado nos tecidos e

aminoácidos assimilados, proveniente de fezes de anuros em duas subfamílias de bromélias adultas (Bromelioideae e Tillandsioideae), divididas em sete espécies (*Ananas bracteatus*, *Quesnelia arvensis*, *Aechmea blanchetiana*, *Neoregelia cruenta*, *Vriesea gigantea*, *Vriesea bituminosa* e *Tillandsia cyanea*). Neste estudo, os autores observaram que, dentre os aminoácidos estocados, a maior quantidade foi na forma de asparagina. Ainda com relação a esse estudo, foram observados altos teores de asparagina em bromélias do tipo ecofisiológico III (*Vriesea gigantea* e *Vriesea bituminosa*) e do tipo IV (*Tillandsia cyanea*), que compreendem plantas com uma fase atmosférica ou totalmente atmosféricas. De acordo com Weissman (1959), houve uma alocação de maiores teores de nitrogênio em plantas de trigo na forma dos aminoácidos asparagina e glutamina quando as plantas foram cultivadas na presença de amônio, com relação às plantas cultivadas em nitrato. Resultados semelhantes de maior armazenamento de asparagina na presença de amônio 5mM em comparação com ureia foi observado por Endres e Mercier (2001) ao cultivar as bromélias *Ananas comosus* e *Vriesea gigantea* por dois meses em condição laboratorial in vitro.

As plantas de *Guzmania monostachia* no estágio atmosférico não apresentam o tanque e, portanto, não proporciona a visitação de organismos que contribuiriam com fontes nitrogenadas orgânicas como ureia. Pode-se esperar, portanto, que elas estejam melhor adaptadas a se desenvolver na presença de formas inorgânicas de N, como o nitrato. O nitrogênio proveniente do nitrato para as plantas epífitas geralmente está em menor quantidade que o amônio, já que é favorecida a formação de amônio na água de chuvas (HEATON 1987; LIU et al., 2012). Mas, a concentração de nitrato pode ser incrementada na água de escoamento que passa pelo dossel da floresta, chegando enriquecida nesse nutriente para as plantas epífitas (CLARK et al., 1998). Mesmo que algumas bromélias adultas, como a espécie *Vriesea gigantea* (INSELSBACHER et al., 2007) e a espécie *G. monostachia* (ZOTZ, 2016), tenham preferência pela absorção do amônio, as atmosféricas podem preferencialmente absorver e assimilar o nitrato. Até mesmo porque o nitrato não apresenta o mesmo efeito de toxicidade que o amônio pode apresentar (BRITTO; KRONZUCKER, 2002).

Assim, os nossos resultados de cultivo in vitro apontam que diferentes fontes nitrogenadas modificam metabolicamente e estruturalmente a bromélia *Guzmania monostachia*, sendo a fonte nítrica a mais apropriada para uma adequada estocagem de água nos parênquimas aquíferos e produção do parênquima clorofiliano, promovendo

um melhor crescimento e desenvolvimento das plantas no estágio atmosférico. Dessa maneira, pode-se sugerir que a bromélia em fase atmosférica apresentou semelhanças às características de comportamento fisiológico da bromélia terrícola *Ananas comosus*. Tal fato talvez seja devido à falta de um tanque e, portanto, à falta de acesso às fontes nitrogenadas orgânicas como, por exemplo, a ureia. Já a fonte amoniacal e ureídica não estimularam o crescimento e desenvolvimento das plantas nesse estágio ontogenético, ao contrário do encontrado para a fase adulta com tanque de outras bromélias epífitas. Talvez a toxicidade do NH_4^+ , quando esse íon não é assimilado rapidamente em aminoácidos, tenha prejudicado o crescimento e a formação dos tecidos. O aminoácido glutamina, aparentemente, também mostrou-se ter um efeito ligeiramente positivo sobre o crescimento da bromélia *G. monostachia* atmosférica, apesar de não termos encontrado diferenças estatísticas significativas em relação às demais fontes empregadas.

Experimentos futuros ainda poderão explorar a funcionalidade dos tricomas nos diferentes tratamentos nitrogenados. E dessa maneira comprovar se uma condição com maior número de tricomas e com tamanhos diferentes possibilitaria uma maior absorção de água e nutrientes. Seria interessante, também, conhecer os conteúdos endógenos de auxinas e citocininas, correlacionando com as presenças dos parênquimas aquíferos e clorofilianos mais bem estabelecidos na presença de nitrato. Além disso, o fornecimento de todas as fontes nitrogenadas ao mesmo tempo, sendo que uma delas marcada com N^{15} poderia dar uma ideia mais precisa sobre a preferência nutricional de *Guzmania monostachia*, comparando o comportamento das formas atmosféricas com as adultas com tanque.

Referências bibliográficas

ARRUDA, P. et al. Regulation of lysine catabolism in higher plants. **Trends in Plant Science Reviews**, v. 5, n. 8, p. 324-330, 2000.

BARKER, A. V.; PILBEAM, D. J. **Handbook of Plant Nutrition**. Nova Iorque: CRC Press, (Books in soils, plants, and the environment), 2015.

BENSON, J. R.; HARE, P. E. *O*-phthalaldehyde: fluorogenic detection of primary amines in the picomole range. Comparison with fluorescamine and ninhydrin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 72, n. 2, p. 619-622, 1975.

- BENZING, D. H. Carbon and water balance. In: BENZING, D. H. (Org.) **Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation**. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.
- BENZING, D. H. **Vascular Epiphytes**. Cambridge: Cambridge University Press, 1990.
- BENZING, D. H.; SEEMANN, J.; RENFROW, A. The foliar epidermis in Tillandsioideae (Bromeliaceae) and its role in habitat selection. **American Journal of Botany**, v. 65, n. 3, p. 359-365, 1978.
- BENZING, D. H. The monocotyledons: their evolution and comparative biology. I. Mineral nutrition and related phenomena in Bromeliaceae and Orchidaceae. **The Quarterly Review of Biology**, v. 48, n. 2, p. 277-290, 1973.
- BIELESKI, R. L.; TURNER, N. A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 17, n. 2, p. 278-293, 1966.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRAGA, M. M. N. Anatomia foliar de Bromeliaceae da Campina. **Acta Amazônica**, v. 7, n. 3, p. 1-74, 1977.
- BRITTO, D. T.; KRONZUCKER, H. J. NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. **Journal of Plant Physiology**, v. 159, n. 6, p. 567-584, 2002.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSSEN, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. 2. ed. Oxford: Wiley Blackwell, 2015.
- BUKATSCH, F. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. **Mikrokosmos**, v. 61, n. 8, p. 255, 1972.
- CARDELUS, C. L.; MACK, M. C. The nutrient status of epiphytes and their host trees along an elevational gradient in Costa Rica. **Plant Ecology**, v. 207, n. 1, 25-37, 2010.
- CLARK, K. L. et al. Atmospheric deposition and net retention of ions by the canopy in a tropical montane forest, Monteverde, Costa Rica, **Journal of Tropical Ecology**, v. 14, n. 1, p. 27-45, 1998.
- DIJK, E.; ECK, N. Ammonium toxicity and nitrate response of axenically grown *Dactylorhiza incarnata* seedlings. **New Phytologist**, v. 131, p. 361-367, 1995.
- DISSANAYAKE, M. et al. Denaturation of whey proteins as a function of heat, pH and protein concentration. **International Dairy Journal**, v. 31, n. 2, p. 93-99, 2013.
- ENDRES, L.; MERCIER, H. Ammonium and urea as nitrogen sources for bromeliads. **Journal Plant Physiology**, v. 158, n. 2, p. 205-212, 2001.

- GASPAR, M. et al. Cloning and characterization of *ZmPIP1-5b*, an aquaporin transporting water and urea, **Plant Science**, v. 165, p. 21-31, 2003.
- GERENDÁS, J.; SATTELMACHER, B. Influence of Ni supply on growth and nitrogen metabolism of *Brassica napus* L. grown with NH_4NO_3 or urea as N source. **Annals of Botany**, v. 83, n. 1, p. 65-71, 1999.
- GONÇALVES, A. Z. et al. Trade-off between soluble protein production and nutritional storage in Bromeliaceae. **Annals of Botany**, v. 118, n. 6, p. 1199-1208, 2016.
- HAMASAKI, R. M.; PURGATTO, E.; MERCIER, H. Glutamine enhances competence for organogenesis in pineapple leaves cultivated in vitro. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 17, n. 4, p. 383-389, 2005.
- HEATON, T. H. E. $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Ratios of nitrate and ammonium in rain at Pretoria, South Africa. **Atmospheric Environment**, v. 21, n. 4, p. 843-852, 1987.
- HIETZ, P. et al. Nitrogen-15 natural abundance in a montane cloud forest canopy as an indicator of nitrogen cycling and epiphyte nutrition. **Oecologia**, v. 131, n. 3, p. 350-355, 2002.
- INSELSBACHER, E. et al. Microbial activities and foliar uptake of nitrogen in the epiphytic bromeliad *Vriesea gigantea*. **New Phytologist**, v. 175, n. 2, p. 311-320, 2007.
- JARRETT, H. W. et al. The separation of *o*-Pthaldehyde derivatives of amino acids by reverse-phase chromatography on octylsilica columns. **Analytical Biochemistry**, v. 153, p. 189-198, 1986.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940.
- KRONZUCKER, H. J. et al. Ammonium toxicity and the real cost of transport. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 8, p. 335-337, 2001.
- KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, v.15, p. 214–217, 1946.
- LI, G. et al. Dual regulation of root hydraulic conductivity and plasma membrane aquaporins by plant nitrate accumulation and high-affinity nitrate transporter NRT2.1, **Plant Cell Physiology**, v. 57, n. 4, p. 733-742, 2016.
- LIU, X. Y. et al. Pitfalls and new mechanisms in moss isotope biomonitoring of atmospheric nitrogen deposition. **Environmental Science Technology**, v. 46, p. 12557-12566, 2012.
- LIU, L. et al. Urea transport by nitrogen-regulated tonoplast intrinsic proteins in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 133, n. 3, p. 1220-1228, 2003.
- MARUR, C. J.; SODEK, L.; MAGALHÃES, A. C. Free amino acids in leaves of cotton plants under water deficit. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, v. 6, n. 2, p. 103-108, 1994.

- MATIZ, A. et al. Utilization of urea by leaves of bromeliad *Vriesea gigantea* under water deficit: much more than a nitrogen source. **Biologia Plantarum**, v. 61, n. 4, p. 751-762, 2017.
- MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. Endogenous IAA and cytokinin levels in bromeliad shoots as influenced by glutamine and ammonium nitrate treatments. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, v. 10, p. 225-228, 1998.
- MERCIER, H. et al. Growth and GDH and ATT isoenzyme patterns in terrestrial and epiphytic bromeliads as influenced by nitrogen source. **Selbyana**, v. 18, n. 1, p. 89-94, 1997a.
- MERCIER, H. et al. Effects of NO_3^- , NH_4^+ and urea nutrition on endogenous levels of IAA and four cytokinins in two epiphytic bromeliads. **Plant Cell and Environment**, v. 20, p. 387-392, 1997b.
- MINOCHA, R. et al. Development of a standardized methodology for quantifying total chlorophyll and carotenoids from foliage of hardwood and conifer tree species. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 39, n. 4, p. 849-861, 2009.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiology Plant**, v. 15, p. 473-479, 1962.
- OKSANEN, J. et al. 2013. **Vegan: community ecology package. R package version 2.0-9**. Disponível em: < <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>>. Acesso em: 21 out. 2017.
- PORRA, R. J.; THOMPSON, W. A.; KRIEDEMANN, P. E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 975, n. 3, p. 384-394, 1989.
- PUIATTI, M.; SODEK, L. Water logging affects nitrogen transport in the xylem of soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 10, p. 767-773, 1999.
- R CORE TEAM. 2014. **R: a language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing**, Vienna, Austria. Disponível em: < <http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 21 out. 2017.
- RIBEIRO, F. F.; AOYAMA, E. M. Anatomia dos órgãos vegetativos de *Cryptanthus beuckeri* e. morren (bromeliaceae). **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 22, p. 2830-2843, 2015.
- RICHARDSON, B. A. et al. Effects of nutriente availability and other elevational changes on bromeliad populations and their invertebrate communities in a humid tropical forest in Puerto Rico. **Journal of Tropical Ecology**, v. 16, p. 167-188, 2000.

RODRIGUES, M. A. et al. Implications of leaf ontogeny on drought-induced gradients of CAM expression and ABA levels in rosettes of the epiphytic tank bromeliad *Guzmania monostachia*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 108, p. 400-411, 2016.

RODRIGUES, M. A. et al. Interactions between nutrients and crassulacean acid metabolism. In: LÜTTGE, U.; BEYSCHLAG, W.; CUSHMAN, J. (Eds.). **Progress in botany (Genetics – pHydrology – Systematics – Ecology)**, v. 75. Heidelberg: Springer, 2014.

ROMERO, G. Q. et al. Nitrogen fluxes from treefrogs to tank epiphytic bromeliads: an isotopic and physiological approach. **Oecologia**, v. 162, n. 4, p. 941-949, 2010.

SCATENA, V. L.; SEGECIN, S. Anatomia foliar de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais, Paraná, Brasil, **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, n. 3, p. 635-649, 2005.

SIDERIS, C. P.; YOUNG, H. Y. Effects of nitrogen on chlorophyll, acidity, ascorbic acid, and carbohydrate fractions of *Ananas comosus* (L.) Merr. **Plant Physiology**, v. 22, n. 2, p. 97-116, 1947.

SILVEIRA, M. Preparo de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. In: SOUZA, W. (Ed.). **Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica**. Rio de Janeiro: Sociedade Botânica de Microscopia Eletrônica, p. 71-79, 1989.

SILVA JÚNIOR, J. M. D. et al. Changes in anatomy and chlorophyll synthesis in orchids propagated in vitro in the presence of urea. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 35, n. 1, p. 65-72, 2013.

SCHIMIDT, Z.; ZOTZ, G. Ecophysiological consequences of differences in plant size: in situ carbon gain and water relations of the epiphytic bromeliad, *Vriesea sanguinolenta*. **Plant cell and Environment**, v.24, p. 101-111, 2001.

SODEK, L. Metabolismo do nitrogênio. In: KERBAUY, G. B. (Ed.). **Fisiologia vegetal**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 94-113, 2008.

STRITTMATTER, C. G. D. Nueva técnica de diafanización. **Boletín de Sociedad Argentina de BOTÁNICA**, v. 15, p. 126-129, 1973.

TAKAHASHI, C. A. **Assimilação do nitrogênio em folhas de *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae) durante a transição ontogenética do hábito atmosférico para o epífito com tanque**. 2013. 112 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

TAKAHASHI, C. A.; MERCIER, H. Nitrogen metabolism in leaves of a tank epiphytic bromeliad: Characterization of a spatial and functional division. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 11, p. 1208-1216, 2011.

TAKAHASHI, C. A.; CECCANTINI, G. C. T.; MERCIER, H. Differential capacity of nitrogen assimilation between apical and basal leaf portions of a tank epiphytic bromeliad. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 2, p. 119-126, 2007.

TAMAKI, V.; MERCIER, H. . Effects of different ammoniacal nitrogen sources on N-metabolism of atmospheric bromeliad *Tillandsia pohliana* (Bromeliaceae), an atmospheric bromeliad. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n.4, p. 407-413, 2001.

WANG, Y. H.; GARVIN, D. F.; KOCHIAN, L. V. Nitrate induced genes in tomato roots. Array analysis reveals novel genes that may play a role in nitrogen nutrition, **Plant Physiology**, v. 127, n. 1, p. 345-359, 2001.

WEISSMAN, G. S. Influence of ammonium and nitrate on the protein and free amino acids in shoots of wheat seedlings, **American Journal Botany**, v. 46, n. 5, p. 339-346, 1959.

WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 307-313, 1994.

ZOTZ, G. Physiological ecology. In: ZOTZ, G. **Plants on plants: the biology of vascular epiphytes**. Cham: Springer International Publishing, 2016.

ZOTZ, G.; WILHELM, K.; BECKER, A. Heteroblasty - a review. **The Botanical Review**, v. 77, n. 2, p. 103-151, 2011.

ZOTZ, G.; THOMAS, V. How much water is in the tank? Model calculations for two epiphytic bromeliads. **Annals of Botany**, v. 83, n. 2, p. 183-192, 1999.

Figuras

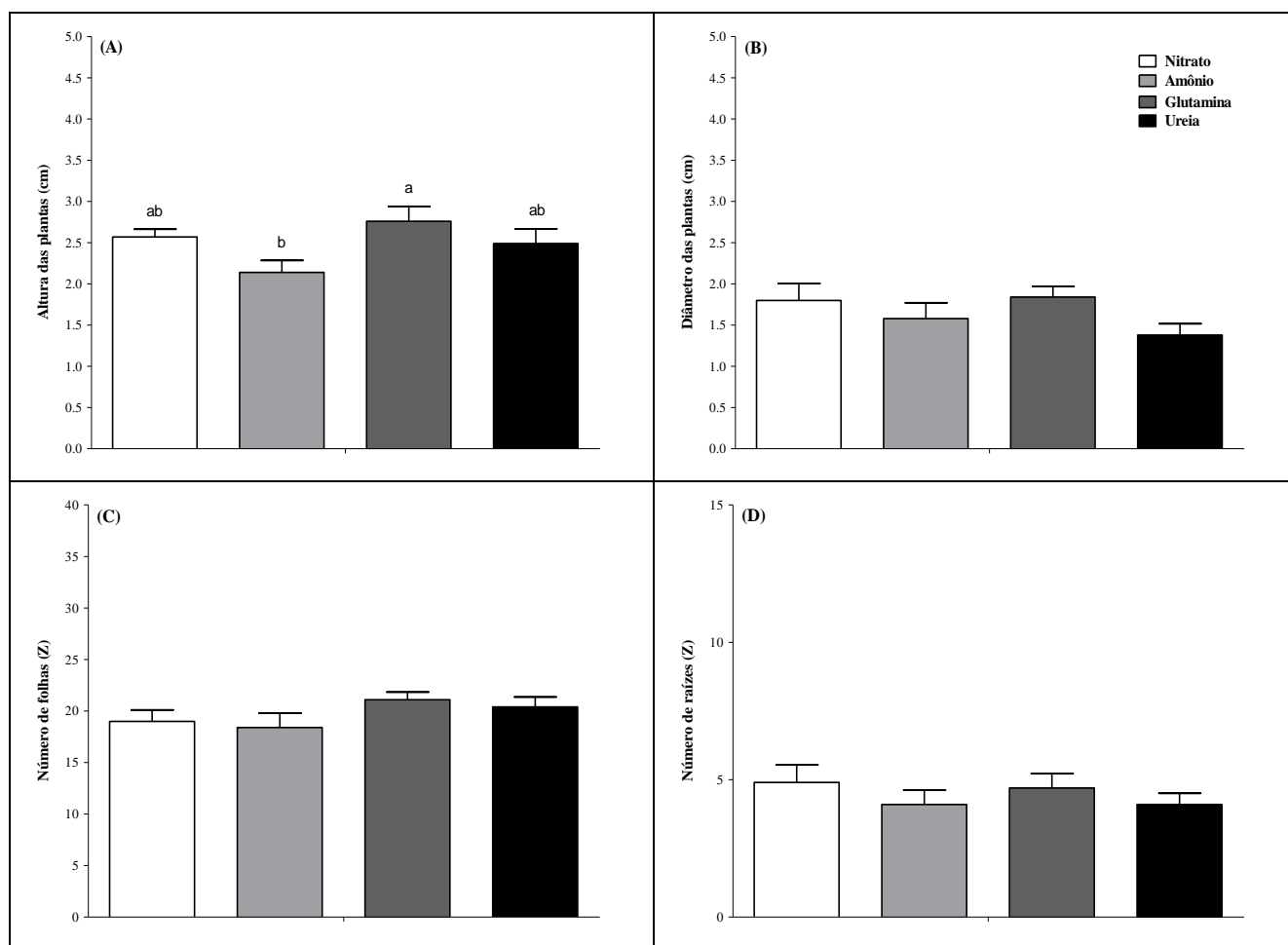


Figura 1. (A) Altura, (B) diâmetro, (C) número de folhas e (D) número de raízes de plantas de *Guzmania monostachia* atmosféricas cultivadas in vitro em diferentes fontes nitrogenadas (nitrato, amônio, glutamina ou ureia). Barras indicam médias e erro padrão. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos (ANOVA/ Tukey HSD, $\alpha = 0,05$).

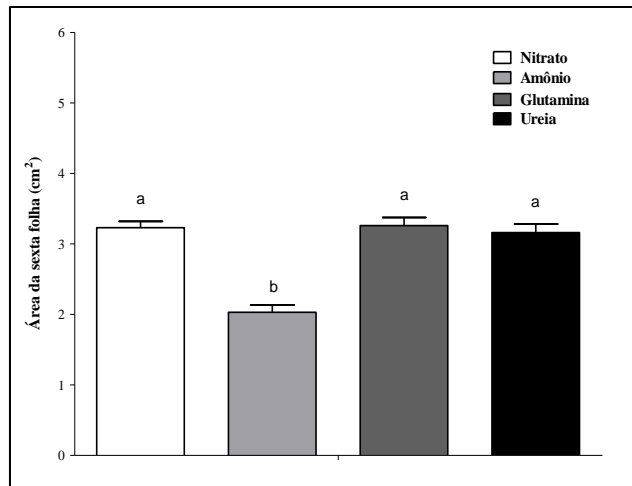


Figura 2: Área das folhas do sexto nó da roseta de *Guzmania monostachia* atmosféricas que foram cultivadas in vitro em diferentes fontes nitrogenadas (nitrato, amônio, glutamina ou ureia). Barras indicam médias e erro padrão. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos (ANOVA/ Tukey HSD, $\alpha = 0,05$).

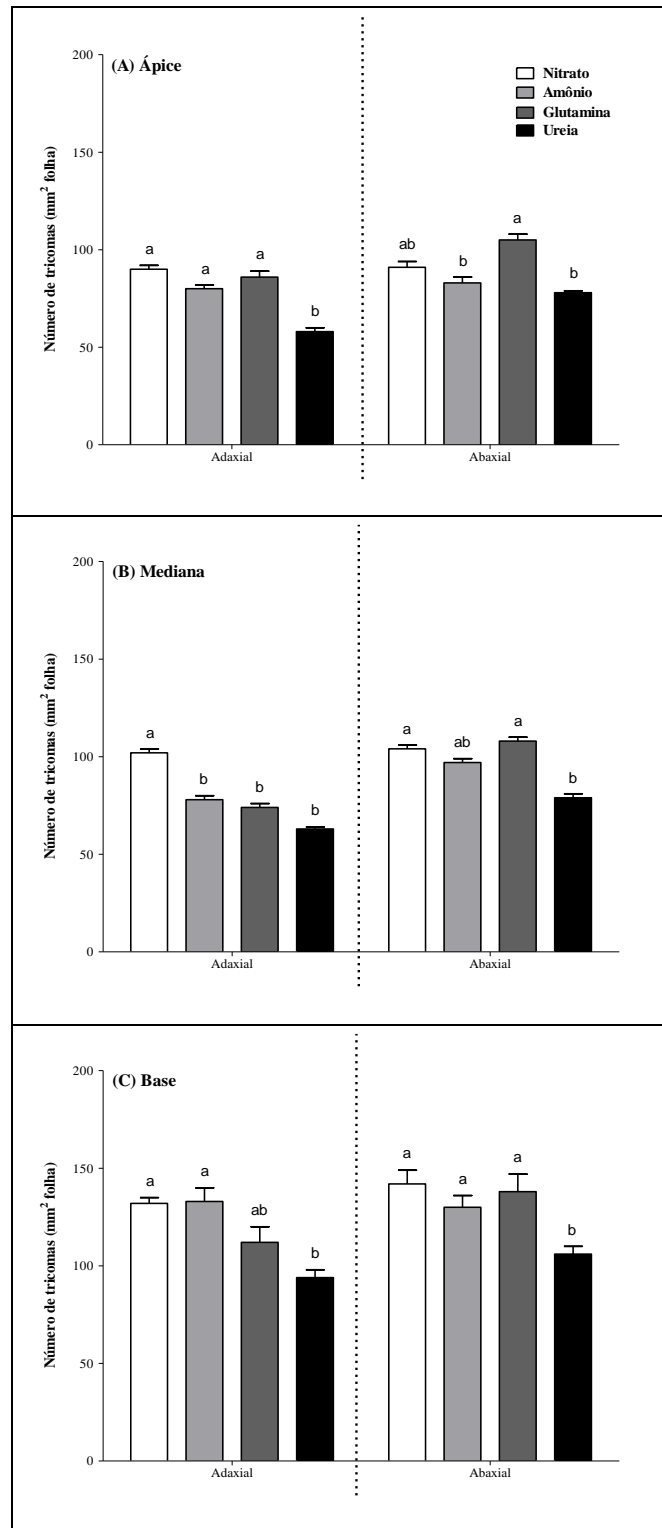


Figura 3: Densidade de tricomas nas porções (A) apical, (B) mediana e (B) basal das faces adaxial e abaxial das folhas de plantas atmosféricas de *Guzmania monostachia* cultivadas in vitro em diferentes fontes nitrogenadas (nitrato, amônio, glutamina ou ureia). Barras indicam médias e erro padrão. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos (ANOVA/ Tukey HSD, $\alpha = 0,05$).

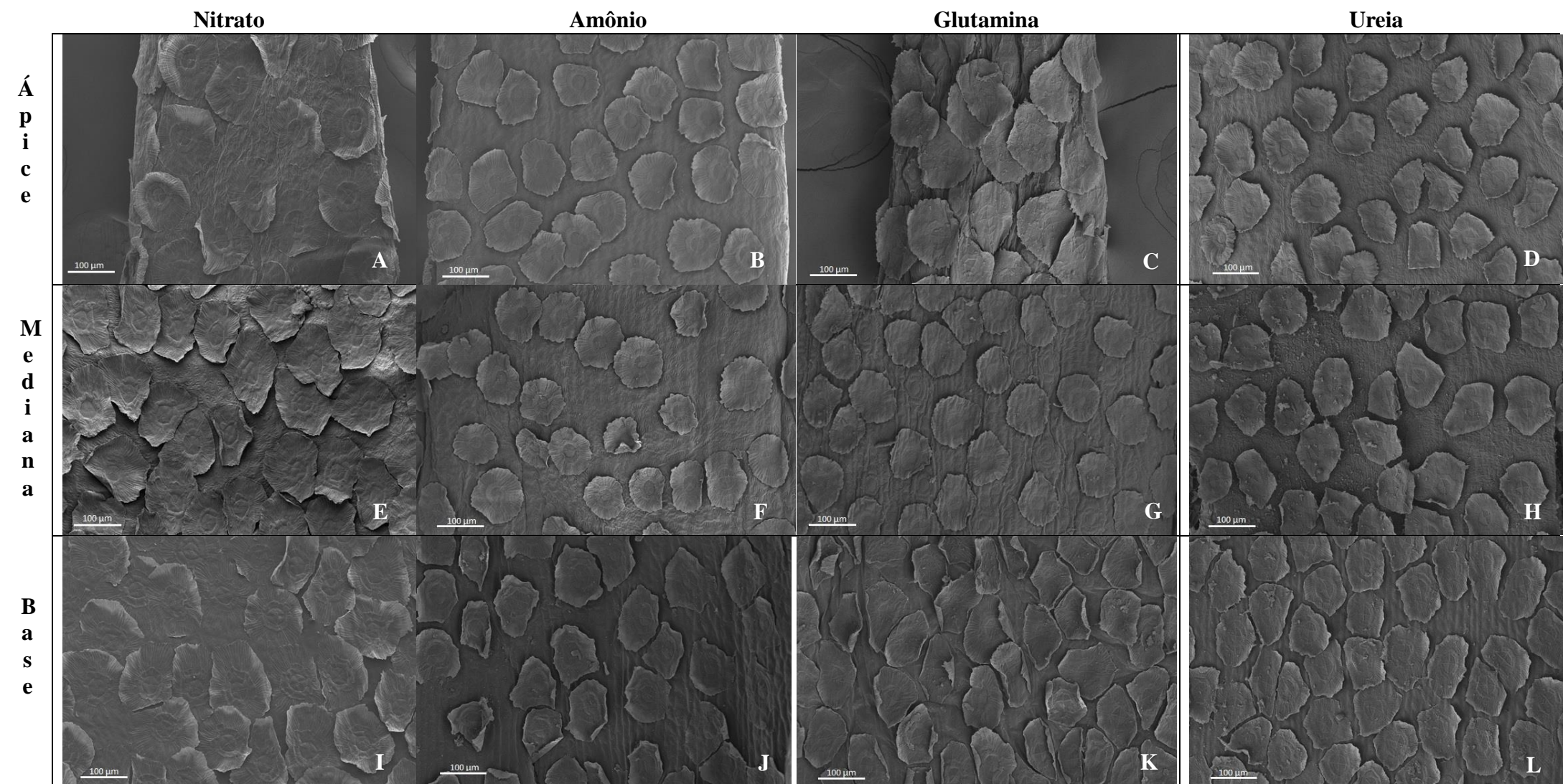


Figura 4: Aspecto geral da epiderme em microscopia eletrônica de varredura de folhas do sexto nó da roseta de *Guzmania monostachia* cultivadas in vitro em diferentes fontes nitrogenadas (nitrato, amônio, glutamina ou ureia). (A), (B), (C) e (D) representam ápices foliares submetidos aos tratamentos de nitrato, amônio, glutamina ou ureia, respectivamente; (E), (F), (G) e (H) representam as porções medianas e (I), (J), (K) e (L) representam as bases foliares.

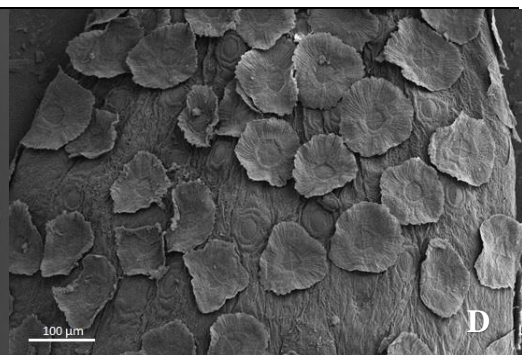
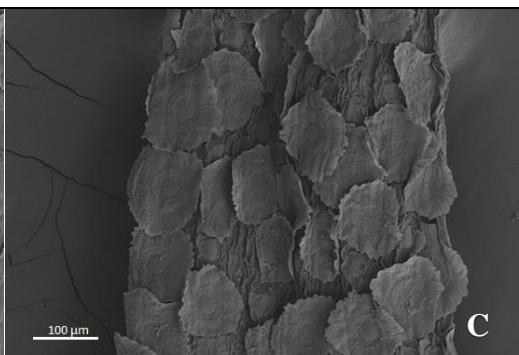
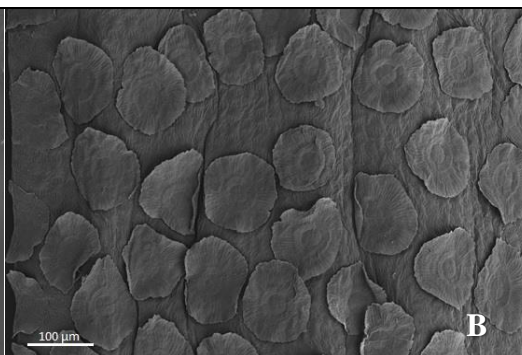
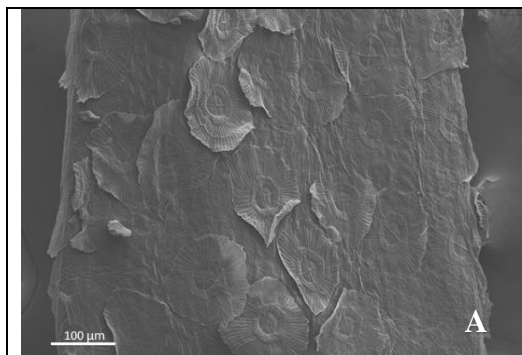
Nitrato

Amônio

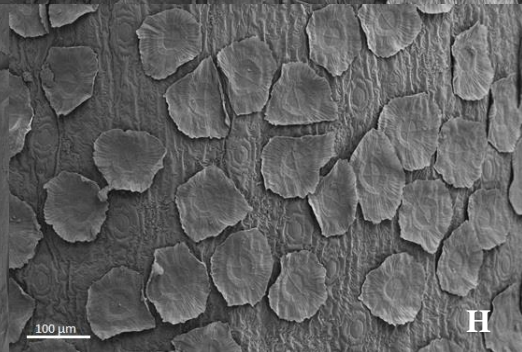
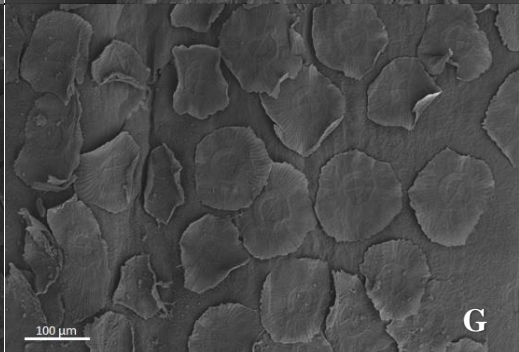
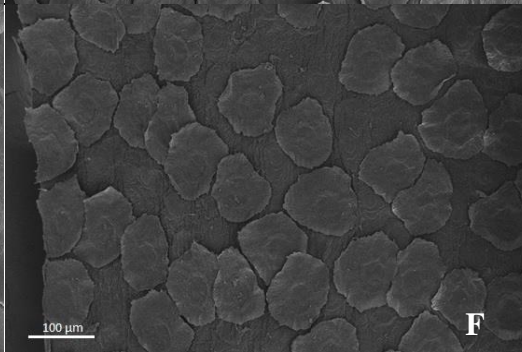
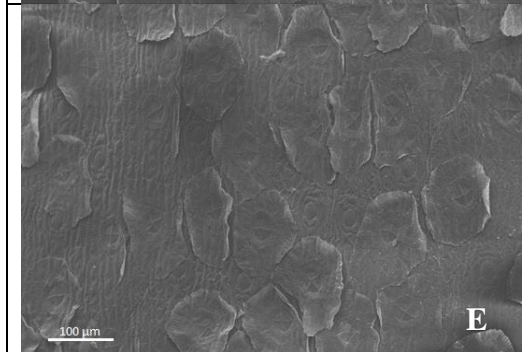
Glutamina

Ureia

Á
p
i
c
e



M
e
d
i
a
n
a



B
a
s
e

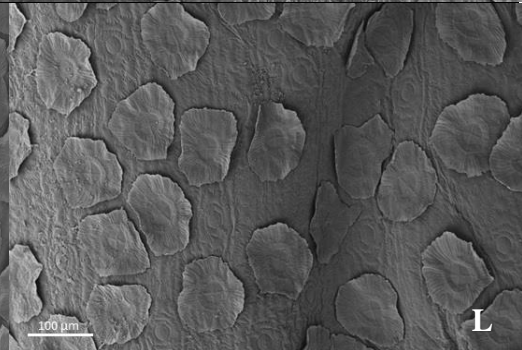
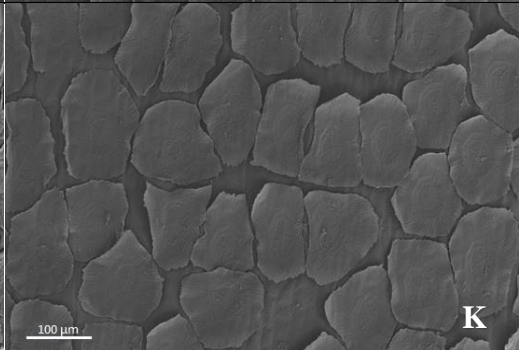
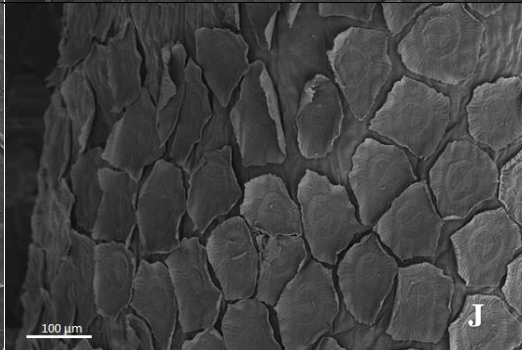
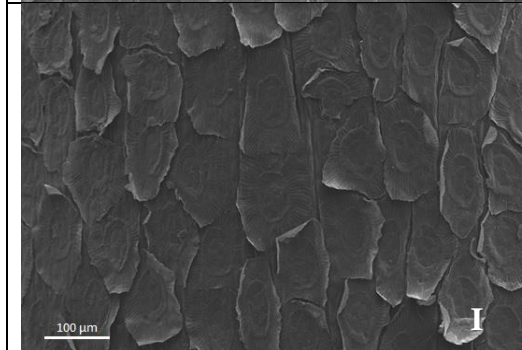


Figura 5: Aspecto geral da epiderme em microscopia eletrônica de varredura. (A), (B), (C) e (D) representam ápices foliares submetidos aos tratamentos de nitrato, amônio, glutamina ou ureia, respectivamente; (E), (F), (G) e (H) representam as porções medianas e (I), (J), (K) e (L) representam as bases foliares.

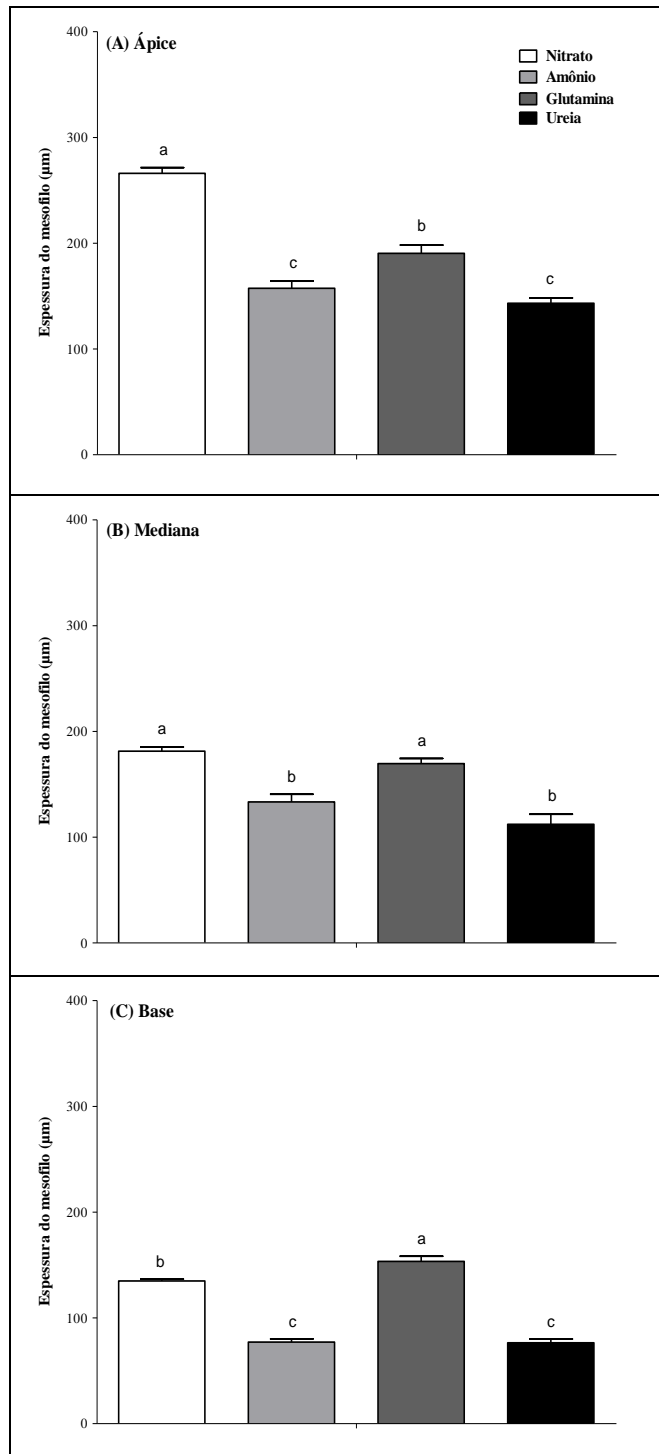


Figura 6: Espessura média do mesofilo nas porções (A) apical, (B) mediana e (B) basal na sexta folha de *Guzmania monostachia* atmosféricas cultivadas in vitro em diferentes fontes nitrogenadas (nitrato, amônio, glutamina ou ureia). Barras indicam médias e erro padrão. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos (ANOVA/ Tukey HSD, $\alpha = 0,05$).

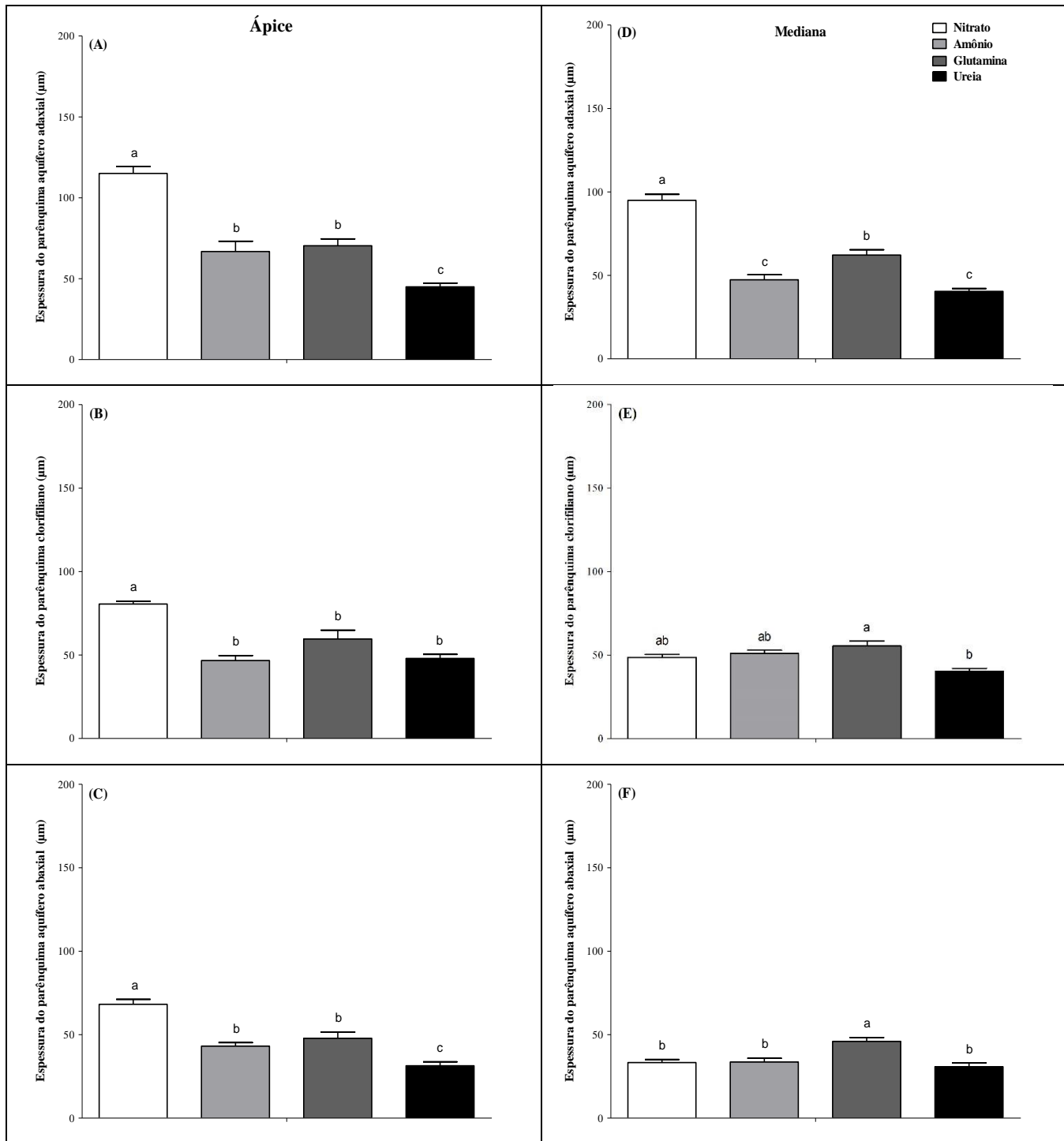


Figura 7: Espessura média dos tecidos (A) e (D) parênquima aquífero adaxial, (B) e (E) parênquima clorofiliano e (C) e (F) parênquima aquífero abaxial nas porções (A), (B), (C) apical e (D), (E), (F) mediana na sexta folha de *Guzmania monostachia* quando plantas atmosféricas foram cultivadas in vitro em diferentes fontes nitrogenadas (nitrato, amônio, glutamina ou ureia). Barras indicam médias e erro padrão. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos (ANOVA/ Tukey HSD, $\alpha = 0,05$).

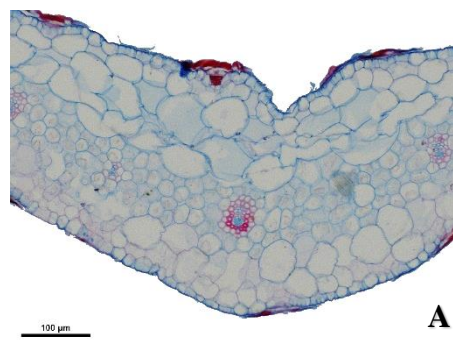
Nitrato

Amônio

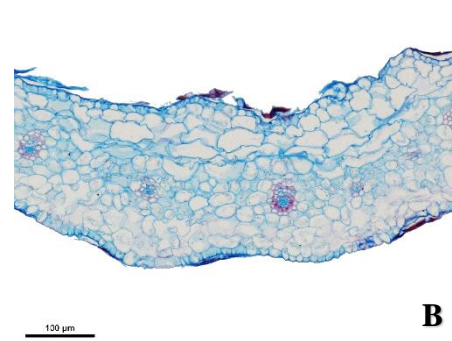
Glutamina

Ureia

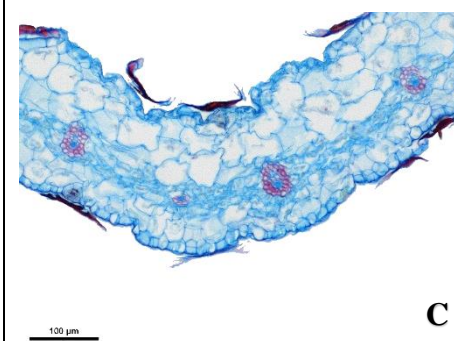
Ápice



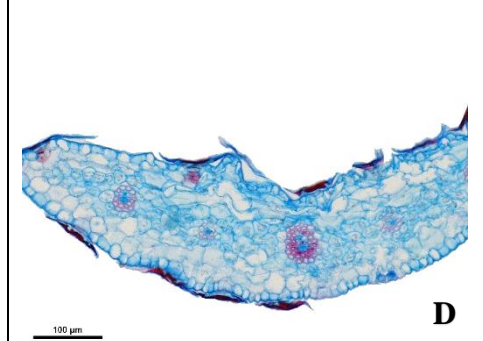
A



B

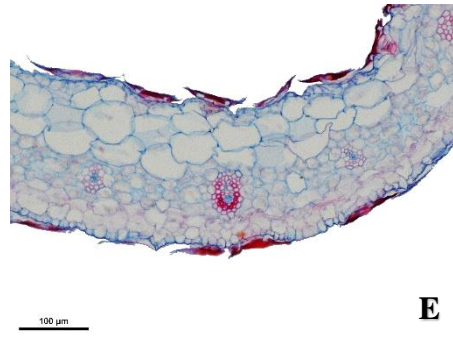


C

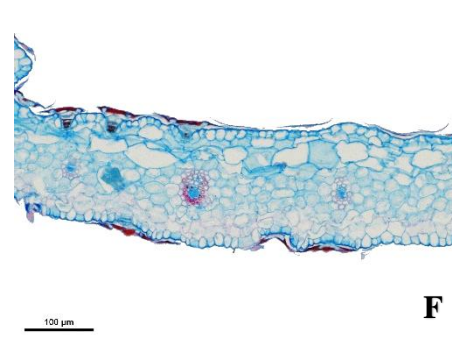


D

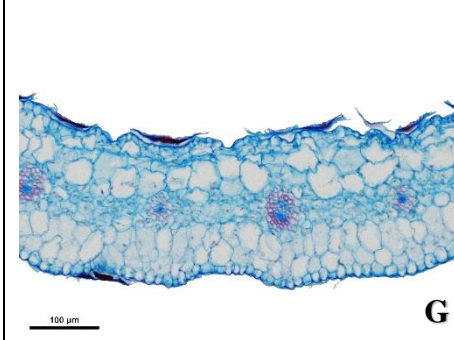
Mediana



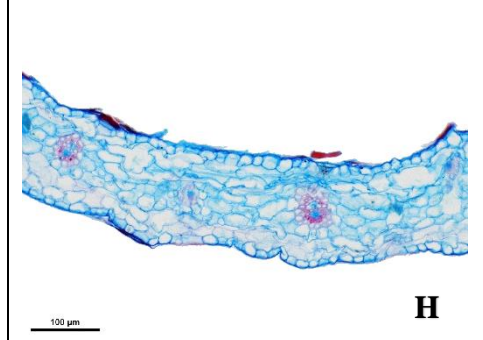
E



F

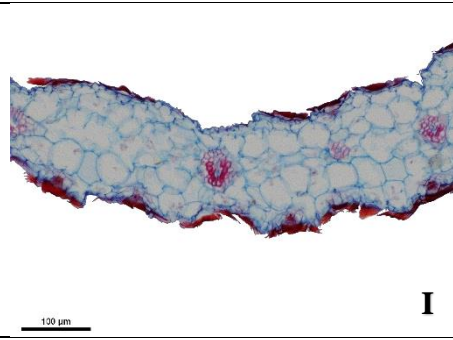


G

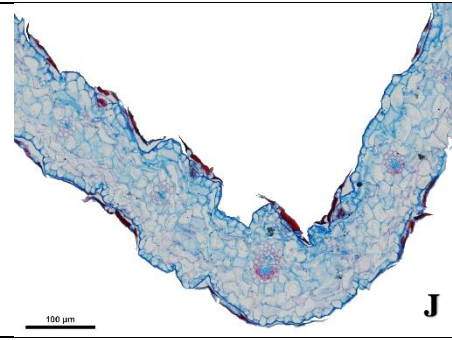


H

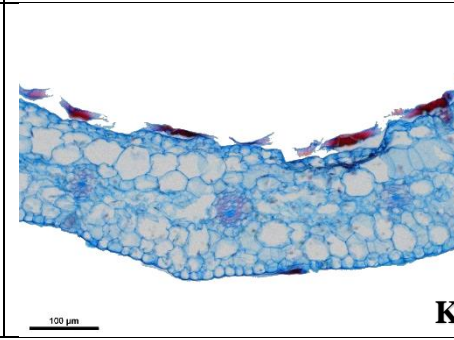
Base



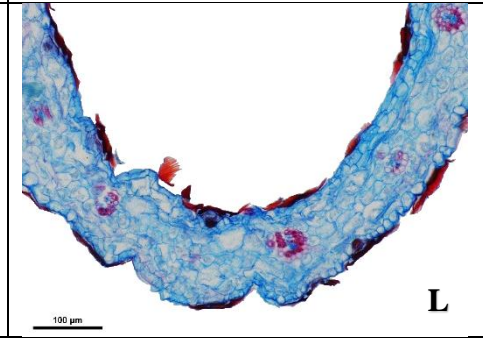
I



J



K



L

Figura 8: Secções transversais de folhas do sexto nó da roseta de *Guzmania monostachia* quando atmosféricas cultivadas in vitro em diferentes fontes nitrogenadas. A sequência da esquerda para a direita representa os resultados obtidos para as fontes nitrato, amônio, glutamina e ureia. (A), (B), (C) e (D) representam ápices foliares submetidos aos tratamentos; (E), (F), (G) e (H) representam as porções medianas submetidas aos tratamentos e (I), (J), (K) e (L) representam as bases foliares.

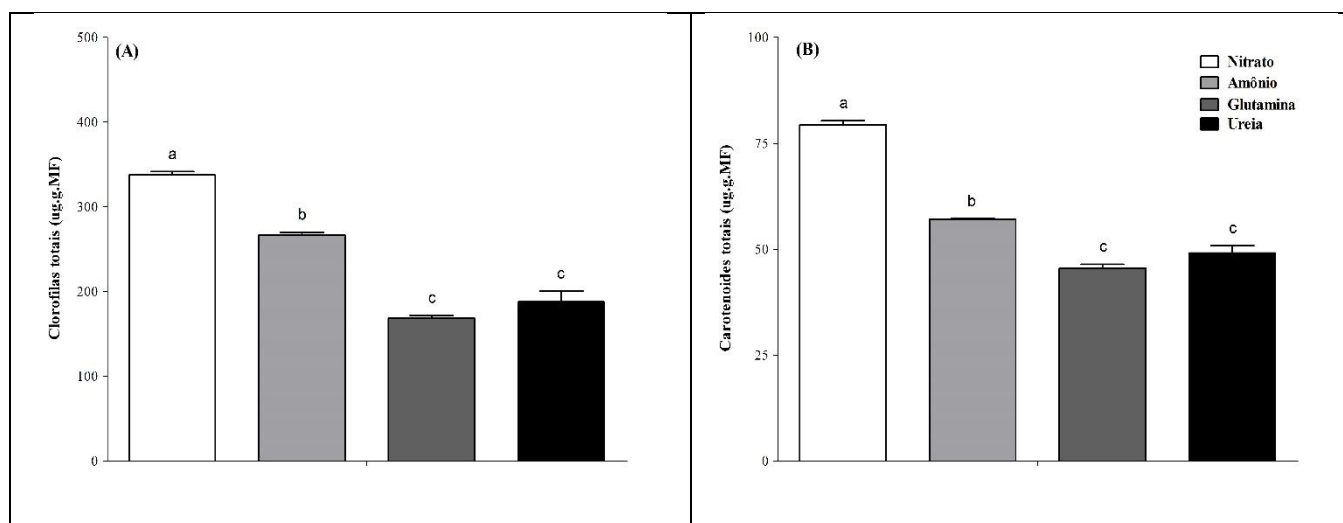


Figura 9: Teor de clorofilas totais (A) e carotenoides totais (B) em *Guzmania monostachia* quando plantas atmosféricas foram cultivadas in vitro em diferentes fontes nitrogenadas (nitrato, amônio, glutamina ou ureia). Barras indicam médias e erro padrão. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos (ANOVA/ Tukey HSD, $\alpha = 0,05$).

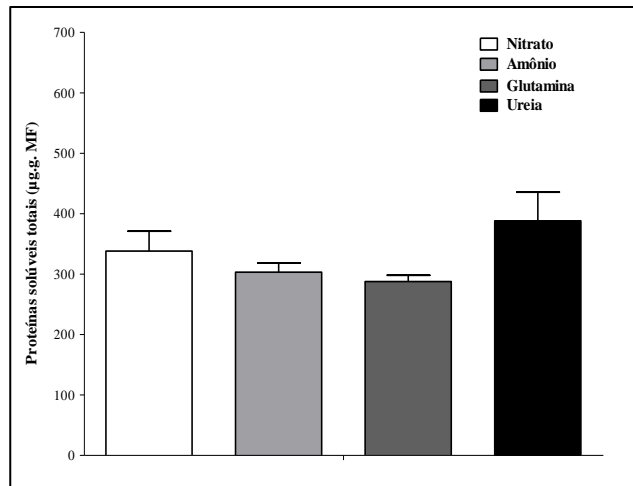


Figura 10: Teor de proteínas solúveis totais em plantas atmosféricas de *Guzmania monostachia* cultivadas in vitro em diferentes fontes nitrogenadas (nitrato, amônio, glutamina ou ureia).

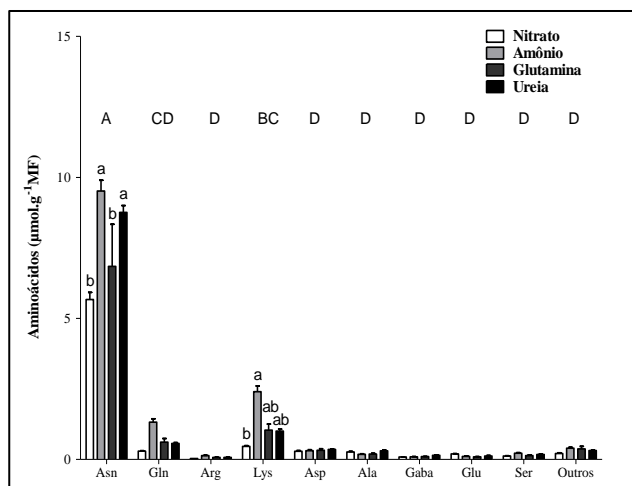


Figura 11: Teor de aminoácidos - livres em um *pool* de amostras foliares de *Guzmania monostachia* quando plantas atmosféricas foram cultivadas in vitro em diferentes fontes nitrogenadas (nitrato, amônio, glutamina ou ureia). Barras indicam médias e erro padrão. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos e letras maiúsculas indicam diferenças entre os tipos de aminoácidos (ANOVA/ Tukey HSD, $\alpha = 0,05$).

Capítulo 02 – Efeitos de diferentes fontes de nitrogênio e do déficit hídrico sobre o grau de expressão do CAM em plantas atmosféricas de *Guzmania monostachia* cultivadas in vitro.

Resumo

A espécie *Guzmania monostachia* apresenta heteroblastia, isto é, uma fase juvenil atmosférica e uma fase adulta com desenvolvimento de tanque. Por meio de trocas gasosas, flutuação noturna de ácidos e razão isotópica, constatou-se que as plantas jovens dessa espécie já expressam o metabolismo ácido das crassuláceas (CAM). Em resposta às adversidades ambientais, como a seca temporária ou a indisponibilidade de nutrientes, um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pode ocorrer e, dependendo da concentração alcançada nos tecidos, pode gerar danos oxidativos. Entretanto, as ROS também podem estar envolvidas com processos de sinalização celular, desde que em baixas concentrações. Folhas destacadas de plantas adultas de *Guzmania monostachia*, submetidas a um déficit hídrico e cultivadas na presença de diferentes fontes nitrogenadas mostraram diferentes intensidades de CAM e teores de ROS no ápice foliar. Entretanto, pouco se conhece, até o momento, sobre a modulação do CAM em plantas da fase juvenil. Assim, esta pesquisa objetivou analisar os efeitos do cultivo prévio de plantas atmosféricas em diferentes fontes de nitrogênio sobre a modulação da intensidade do CAM interferindo na capacidade dessas plantas resistirem a um período posterior de déficit hídrico. Isso foi avaliado por meio das medidas de suculência dos tecidos, acúmulo noturno de ácidos orgânicos, atividade da enzima PEPC, produção de H₂O₂ e atividade de enzimas antioxidantes: SOD; CAT; APX; GPOX e GR. Os resultados demonstraram que a fonte nítrica propiciou a maior expressão do CAM em relação às outras fontes nitrogenadas, quando computado o conteúdo total de ácidos orgânicos (ácidos málico + cítrico). No entanto, não foram observados aumentos da atividade da PEPC nas plantas crescidas nas fontes inorgânicas, como o nitrato, mas somente nas orgânicas no tratamento de déficit hídrico. Diferentemente das outras fontes de N, o nitrato foi a que propiciou o maior acúmulo noturno de ácido cítrico nas plantas submetidas à deficiência hídrica. Houve também uma maior suculência dos tecidos no tratamento com nitrato, mesmo após a imposição dos 7 dias de deficiência hídrica, indicando que essa alteração de estocagem de água em maior proporção deva ser uma condição importante para o desenvolvimento de um grau mais elevado de CAM. O conteúdo de peróxido de hidrogênio aumentou quando as plantas previamente cultivadas em nitrato foram submetidas ao déficit hídrico, sugerindo que essa ROS poderia atuar como um sinalizador na modulação do CAM, já que as atividades das enzimas antioxidantes diminuíram em relação ao controle (SOD e GR) ou permaneceram iguais estatisticamente (CAT, APX, GPOX). Em conclusão, as plantas atmosféricas de *Guzmania monostachia*, as quais cresceram e se desenvolveram na presença de nitrato e que posteriormente foram submetidas à deficiência hídrica, apresentam maior suculência e intensidade do CAM, sugerindo que essas plantas possam tolerar melhor o estresse hídrico do que as plantas cultivadas em outras formas de N. Ao contrário de trabalhos anteriores do grupo que mostraram que as plantas adultas de *G. monostachia* intensificaram o CAM na presença de amônio, indicando que plantas de diferentes fases de desenvolvimento possuem comportamentos fisiológicos diferentes.

Palavras-chave: Fontes nitrogenadas, fotossíntese CAM, bromélia epífita, ROS. Enzimas antioxidantes, nitrato, amônio, ureia, glutamina.

Abstract

The species *Guzmania monostachia* presents heteroblasty, i.e., an atmospheric young phase and adulthood with a tank. Through gas exchange and the nocturnal acids fluctuation, it was found that the young plants of this species have the Crassulacean acid metabolism (CAM). In response to the environmental variations, such as intermittent drought or nutrient unavailability, an increment in the production of the reactive oxygen species (ROS) can occur and, depending on the concentration achieved by the tissues, it can generate oxidative damages. However, the ROS can also be involved in signaling of the cells at low concentrations. Withdrawn leaves of adult plants of *Guzmania monostachia* submitted to water deficit and different nitrogenous sources showed different intensities of CAM and levels of ROS in the foliar apex. However, little is known about the modulation of CAM in the juvenile plants. Thus, this study aimed to analyze the effects of cultivation of atmospheric plants in different nitrogen sources on the modulation of the intensity of CAM, affecting plant responses to a later period of water deficit. It was evaluated using the leaves succulence, the accumulation of nocturnal organic acids, the activity of the enzymes PEPC, H₂O₂ production and the activity of antioxidant enzymes: SOD, CAT, APX, GPOX and GR. The results showed that the nitric source provided the greatest expression of CAM than other nitrogenous sources when accounted the total content of organic acids (malic + citrus acids). However, it was not observed an increment in the activity of PEPC in plants that growth in inorganic sources such as nitrate, but only in the treatment of organic nitrogen combined with water deficit. Unlike other sources of N, nitrate was the only source that provided the biggest nocturnal citric acid accumulation in plants submitted to deficiency of water. There was also a greater succulence of plant tissues in the nitrate treatment even after seven days of water deficiency, indicating that this change in water storage should be an important condition a higher degree of CAM expression. The content of H₂O₂ increased in plants that were previously cultivated in nitrate were after submitted to hydric deficit, suggesting that ROS could act as a signaling in the modulation of the CAM metabolism as the activities of antioxidant enzymes decreased compared to the control treatments (SOD and GR) or remained the statistically same (CAT, APX, GPOX). In conclusion, the atmospheric *Guzmania monostachia* plants which grew in the presence of nitrate and that subsequently were submitted to deficiency of water presented greater succulence and an intensification of the CAM metabolism, suggesting that these plants can tolerate better the water stress conditions compared with plants that receive other forms of N. Unlike previous researches that have shown that adult plants of *G. monostachia* intensified the CAM in the presence of ammonium, indicating that plants of different development stages have different physiological behaviors.

Keywords: Nitrogen sources, CAM photosynthesis, epiphytic bromeliad, ROS, antioxidant enzymes, nitrate, ammonium, urea, glutamine.

Introdução

As plantas que se estabelecem no ambiente epífita ficam expostas a uma intermitência de água e nutrientes (LÜTTGE, 1989). Algumas dessas plantas apresentam adaptações para lidar com essas variações ambientais como, por exemplo, as bromélias que possuem folhas com a região basal alargada e sobrepostas, formando um reservatório de água e nutrientes chamado de tanque. Por meio dos tricomas foliares, a solução depositada no tanque pode ser absorvida (ZOTZ; HIETZ, 2001; BENZING, 2000). Porém, algumas bromélias não apresentam a formação do tanque ao longo da sua vida. Outras, ao longo do seu crescimento e/ou desenvolvimento, apresentam heteroblastia, isto é, possuem uma forma juvenil sem tanque, conhecida pelo termo atmosférica, e uma adulta com tanque (ZOTZ; WILHELM; BECKER, 2011).

A espécie *Guzmania monostachia* apresenta uma fase juvenil e na idade adulta desenvolve um tanque. Por meio de trocas gasosas, flutuação noturna de ácidos e razão isotópica, constatou-se que na fase atmosférica as plantas da espécie *G. monostachia* apresentam o metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) constitutivamente (RODRIGUES et al., 2014; BELTRÁN et al., 2013). Quantificações da acidez noturna feitas em nosso laboratório confirmaram esse tipo de metabolismo em plantas atmosféricas (Rodrigues et al. 2016; Carvalho et al. 2017). As plantas adultas com tanque, no entanto, possuem uma fotossíntese C3-CAM facultativa, já que pode alterar seu metabolismo de C₃ (boa condição hídrica) para o CAM quando em condição de falta de água, regulando desta maneira a sua condição fotossintética conforme a condição hídrica ambiental (FRESCHI et al., 2010a). O CAM propicia uma concentração de gás carbônico (CO₂) para o funcionamento da RUBISCO ao mesmo tempo que reduz a transpiração durante o dia, já que os estômatos se abrem, preferencialmente ou totalmente, apenas no período noturno quando as temperaturas são menores e a umidade do ar mais elevada (MATIZ et al., 2013). Em condições de déficit hídrico, as plantas CAM podem incrementar as atividades das enzimas fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) e da malato desidrogenase (MDH), que são enzimas chaves no processo inicial de assimilação do CO₂ em esqueleto carbônico, formando ácidos orgânicos que são estocados no vacúolo (BORLAND et al., 2011).

Em resposta às adversidades ambientais, como, por exemplo, os déficits hídrico e/ou nutricional, é descrito acontecer um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que, dependendo da concentração alcançada, pode gerar danos oxidativos (GILL; TUTEJA, 2010). Entretanto, as ROS também podem estar envolvidas com processos de sinalização celular. De acordo com Slesak e Miszalski (2003), foi encontrado um aumento de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na transição entre os metabolismos C_3 para o CAM para *Mesembryanthemum crystallinum* (uma planta também considerada C_3 -CAM facultativa da família Aizoaceae) cultivada em condição de excesso de luz. Possivelmente, de acordo com os autores, o H_2O_2 pode atuar como um sinal importante nessa mudança de padrão da fotossíntese, já que a meia-vida dessa ROS é maior que de outras ROS mais reativas.

Plantas de *Rosularia elymaitica*, uma crassulácea também C_3 -CAM facultativa, ao serem submetidas ao déficit hídrico, aumentaram significativamente o metabolismo antioxidante quando em condições de estresse, sendo as atividades das enzimas dismutase do superóxido (SOD) e peroxidase de ascorbato (APX) as mais modificadas positivamente, possivelmente protegendo essas plantas de uma condição danosa aos tecidos (HABIBI; HAJIBOLAND, 2011). Os autores Da costa et al. (2005), ao comparar dois genótipos de *Sorghum bicolor*, um deles tolerante (CSF20) e outro sensível (CSF18) ao estresse osmótico causado por salinidade, observaram uma redução na enzima guaiacol peroxidase (GPOX) em plantas sensíveis e um aumento nas tolerantes. A enzima GPOX geralmente está associada a condições adversas que os vegetais ficam expostos, e assim como outras enzimas antioxidantes, decompõe o H_2O_2 formado nas células vegetais (MEHLA et al., 2017). O sistema antioxidantes enzimático atuam em diversos compartimentos celulares, de maneira geral, metabolizando espécies reativas de oxigênio que possuem um elétron desemparelhado (radical livre) até uma espécie de menor reatividade como o H_2O_2 ou até a água – ver esquema abaixo; Fig.1 - (BUCHANAN; GRUISSSEN; JONES, 2015).

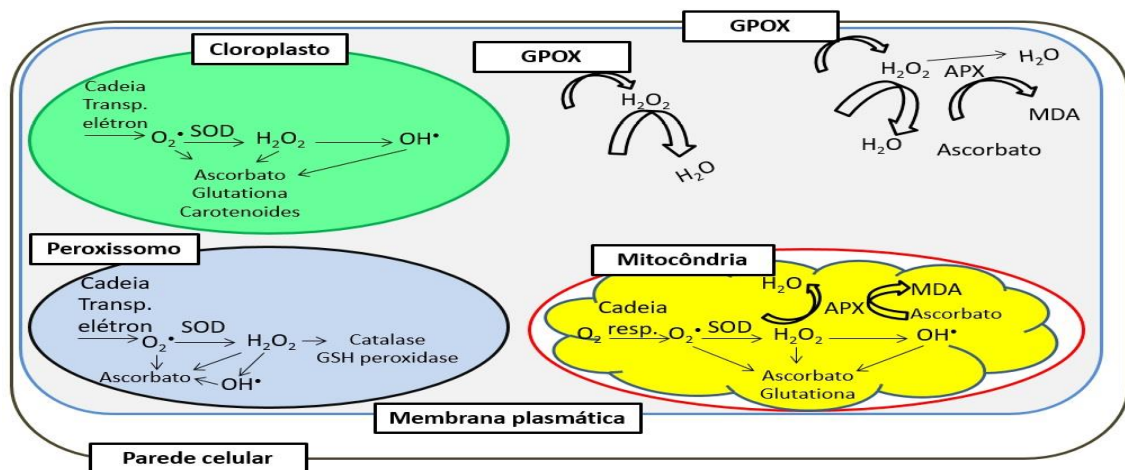


Figura 1: Esquema representativo do sistema antioxidante presente nas células vegetais e respectivos compartimentos. $O_2^{\bullet-}$ radical superóxido; SOD superóxido dismutase; H_2O_2 peróxido de hidrogênio; APX ascorbato peroxidase; MDA monodehidroascorbato; OH^{\bullet} radical hidroxila; GPOX guaiacol peroxidase; GSH glutationa peroxidase; H_2O água. Figura modificada a partir de JAJIC et al., 2015 e DAS et al., 2015.

Borland; Maxwell e Griffiths (2006) ressaltaram a importância de demonstrar o envolvimento das espécies reativas de oxigênio e das enzimas antioxidantes com o CAM. Porém esse campo de pesquisa com ROS ainda há muitas divergências, sendo um ponto polêmico entre vários autores. Os primeiros estudos com as espécies reativas de oxigênio focavam principalmente na capacidade das ROS causarem danos oxidativos, sendo consideradas prejudiciais aos tecidos vivos (BUCHANAN; GRUISSSEN; JONES, 2015). Mas, ao longo do tempo, os estudos demonstraram que as ROS, em especial aquelas que apresentam maior tempo de permanência nos tecidos, podem atuar como sinalizadoras de variações ambientais e de possíveis situações causadoras de estresse aos tecidos vivos (BUCHANAN; GRUISSSEN; JONES, 2015; DAS et al., 2015). O radical hidroxila, que é dito como uma das ROS mais danosas, reagindo com proteínas, lipídeos, DNA, carboidratos e outras moléculas, possui uma vida-média de 1 nanossegundo (ns), enquanto que o peróxido de hidrogênio, que é uma espécie reativa de oxigênio, mas não um radical livre, apresenta vida-média de 1 milissegundo (ms), raramente causando danos em proteínas e lipídeos (MOLLER; JENSEN; HANSSON, 2007). Em concentrações baixas nas células e tecidos, o peróxido de hidrogênio pode atuar como sinalizador da senescência foliar (PENG et al, 2005), da fotorespiração e fotossíntese (NOCTOR et al., 2002), do ciclo celular, do crescimento e desenvolvimento (TANOU; MOLASSIOTIS; DIAMANTIDIS, 2009) e está envolvido na indução a genes relacionados com condições estressantes para o vegetal (GILL; TUTEJA, 2010). Carvalho et al. (2017) relatam para as plantas

atmosféricas da bromélia *G. monostachia* cultivadas em casa de vegetação, que o sistema antioxidante da APX e CAT para lidar com o H₂O₂ pode ser sinalizador no processo de reidratação das plantas que estavam em déficit hídrico.

De acordo com Hessini et al. (2013), as plantas da espécie *Spartina alterniflora*, (Poaceae) que cresceram em amônio, ao serem submetidas a uma condição de excesso salino, apresentaram um melhor crescimento quando comparado ao cultivo em nitrato. Além disso, as plantas cultivadas em amônio apresentaram maiores atividade das enzimas SOD, APX e catalase (CAT) e menores teores de H₂O₂. Os maiores níveis de enzimas antioxidantes poderiam proteger o funcionamento de enzimas como PEPC de possíveis danos causados pelas ROS. Esses autores ressaltam que ainda são necessários mais estudos que correlacionem o déficit hídrico e a exposição a determinados nutrientes, como as fontes nitrogenadas. Quando plantas atmosféricas de *G. monostachia* foram cultivadas em condição ex vitro e apresentavam indução mais intensa do CAM por causa da imposição de um déficit hídrico, houve reduções nas atividades das enzimas antioxidantes de SOD, CAT e APX, enquanto a atividade da enzima glutathione redutase (GR) aumentou com relação ao controle (CARVALHO et al., 2017). Essa redução das atividades enzimáticas é discutida como uma resposta ao aumento da intensidade do CAM que proporcionaria uma remobilização de elétrons para a fotossíntese, reduzindo as ROS e, conseqüentemente, a atividade das enzimas antioxidantes.

Folhas destacadas de plantas adultas de *Guzmania monostachia* submetidas a um déficit hídrico e cultivadas na presença de diferentes fontes nitrogenadas, mostraram diferentes intensidades de CAM no ápice foliar (RODRIGUES et al., 2014). Isto é, folhas que receberam a concentração de 5 mM de amônio junto com polietilenoglicol 6000 (PEG) 30% foram favorecidas na expressão do CAM com relação às folhas cultivadas em nitrato. Houve também maiores atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT, APX e GR na condição amoniacal, sugerindo que nessa condição nitrogenada propicia uma maior capacidade dos tecidos foliares apicais em lidar com possíveis danos oxidativos (PEREIRA, 2016). Entretanto, pouco se conhece sobre o grau de intensidade do CAM em diferentes fontes nitrogenadas para plantas atmosféricas de *G. monostachia*. Imagina-se, com base nos resultados obtidos com as folhas de plantas adultas que o amônio pode conferir maior tolerância ao déficit hídrico, induzindo maior intensidade do CAM. Ainda, essa maior tolerância à seca poderia estar

relacionada com uma maior proteção dos tecidos oferecida pelo conjunto de enzimas antioxidantes, além do aumento do grau de CAM, em plantas cultivadas em amônio. Mas, como já observado no capítulo 1, as plantas atmosféricas apresentaram um melhor crescimento e desenvolvimento na condição nítrica, diferente de outras bromélias que mostraram melhor crescimento em na amoniacal, como, por exemplo, as plantas da espécie *Vriesea gigantea*.

A importância da fertilização, aliado ao nível de fotossíntese com determinados tipos de fontes nitrogenadas, é ainda pouco conhecida até mesmo para espécies agriculturáveis, apesar da alta relevância desse assunto. Outro campo pouco abordado na literatura refere-se à relação das diferentes fontes nitrogenadas com o CAM e/ou com o metabolismo antioxidante. Assim, no presente estudo propôs-se analisar os efeitos do cultivo de plantas atmosféricas in vitro em diferentes fontes de nitrogênio sobre a capacidade dessas plantas resistirem ao déficit hídrico. Isso foi avaliado por meio das medidas de intensidade do CAM e da produção de ROS associada com o aparecimento de enzimas antioxidantes.

Material e métodos

Obtenção do material vegetal e cultivo em diferentes fontes de N

Utilizaram-se plantas atmosféricas de *Guzmania monostachia* (L.) Rusby ex. Mez. cultivadas in vitro com aproximadamente dois centímetros de altura. Essas plantas cresceram em meio de cultura composto por macronutrientes da formulação de Knudson (1946), modificado quanto à concentração de N, sendo essa reduzida a ¼ do teor original. Em seguida, elas foram transferidas para o mesmo tipo de meio, no entanto, retiraram-se as fontes de N e, após um período de 7 dias sob restrição total de N, as plantas permaneceram por 3 meses em meio Knudson (1946) modificado quanto às formas de N oferecidas isoladamente. Isto é, diferentes sais nitrogenados foram acrescentados como fontes únicas de N: nitrato, amônio glutamina ou ureia (tratamentos nitrogenados). Cada fonte nitrogenada foi ajustada para ter uma concentração de 5 mM de N total, sendo adicionado ainda 1 µM de cloreto de níquel em todos os tratamentos. O meio de Knudson modificado foi ainda adicionado de micronutrientes da formulação descrita por Murashige e Skoog (1962), 0,5 g/L de carbonato de cálcio e 2 g/L de phytigel.

Tratamento com deficiência hídrica

As plantas cultivadas nas diferentes fontes nitrogenadas foram divididas em dois grupos: as do controle (sem PEG) e as que compuseram o tratamento de deficiência hídrica por um período de 7 dias. A formulação nitrogenada básica em que as plantas permaneceram por três meses (citada anteriormente), foi mantida, entretanto o grupo de plantas que enfrentou o déficit hídrico teve a adição de polietilenoglicol (PEG 6000) a 15 % ao meio de cultura gelificado com 6 g/L de phytigel, gerando um potencial osmótico de -1,9 Mpa. Os frascos de vidro utilizados para o cultivo das plantas ao longo de todo o experimental foram os com tampas, contendo uma rolha central que permitiu maior troca gasosa com o ambiente externo. Todos os frascos permaneceram nas prateleiras da sala de cultivo com 12 horas de luz com intensidade de aproximadamente $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e umidade de $50\% \pm 2 \%$.

Suculência foliar

A suculência foliar foi realizada como descrita por Kluge e Ting (1978), levando em consideração as medidas das massas fresca (MF) e seca (MS) das folhas e também o teor de clorofilas totais das plantas nas diferentes fontes nitrogenadas. Calculou-se para triplicatas de acordo com a fórmula:

$$\text{Suculência} = (\text{MF} - \text{MS}) / (\text{chl total} = \text{mg}^{-1}\text{MF})$$

Atividade da enzima PEPC

A determinação da atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) foi fundamentada no método de Nievola et al. (2005) e ajustado para *G. monostachia* de acordo com Freschi et al. (2010b). A coleta das folhas foi realizada uma hora após o acendimento das luzes da câmara de crescimento. As amostras foliares de aproximadamente sete plantas (500 mg) foram armazenadas em nitrogênio líquido e no momento da análise, procedeu-se à trituração com N líquido. Utilizou-se triplicata, contendo cada uma 500 mg desse material vegetal e homogeneizada em 2,5 ml de tampão de extração (pH 8,0), contendo 200 mM de *tris(hidroximetil)aminometano cloridrato* (Tris-HCl), 10 mM cloreto de magnésio (MgCl_2), 5 mM de ditioneitol (DTT), 1 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 0,5 % (m/v) albumina bovina (BSA) e 10 % (v/v) de glicerol. As amostras no tampão de extração passaram

por centrifugação a 15.000 rpm por 2 minutos a 4 °C. A partir do sobrenadante resultante, foram coletadas alíquotas e utilizadas no ensaio enzimático. A atividade da PEPC foi realizada a partir de 400 µl de extrato adicionado a microtubos, mantidos a temperatura de 30 °C, contendo como meio de reação 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 100 mM bicarbonato de sódio (NaHCO₃), 20 mM nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NADH) e 3 mM fosfoenolpiruvato (PEP). O ensaio foi mensurado com base no consumo de NADH e quantificado em espectrofotômetro (340 nm) em um intervalo de 0 a 4 minutos.

Quantificação do acúmulo de acidez noturna

Utilizou-se 0,1 g de folhas (MF) de *Guzmania monostachia* trituradas em nitrogênio líquido, para cada uma das triplicatas de cada tratamento. Coletaram-se as amostras uma hora após o acendimento da luz da câmara de crescimento e uma hora antes do início do período de escuro. As amostras foram extraídas com uma solução de MCW- metanol, clorofórmio e água - na proporção de 12:5:1. Utilizou-se ainda o ácido benzoico¹³C (1mg/ml) como padrão interno. As amostras permaneceram em banho-maria a 60 °C por 30 minutos. Posteriormente, adicionaram-se 500 µL de água ultrapurificada e centrifugou-se o material a 13.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a derivatização.

Na derivatização para realizar a quantificação dos ácidos orgânicos (malato e citrato), utilizaram-se 100 µL do extrato. Esse foi seco totalmente a 60 °C após 150 minutos em um concentrador de amostras (modelo Centri-Vap); em seguida acrescentaram-se 25 µl de piridina e 25 µl do *N-tert-butyltrimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide* (MTBSTFA) e incubou-se o material durante uma hora a 90 °C. Após o tempo de incubação, as amostras esfriaram por 15 minutos e foram injetadas num cromatógrafo a gás acoplado a um detector de massas (GC-MS, da sigla em inglês). A rampa de temperatura foi de 100 a 300 °C, a 6 °C por minuto e mantido a 300 °C por mais 10 minutos. O teor de ácidos orgânicos foi determinado por meio da diferença entre o conteúdo de malato e citrato obtido no primeiro horário (1 hora após o acendimento das luzes) e o respectivo conteúdo de malato e citrato obtido no segundo horário (Δ ácido málico e o Δ ácido cítrico) e calculado com base na curva de malato e citrato construídas previamente (0 a 12 µg/ml). O conteúdo total de ácidos orgânicos foi realizado por meio da soma dos deltas de malato e citrato.

Quantificação do peróxido de hidrogênio

Para a determinação do teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) utilizou-se o método descrito por Junglee et al. (2014) com algumas modificações. A partir de 100 mg de material fresco triturado em 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) 0,1%, centrifugou-se por 13000 rpm por 30 minutos a 4 °C. Do sobrenadante usaram-se 100 µl colocados em microtubos contendo 150 µl de TCA 0,1 %, 250 µl de fosfato de potássio (KH₂PO₄) 10 mM (pH 7,0) e 500 µl de iodeto de potássio (KI) a 1M. A reação foi mantida no escuro por 10 minutos e lida em espectrofotômetro a 350 nm. Utilizou-se ainda a curva de calibração com concentrações conhecidas de H₂O₂ (0 a 0,4 µmol/ml).

Determinações das atividades de enzimas antioxidantes

Extração

Para determinação das atividades enzimáticas antioxidantes utilizaram-se 200 mg de folhas (MF) de *G. monostachia* coletadas uma hora após ascender as luzes. O material vegetal foi, então, triturado com 2 ml de tampão de extração, com adição de 0,02 g de PVPP. O tampão de extração continha KH₂PO₄ 1M (pH 7,5), EDTA 1mM (pH 7,5), cloreto de sódio (NaCl) 50 mM e ácido ascórbico 1mM (pH 7,5) (SOUZA; BLANDE; HOLOPAINEN, 2013). Os tubos foram mantidos em gelo e centrifugados a 13 000 rpm por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e mantido em gelo até a retirada das alíquotas para realização dos ensaios enzimáticos e dosagem de proteínas (BRADFORD, 1976).

Superóxido dismutase - SOD

A quantificação da atividade da SOD seguiu o método de Beauchamp e Fridovich (1971), com modificações feitas por Balen et al. (2009). Utilizaram-se 40 µl de extrato em tubos mantidos no escuro que receberam 960 µl da solução de reação. Essa solução de reação continha, KH₂PO₄ 50 mM (pH 7,8), metionina 13 mM, nitroazul de tetrazólio (NBT) 0,075 mM, EDTA 0.1 mM e riboflavina a 0,002 mM. Após 5 minutos de exposição à luz com lâmpada fluorescente de 50 Watt (Phillips®), as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 560 nm. Os resultados foram expressos como unidade de atividade, visto que uma unidade de SOD é definida como a

quantidade de enzima necessária para inibir 50 % por minuto da fotoredução do NTB em condições de ensaio.

Catalase - CAT

A quantificação da atividade da CAT baseou-se no método descrito por Luck (1974) adaptado. Utilizaram-se 100 μl de extrato vegetal e 900 μl de solução de reação. A composição do sistema de reação foi de KH_2PO_4 100 mM (pH 7,5) e H_2O_2 15 mM. As absorvâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro a 240 nm e a atividade da catalase foi calculada de acordo com o coeficiente de extinção $0,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Ascorbato peroxidase - APX

A quantificação da atividade da APX seguiu as informações descritas por Nakano e Asada (1981), modificado de acordo com Weng et al. (2007). Utilizaram-se 40 μl de extrato vegetal, mantendo as amostras no gelo e na penumbra. O extrato vegetal foi adicionado em microtubos que continham 960 μl do sistema de reação. Esse sistema de reação foi composto de KH_2PO_4 100 mM (pH 7,0), EDTA 0,1 mM, ácido ascórbico 0,5 mM e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 0,2 mM. A absorvância das amostras foi quantificada em 290 nm a cada 15 segundos por 2 minutos. Atividade da APX foi calculada de acordo com o coeficiente de extinção $2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Guaiacol peroxidase – GPOX

A atividade da GPOX foi determinada de acordo com o método descrito por Urbanek; Kuzniak-Gebarowska; HERKA, (2003). Utilizaram-se de 50 μl de extrato vegetal em uma mistura que continha KH_2PO_4 100 mM (pH 7,0), 0,1 μM de EDTA, 5,0 mM de guaiacol e 15,0 mM de H_2O_2 em um volume total de 2,0 ml. As leituras das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro a 470 nm a cada 15 segundos por 3 minutos. A diferença de absorvâncias foi dividida pelo coeficiente de extinção molar do tetraguaiacol (forma oxidada do guaiacol) que é $26,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e a atividade enzimática foi expressa em $\mu\text{M H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína (PLEWA et al., 1991).

Glutathione redutase – GR

A determinação da atividade da GR baseou-se em Schaedle e Bassham (1977). Utilizaram-se 100 μl de extrato e 900 μl de sistema de reação, permanecendo no gelo e

na penumbra. O sistema de reação era composto por: Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) 0,15 mM, glutationa oxidada (GSSG) e 0,5 mM, MgCl₂ 3 mM. A reação foi quantificada em espectrofotômetro a 340 nm em intervalos de 15 segundos durante 2 minutos. Calculou-se a atividade da GR por meio do coeficiente de extinção 6,2 mM⁻¹cm⁻¹.

Determinação de proteínas solúveis totais

A quantificação de proteínas solúveis totais foi baseada no método de Bradford (1976), com modificações de acordo com Dissanayake et al., (2013). Mensurou-se o teor proteico, utilizando 50 µl de extrato vegetal proveniente da extração realizada para quantificação das atividades enzimáticas descritas acima. Foram adicionados, então, 250 µl de reagente de Bradford em placas de ELISA, permanecendo, em seguida, em mesa agitadora 3 000 rpm por 5 minutos. Após a agitação, fez-se a leitura a 595 nm em espectrofotômetro compacto de microplacas - Epoch. Por meio da curva padrão, preparada com concentrações de 0 a 100 µg.mL⁻¹ de soro albumina bovina (BSA), foi quantificada a quantidade de proteínas no extrato e utilizada como fator de correção para as atividades enzimáticas antioxidantes.

Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada por meio do teste one-way ANOVA. A comparação dos efeitos globais dos tratamentos foi realizada por análise multivariada de permutação (PERMANOVA), com o uso do pacote funcional do programa R Estatística (Oksanen *et al.* 2013). Empregou-se ainda outros pacotes da plataforma R (R Core Team 2014).

Resultados

A suculência foliar foi reduzida quando as plantas foram submetidas ao déficit hídrico, independentemente da fonte nitrogenada que as bromélias cresceram previamente. Entretanto, as plantas cultivadas em nitrato tiveram maior média de suculência foliar em relação às demais fontes, seguida por glutamina, já o cultivo em ureia resultou no menor valor médio de suculência menor média. (Fig. 1). A atividade da enzima PEPC nas plantas atmosféricas de *G. monostachia* aumentou consideravelmente em plantas previamente cultivadas em ureia e glutamina quando

essas passaram pela condição de déficit hídrico com relação às plantas-controle. Quando se compara as fontes nitrogenadas entre si, observa-se que a maior atividade enzimática ocorreu nas plantas crescidas com ureia, praticamente dobrando o valor em relação ao obtido em nitrato (Fig. 2A).

Quando se quantificou o acúmulo noturno de ácidos orgânicos notou-se que o ácido málico foi estocado preferencialmente. No entanto, detectou-se uma certa quantidade de ácido cítrico produzido no tratamento com déficit hídrico em plantas cultivadas com NO_3^- . Por esse motivo, calculou-se a somatória entre os conteúdos dos ácidos málico e cítrico nesta pesquisa. O maior conteúdo de ácidos orgânicos foi visto ocorrer no tratamento de déficit hídrico quando as plantas foram cultivadas previamente em nitrato. Esse valor foi mais que o dobro do acúmulo de ácidos orgânicos obtidos em glutamina (Fig. 2B; Tabela 1).

O pré- cultivo em diferentes fontes nitrogenadas não afetou significativamente o conteúdo de H_2O_2 nas plantas tratadas quando comparado aos respectivos controles, com exceção da fonte nítrica. Houve um aumento significativo de cerca de 25% no conteúdo de H_2O_2 após o tratamento com PEG nessa fonte nitrogenada. Na comparação da condição de déficit hídrico entre as diferentes fontes de N não houve variações significativas (Fig. 3).

Com relação às enzimas antioxidantes, observou-se uma redução na atividade da superóxido dismutase, independentemente do pré-tratamento nitrogenado, quando as plantas foram submetidas ao déficit hídrico. Dentre as plantas-controle, aquelas que passaram pelo cultivo em glutamina apresentaram maior atividade enzimática comparativamente às fontes nitrato e ureia. As plantas crescidas previamente em ureia e nitrato apresentaram maior atividade enzimática, após a imposição da deficiência hídrica em ureia e nitrato e menores em amônio e glutamina (Fig. 4A).

As maiores atividades da catalase foram observadas nas plantas-controle que foram cultivadas em glutamina ou ureia. Pode-se perceber ainda que ocorreu uma forte redução dessa atividade quando as plantas cultivadas na presença de glutamina foram submetidas ao déficit hídrico. Ao comparar as plantas do tratamento que foram cultivadas nas diferentes condições nitrogenadas, não se observou diferenças consideráveis (Fig. 4 B).

As atividades das enzimas ascorbato peroxidase e guaiacol peroxidase não apresentaram diferenças quando as plantas cresceram previamente nas diferentes condições nitrogenadas e foram submetidas ao déficit hídrico e nem houve variação entre plantas-controle e as do tratamento, independentemente do cultivo em diferentes fontes de N. (Fig. 4C; 4D).

A atividade da glutathiona redutase em plantas crescidas previamente em nitrato ou gln, e submetidas ao déficit hídrico, diminuiu significativamente em relação ao controle. Entre as plantas do tratamento, NH_4^+ e ureia propiciaram as maiores atividades comparativamente às outras fontes. (Fig. 4E).

Discussão

Na presente pesquisa quando as plantas atmosféricas de *G. monostachia* foram submetidas ao déficit hídrico, observou-se um aumento no conteúdo de ácidos orgânicos, independente da forma nitrogenada recebida anteriormente por essas plantas. Conteúdos maiores de acúmulos de ácidos orgânicos, também foram encontrados por outros autores quando plantas de *G. monostachia* atmosféricas cultivadas ex vitro sofreram restrição hídrica (BELTRÁN et al., 2013; HAMACHI, 2013; CARVALHO et al., 2017). No entanto, nosso trabalho demonstra pela primeira vez que dependendo do cultivo prévio em fontes de N distintas, o grau de intensidade do CAM pode variar. Notou-se que o nitrato intensificou significativamente o acúmulo noturno de ácidos orgânicos (ácidos málico + cítrico), comparativamente às plantas-controle. O grau de acidez é considerado um dos melhores parâmetros para se confirmar a existência desse metabolismo nas plantas (OSMOND, 1978).

O teor de ácidos orgânicos em plantas atmosféricas da espécie *G. monostachia* foi quatro vezes maior que o teor de ácidos orgânicos para a mesma espécie, porém na fase adulta (CARVALHO et al., 2017; ABREU; CARVALHO; MERCIER, 2017). Quando se comparou os resultados do conteúdo de ácidos orgânicos em plantas atmosféricas da espécie *G. monostachia* cultivadas in vitro nas fontes nitrogenadas e sob déficit hídrico com plantas tanque, observa-se que as plantas tanque possuem cinco vezes mais ácidos na região apical das folhas submetida ao déficit hídrico por suspensão de rega, que a plantas in vitro em déficit hídrico (PEG) na condição prévia de nitrato. O conteúdo de ácidos orgânicos em plantas atmosféricas de *G. monostachia* sob déficit

hídrico realizado por suspensão de rega, na condição *ex vitro* é 20 vezes maior que na condição déficit hídrico (PEG) *in vitro*. Porém ressalta-se que os experimentos *ex vitro* tanto utilizando plantas atmosféricas quanto plantas tanque feitos por Carvalho et al. (2016) e Abreu, Carvalho e Mercier (2017), respectivamente, não receberam nenhuma fonte nitrogenada previamente ou durante a imposição da seca.

De acordo com Rodrigues et al. (2014) e Pereira (2016), folhas destacadas de plantas adultas da espécie *G. monostachia*, provenientes de um cultivo na presença de amônio com 5mM de nitrogênio total e submetidas ao estresse hídrico por meio do PEG (6000) 30%, houve intensificação do CAM nessa condição nitrogenada. Pereira (2016) observou que em plantas adultas o amônio intensificou a produção de açúcares solúveis, otimizou o transporte de prótons de membrana, aumentou a expressão do gene ALMT9 o qual está relacionado com o transporte de malato nas membranas dos vacúolos. Ao contrário, do resultado positivo obtido com amônio descrito acima para as plantas adultas, as atmosféricas cultivadas *in vitro* e submetidas ao déficit hídrico com PEG (6000) 15%, houve maior intensificação do CAM na presença de nitrato. Plantas terrícolas das espécies *Kalanchoë laxiflora* e *Kalanchoë tubiflora* (Crassulaceae) em condição de deficiência hídrica na presença de 2,5 mM de nitrato tiveram intensificação do CAM (PEREIRA; SMITH; MERCIER, 2017). Portanto, as plantas atmosféricas de *G. monostachia* se assemelharam mais ao comportamento das plantas de hábito terrícola do que das plantas de *G. monostachia* na forma adulta com tanque.

De modo interessante e intrigante, não foram observados aumentos da atividade da PEPC nas plantas crescidas nas fontes inorgânicas, como o nitrato, mas somente nas orgânicas em condição de déficit hídrico. Esperava-se maior atividade na presença de nitrato, já que se quantificou uma maior acidez noturna na presença desta fonte. Porém, de acordo com O'Leary, Park e Plaxton (2011), a PEPC também possui funções não-fotossintéticas, por exemplo, esta enzima pode desempenhar papéis, como o reabastecimento de esqueletos carbônicos ao ciclo de ácidos tricarbônicos (Ciclo de Krebs). Esses compostos de reabastecimento são intermediários, consumidos durante a biossíntese e assimilação de nitrogênio. Provavelmente, a maior atividade da enzima PEPC nas fontes nitrogenadas orgânicas (ureia ou glutamina) seja devido ao fato da versatilidade da enzima PEPC em participar de outras funções celulares, que não apenas relacionadas à fotossíntese.

Diferentemente das outras fontes de N, o nitrato foi a que propiciou o acúmulo noturno de ácido cítrico nas plantas atmosféricas de *G. monostachia* em condição de déficit hídrico. O acúmulo de citrato para as plantas de *Clusia* (Clusiaceae) pode ter efeitos benéficos para essas plantas que necessitam enfrentar uma condição estressante na natureza, já que habitam em regiões de restinga, com alta salinidade. A assimilação do ácido cítrico, e posterior descarboxilação produz 3 mols de CO₂, enquanto que a descarboxilação de 1 mol de ácido málico produz apenas 1 mol de CO₂ (LÜTTGE, 1989; FRANCO; BALL; LÜTTGE, 1992; LÜTTGE, 2006). De acordo com Freschi et al. (2010b) houve um aumento no conteúdo de citrato quando as bromélias atmosféricas da espécie *Tillandsia pohliana* (Bromeliaceae) foram submetidas ao déficit hídrico. Esses autores sugeriram que o citrato durante o dia promoveria um aumento no CO₂ interno durante a sua descarboxilação e durante a noite na sua biossíntese promoveria a produção de poder redutor como o NADH e ATP, para assimilação noturna de nitrato, representando uma ligação chave do metabolismo nitrogenado e do metabolismo fotossintético.

Com base nos resultados anatômicos obtidos no capítulo 1 desta dissertação, (Fig. 6; 8) pode-se relacionar a maior espessura dos tecidos aquíferos em plantas crescidas em nitrato com o maior acúmulo de malato, ou seja, uma possibilidade de haver um CAM mais intenso. A maior espessura desses tecidos, e possivelmente das células, conferiria maiores vacúolos e/ou maior espaço citosólico e maior possibilidade de estocar e descarboxilar ácidos orgânicos. Entretanto houve também em segundo lugar um CAM mais intenso (se tomar como parâmetro a acidez noturna) em plantas previamente cultivadas em ureia, que apesar de menores espessuras dos tecidos, observou-se qualitativamente maior quantidade de células, o que pode ter proporcionado um estoque semelhante de ácidos, comparativamente às plantas com maiores células. Resultados anatômicos obtidos por Zambrano et al. (2014) para as espécies *Clusia rosea* (CAM) e *Clusia aripoensis* (C₃-CAM facultativa), mostraram que plantas de *C. rosea* apresentam tecidos com maior número de células pequenas, enquanto a *C. aripoensis* mostrou menor número de células maiores, principalmente no parênquima aquífero. As bromélias e cactáceas são plantas xerófitas, apresentando uma espessura foliar que propicia o acúmulo de água (suculência) com células com grandes vacúolos (APPEZZAO DA GLÓRIA; GUERREIRO, 2012). A água nos tecidos das bromélias CAM possui importância nos momentos de seca na natureza,

visto que as plantas realocam a água armazenada nos tecidos de parênquimas aquíferos para o parênquima clorofiliano, mantendo assim a fotossíntese, sem ocorrerem comprometimentos dos aparatos fotossintéticos (BARRERA; SMITH, 2009). Nesse sentido, a maior suculência obtida no tratamento com nitrato, mesmo após a imposição dos 7 dias de deficiência hídrica, parece ter sido uma condição muito importante para o desenvolvimento de um grau mais elevado de CAM.

O conteúdo de peróxido de hidrogênio aumentou significativamente em plantas atmosféricas de *G. monostachia* que permaneceram previamente em nitrato e foram submetidas ao período de déficit hídrico. Isso pode ser um indicativo de que o H_2O_2 possa estar atuando como um componente de sinalização celular, modulando a intensidade do CAM. Pesquisas recentes demonstraram que a sinalização de H_2O_2 é integrado com a atividade e intensidade do CAM em resposta a condições estressantes, para manutenção da homeostase celular (HABIBI, 2014). Além de sinalizar em condições de estresse, como por exemplo, estresse salino, estresse por gases como o ozônio e estresse luminoso, o H_2O_2 também é dito como um doador de elétrons para o funcionamento do fotossistema II. Como o peróxido de hidrogênio pode ser formado por meio da SOD, nossos resultados parecem indicar que isso é pouco provável ter ocorrido nas plantas atmosféricas aqui estudadas, já que houve um aumento em peróxido, em contraponto à atividade da enzima SOD que diminuiu sob déficit hídrico. Entretanto, ainda deve-se tomar cuidado, com inferências relacionadas à produção de H_2O_2 por meio da SOD, pois a enzima SOD possui isoformas que podem atuar em cada uma das localidades celulares, e essas isoformas não necessariamente são verificadas no método colorimétrico (GILL; TUTEJA, 2010).

Em todas as condições nitrogenadas em que as plantas cresceram e após a imposição do déficit hídrico, obteve-se uma redução na atividade da SOD, em comparação com plantas na mesma condição nitrogenada no controle. Essa redução também foi observada por Carvalho et al. (2017) quando as plantas de *G. monostachia* atmosféricas em condição ex vitro foram submetidas ao déficit hídrico em comparação as plantas no controle. Sugere-se que a descarboxilação do malato, aumente a disponibilidade de CO_2 interno, aumentando a carboxilação da Rubisco, assim gerando um consumo de NADPH e ATP. Conseqüentemente aumentaria a disponibilidade de $NADP^+$ que é o principal aceptor de elétrons e reduziria a formação de espécies reativas

de oxigênio, e conseqüentemente, diminuindo a atividade de enzimas antioxidantes (PIKART, 2014).

Ao contrário das plantas atmosféricas, plantas adultas de *G. monostachia* quando submetidas à suspensão de rega no tanque por 7 dias apresentaram teores de peroxidação lipídica (análise indireta da ação de ROS) e H₂O₂ no ápice foliar durante a fase clara, que parecem ter causado um certo grau de injúria permanente nessa porção (ABREU; CARVALHO; MERCIER, 2017). Esses autores discutem que, apesar do CAM ser mais intenso na porção apical, ele não foi suficiente para eliminar as ROS formadas durante o estresse hídrico.

Por meio dos nossos resultados pôde – se concluir que as plantas atmosféricas de *Guzmania monostachia* as quais cresceram e se desenvolveram na presença de nitrato e que posteriormente foram submetidas à deficiência hídrica apresentam maior suculência e intensidade do CAM, sugerindo que possam tolerar melhor o estresse hídrico do que as plantas cultivadas em outras formas de N. A quantidade de ácidos orgânicos estocada foi maior em nitrato e em particular o ácido cítrico foi aumentada significativamente nesse tratamento. Quanto à produção de ROS, possivelmente o peróxido de hidrogênio, encontrado em maior concentração nas plantas cultivadas em nitrato, comparativamente ao controle, esteja atuando como um sinalizador para a expressão do CAM, ao invés de ser considerada uma espécie reativa de oxigênio danosa aos tecidos, já que as atividades das enzimas antioxidantes foram menores que no controle (SOD e GR) ou iguais estatisticamente (CAT, APX, GPOX).

Ao contrário de trabalhos anteriores do grupo que mostraram que as plantas adultas de *G. monostachia* intensificaram o CAM na presença de amônio, os nossos resultados com plantas atmosféricas de *G. monostachia* quando foram cultivadas in vitro, ocorreu maior intensificação do CAM em nitrato. Indicando que plantas de diferentes fases de desenvolvimento, além de possuírem características morfológicas diferentes, também possuem comportamentos fisiológicos diferentes.

Propostas futuras podem ainda explorar os conteúdos hormonais, como as concentrações de auxinas e citocininas, em folhas de plantas nas diferentes fontes nitrogenadas. Esses dados poderiam fornecer informações sobre a suculência tecidual, e, conseqüentemente, sobre a capacidade de estocagem de água em cada condição

nitrogenada, já que estes hormônios estão intimamente ligados ao processo de divisão e expansão celular. Para analisar o crescimento das plantas seria interessante realizar análises anatômicas das plantas submetidas a diferentes fontes e à condição de deficiência hídrica. Dessa maneira, poderiam ser observadas se ocorrem modificações estruturais em uma condição de déficit hídrico. Seria também importante analisar o perfil de expressão gênica relacionadas com a enzima fosfoenolpiruvato carboxilase – PEPC (isoforma específica do CAM), já que a atividade dessa enzima não mostrou correlação com os graus de intensidade de CAM encontrados nas diferentes fontes de N.

Referências bibliográficas

- ABREU, M. E.; CARVALHO, V.; MERCIER, H. ROS content and antioxidant capacity in a tank-forming bromeliad exposed to water deficit is related to the light incidence and CAM expression gradients found along the leaf blade. **Functional Plant Biology**, 2017.
- APPEZZAO DA GLÓRIA, B. A.; GUERREIRO, S. M. C. **Anatomia vegetal**. 3 ed. UFV, viçosa, 2012.
- BARRERA, E. D. L.; SMITH, W. K. Perspectives in Biophysical Plant Ecophysiology. Universidad Nacional Autónoma de México, p. 95-121, 2009.
- BALEN, B, et al. Growth conditions in in vitro culture can induce oxidative stress in *Mammillaria gracilis* tissues. **Plant Growth Regulation**. v.28, p.36-45, 2009.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.44, p.276-287, 1971.
- BELTRÁN, J. et al. Juvenile tank-bromeliads lacking tanks: do they engage in CAM photosynthesis? **Photosynthetica**, v.51, n.1, p. 55-62, 2013.
- BENZING, D. H. Basic structure, function, ecology and evolution. In: BENZING, D. H. (Org.) **Bromeliaceae**: profile of an adaptive radiation. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.
- BORLAND, A. M. et al. The photosynthetic plasticity of crassulacean acid metabolism: an evolutionary innovation for sustainable productivity in changing world. **New Phytologist**, p. 1-14, 2011.
- BORLAND, A. M.; MAXWELL, K.; GRIFFITHS, H. Ecophysiology of plants with crassulacean acid metabolism. In: LEEGOOD, R. C.; SHARKEY, T. D.; VON CAEMMERER, S. (Eds.). **Photosynthesis**: physiology and metabolism. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2006.

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v.72, n.1-2, p.248-254, 1976.
- BUCHANAN, B.B; GRUISSSEN, W; JONES, R.L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. 2. ed. American Society of Plants Biologists, 2015.
- CARVALHO, V. et al. Adjustments in CAM and enzymatic scavenging of H₂O₂ in juvenile plants of the epiphytic bromeliad *Guzmania monostachia* affected by drought and rewatering. **Plant Physiology and Biochemistry**. v.113, p.32-39, 2017.
- DA COSTA, P. H. et al. A. Antioxidant-enzymatic system of two sorghum genotypes differing in salt tolerance. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.17, p.353–361, 2005.
- DAS, P., et al. "Oxidative environment and redox homeostasis in plants: dissecting out significant contribution of major cellular organelles." **Frontiers in Environmental Science**. v. 2, n. 70, p. 1-10, 2015.
- DISSANAYAKE, M. et al. Denaturation of whey proteins as a function of heat, pH and protein concentration. **International Dairy Journal**, v.31, n.2, p.93-99, 2013.
- FRANCO, A. C. ; BALL, E. ; LÜTTGE, U. Differential effects of drought and light levels on accumulation of citric and malic acids during CAM in *Clusia*. **Plant Cell Environment.**, v. 15, n. 7, p. 390-829, 1992.
- FRESCHI, L. et al. Specific leaf areas of the tank bromeliad *Guzmania monostachia* perform distinct functions in response to water shortage. **Journal Plant Physiology**, v.167, n.7, p.526-533, 2010.
- FRESCHI, L. et al. Correlation between citric acid and nitrate metabolism during CAM cycle in the atmospheric bromeliad *Tillandsia pohliana*. **Journal Plant Physiology**, v 167, p. 1577-1583, 2010b.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and biochemistry**, v.48, n.12, p.909-930, 2010.
- HABIBI, G. Hydrogen peroxide (H₂O₂) generation, scavenging and signaling in plants, In: **Oxidative Damage to Plants**. ed. (Amsterdam: Elsevier), p. 557-574, 2014.
- HABIBI, G.; HAJIBOLAND, R. Comparison of water stress and UV radiation effects on induction of CAM and antioxidative defense in the succulent *Rosularia elymaitica* (Crassulaceae). **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, v.53, n.2, p.15-24, 2011.
- HAMACHI, L. Competência para a expressão da fotossíntese CAM em plantas de *Guzmania monostachia*. **Dissertação (mestrado)**, São Paulo, Instituto de Biociências- Departamento de Botânica, p.52, 2013.

HESSINI, K. et al. Ammonium nutrition in the halophyte *Spartina alterniflora* under salt stress: evidence for a priming effect of ammonium?. **Plant and soil**, v.370, n.1-2, p.163-173, 2013.

JAJIC, I.; TADEUSZ, S.; KAZIMIERZ, S. "Senescence, stress, and reactive oxygen species." **Plants**, v.4, n.3, p. 393-411, 2015.

JUNGLEE, S. et al. Optimized assay for hydrogen peroxide determination in plant tissue using potassium iodide. **Am. Journal Anal. Chemistry** v.5, p.730-736, 2014.

KLUGE, M.; TING, I. P. **Crassulacean Acid Metabolism: Analysis of an Ecological Adaptation**. Berlin, Springer-Verlag, 1978.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, v.15, p. 214–217, 1946.

LUCK, H. **Catalases**. 'Methods of Enzymatic Analysis Vol. 2'. (Ed HU Bregmeyer) p.885. (Academic Press: New York), 1974.

LÜTTGE, U. Photosynthetic flexibility and ecophysiological plasticity: questions and lessons from *Clusia*, the only CAM tree, in the neotropics. **New Phytologist**, v. 171, p. 7-25, 2006.

LÜTTGE, U. Vascular epiphytes: setting the scene. In: LÜTTGE, U. (ed.). **Vascular Plants as Epiphytes**. Ecological Studies (Analysis and Synthesis), v.76. Heidelberg: Springer, 1989.

MATIZ, A. et al. CAM photosynthesis in bromeliads and agaves: what can we learn from these plants?. In: DUBINSKY, Z. (Ed.). **Photosynthesis**. InTech. 2013.

MEHLA, N. et al. Na introduction to antioxidants and their roles in plant stress tolerance. In: KHAN, I. R. (ed) **Reactive oxygen species and antioxidante systems: role and regulation under abiotic stress**. Springer Nature, Singapore, p.1-23, 2017.

MOLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annu Rev. Plant Biol.**, v. 58, p. 459-481, 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiology Plant**, v. 15, p. 473-479, 1962.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v.22, p.867-880, 1981.

NIEVOLA, C. C. et al. Temperature determines the occurrence of CAM or C₃ photosynthesis in pineapple plantlets grown in vitro. **In Vitro Cellular Developmental Biology Plant**, v. 41, p. 832-887, 2005.

NOCTOR, G., et al. Drought and oxidative load in the leaves of C₃plants: a predominant role for photorespiration? **Annals of Botany**. v. 89, p. 841–850, 2002.

OKSANEN, J. et al. 2013. **Vegan: community ecology package. R package version 2.0-9**. Disponível em:< <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>>. Acesso em: 21 out. 2017.

O'LEARY, B.; PARK, J.; PLAXTON, W. C. The remarkable diversity of plant PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase): Recent insights into the physiological functions and post-translational controls of nonphotosynthetic PEPCs. **Biochemical Journal**, v.436, p.15–34, 2011.

OSMOND, C. B. Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 29, p. 379-414, 1978.

PENG, C. L., et al. Response to high temperature in flag leaves of super high-yielding rice Pei'ai 64S/E32 and Liangyoupeijiu. **Rice Science**. v.12, p. 179-186, 2005.

PLEWA, M. J.; SMITH, S. R.; WAGNER, E. D. Diethyldithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. **Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v.247, p.5764, 1991.

PEREIRA, P. N.; SMITH, J. A. C.; MERCIER, H. Nitrate enhancement of CAM activity in two *Kalanchoë* species is associated with increased vacuolar proton transport capacity. **Physiologia Plantarum**, v.160, p.361-372, 2017.

PEREIRA, P. N. Influência das fontes de N e do déficit hídrico sobre a expressão de aquaporinas e/ou transporte de ácidos orgânicos em plantas CAM. **Tese (doutorado)**, São Paulo, Instituto de Biociências- Departamento de Botânica, p.141, 2016.

PEREIRA, P. N.; PURGATTO, E.; MERCIER, H. Spatial division of phosphoenolpyruvate carboxylase and nitrate reductase activity and its regulation by cytokinins in CAM-induced leaves of *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae). **Journal of Plant Physiology**, v.170, p.1067-1074, 2013.

PIKART, F. C. Heterogeneidade fotossintética em folhas de *Guzmania monostachia* (L.) Rusby Ex. Mez. (Bromeliaceae). **Dissertação (mestrado)**, Campinas, Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, p.74, 2014.

R CORE TEAM. 2014. **R: a language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing**, Vienna, Austria. Disponível em:< <http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 21 out. 2017.

RODRIGUES, M. A. et al. Implications of leaf ontogeny on drought-induced gradients of CAM expression and ABA levels in rosettes of the epiphytic tank bromeliad *Guzmania monostachia*. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 108, p. 400-411, 2016.

RODRIGUES, M. A. et al. Interactions between nutrients and crassulacean acid metabolism. In: LÜTTGE, U.; BEYSCHLAG, W.; CUSHMAN, J. (Eds.). Progress in

botany (Genetics – pPhysiology – Systematics – Ecology), v. 75. Heidelberg: Springer, 2014.

SCHAEDLE, M.; BASSHAM, J. A. Chloroplast glutathione reductase. **Plant Physiology**. v.59, p.1011-1012, 1977.

SLESIAK, I.; MISZALSKI, Z. Superoxide dismutase-like protein from roots of the intermediate C₃-CAM plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. in in vitro culture. **Plant Science**, v.164, n.4, p.497-505, 2003.

SOUZA, S. R.; BLANDE, J. D.; HOLOPAINEN, J. K. Pre-exposure to nitric oxide modulates the effect of ozone on oxidative defenses and volatile emissions in lima bean. **Environmental Pollution**, v.179, p.111-119, 2013.

TANOUE, G.; MOLASSIOTIS, A.; DIAMANTIDIS, G. Hydrogen peroxide-and nitric oxide-induced systemic antioxidant prime-like activity under NaCl-stress and stress-free conditions in citrus plants. **Journal Plant Physiology**, v.166, p. 1904-1913, 2009.

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA, K. Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturanase. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.13, p.43-50, 2003.

WENG, X. et al. Characteristics of photosynthesis and functions of the water –water cycle in rice (*Oryza sativa*) leaves in response to potassium deficiency. **Physiologia Plantarum**. v.131, p.614-621, 2007.

ZAMBRANO, V. A. B. et al. Leaf anatomical traits which accommodate the facultative engagement of crassulacean acid metabolism in tropical trees of the genus *Clusia*. **Journal Experimental Botany**., v. 65, n. 13, 3513-3523, 2014.

ZOTZ, G.; WILHELM, K.; BECKER, A. Heteroblasty - a review. **The Botanical Review**, v.77, n.2, p.109-151, 2011.

ZOTZ, G.; HIETZ, P. The physiological ecology of vascular epiphytes: current knowledge, open questions. **Journal of Experimental Botany**, v.52, n.364, p.2067-2078, 2001.

Tabelas

Tabela 1: Acúmulo noturno de ácido cítrico em plantas atmosféricas de *Guzmania monostachia* cultivadas previamente in vitro em diferentes fontes nitrogenadas (nitrato, amônio, glutamina ou ureia na concentração de 5mM de N total) e, em seguida, submetidas ao tratamento de déficit hídrico por 7 dias, com a adição de PEG ao meio de cultura. As plantas controle foram cultivadas nas mesmas condições, porém sem a adição de PEG. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os controles e maiúsculas entre as diferentes fontes de N combinadas com o tratamento de déficit hídrico. Asterisco indica diferença entre o controle e o tratamento com déficit hídrico da respectiva fonte nitrogenada (ANOVA/ Tukey HSD, $\alpha = 0,05$).

	Controle		Déficit hídrico	
	Médias	Erro padrão	Médias	Erro padrão
Nitrato	1,7369 a	0,1055	8,0365 A*	1,1617
Amônio	1,3974 a	0,0475	3,1498 B	0,0851
Glutamina	0,1136 b	0,0584	1,1865 B*	0,0717
Ureia	1,8033 a	0,0977	2,3293 B	0,0102

Figuras

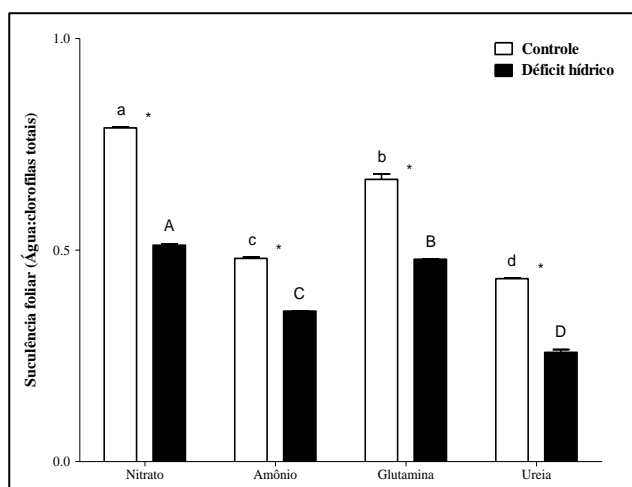


Figura 1: Suculência foliar em plantas atmosféricas de *Guzmania monostachia* cultivadas previamente in vitro em diferentes fontes nitrogenadas (nitrato, amônio, glutamina ou ureia na concentração de 5mM de N total) e, em seguida, submetidas ao tratamento de déficit hídrico por 7 dias com a adição de PEG ao meio de cultura. As plantas controle foram cultivadas nas mesmas condições, porém sem a adição de PEG. Barras indicam médias e erro padrão. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os controles e maiúsculas entre as diferentes fontes de N combinadas com o tratamento de déficit hídrico. Asterisco indica diferença entre o controle e o tratamento. (ANOVA/ Tukey HSD, $\alpha = 0,05$).

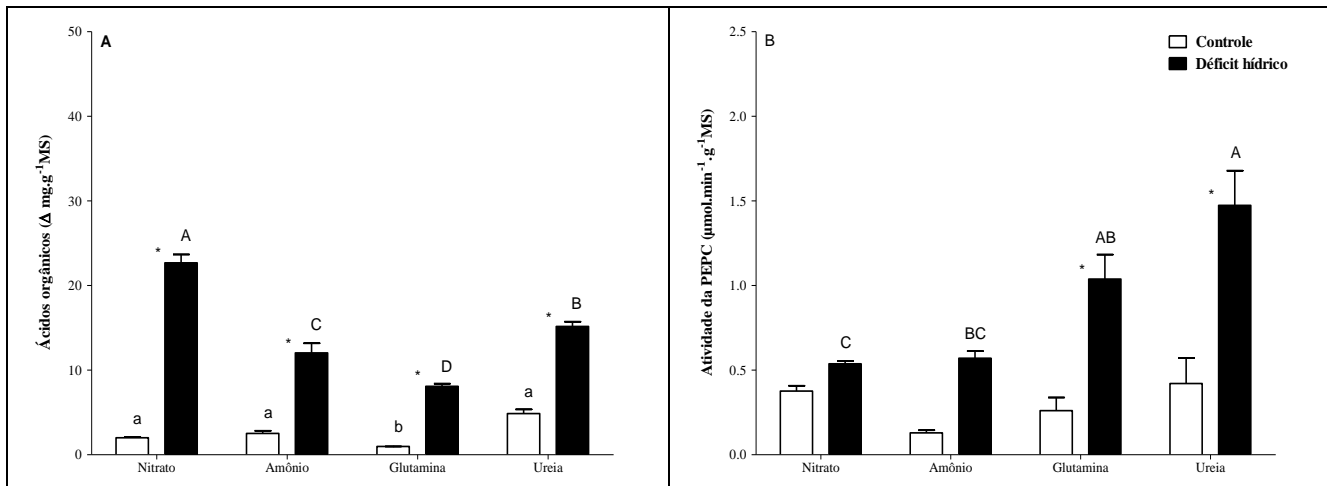


Figura 2: (A) - Acúmulo noturno de ácidos orgânicos (ácido málico + ácido cítrico) e (B) – atividade enzimática da PEPC em plantas atmosféricas de *Guzmania monostachia* cultivadas previamente in vitro em diferentes fontes nitrogenadas (nitrato, amônio, glutamina ou ureia na concentração de 5mM de N total) e, em seguida, submetidas ao tratamento de déficit hídrico por 7 dias com a adição de PEG ao meio de cultura. As plantas controle foram cultivadas nas mesmas condições, porém sem a adição de PEG. Barras indicam médias e erro padrão. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os controles e maiúsculas entre as diferentes fontes de N combinadas com o tratamento de déficit hídrico. Asterisco indica diferença entre o controle e o tratamento. (ANOVA/Tukey HSD, $\alpha = 0,05$).

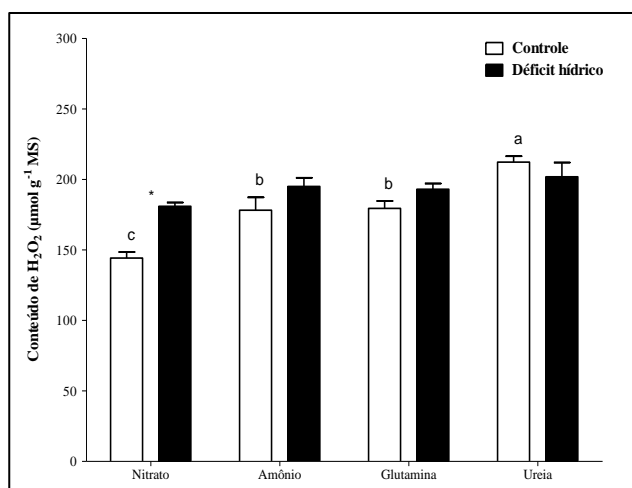
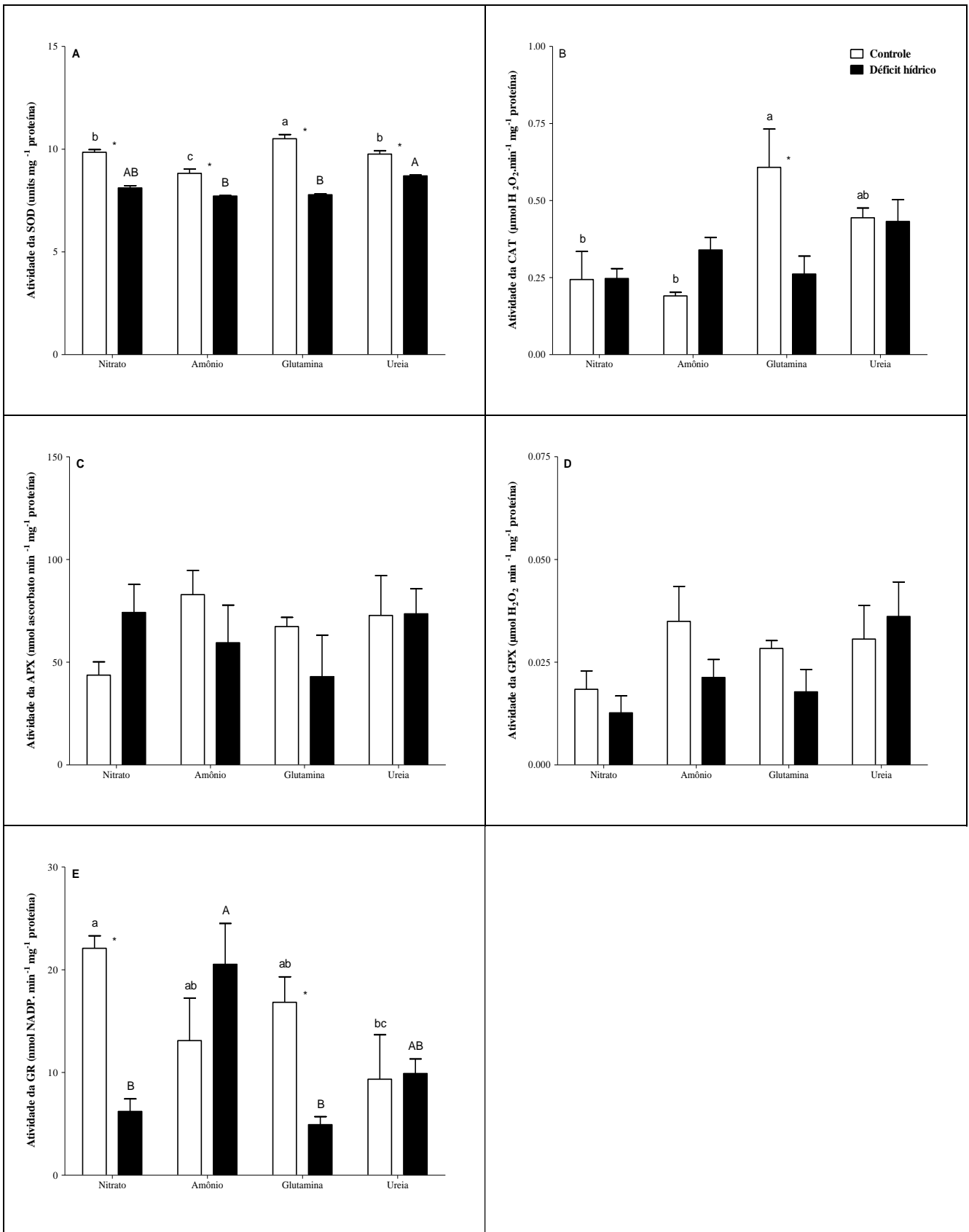


Figura 3: Conteúdo de peróxido de hidrogênio - H₂O₂ em plantas atmosféricas de *Guzmania monostachia* cultivadas previamente in vitro em diferentes fontes nitrogenadas (nitrato, amônio, glutamina ou ureia na concentração de 5mM de N total) e, em seguida, submetidas ao tratamento de déficit hídrico por 7 dias com a adição de PEG ao meio de cultura. As plantas controle foram cultivadas nas mesmas condições, porém sem a adição de PEG. Barras indicam médias e erro padrão. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os controles e maiúsculas entre as diferentes fontes de N combinadas com o tratamento de déficit hídrico. Ainda, o asterisco indica diferenças entre o controle com relação ao tratamento (plantas em déficit hídrico) (ANOVA/ Tukey HSD, $\alpha = 0,05$).



Resumo Geral

Resumo

As bromélias são plantas que podem utilizar o nitrogênio em suas formas inorgânica e orgânica. Algumas delas apresentam comportamento heteroblástico, isto é, na fase adulta apresentam a sobreposição das folhas, formando um tanque, o qual pode armazenar água e nutrientes. Já na fase juvenil, também chamada de atmosférica, o tanque inexistente. Plantas adultas da espécie heteroblástica *Guzmania monostachia* quando cultivadas na natureza parecem preferir o nitrogênio na forma amoniacal ou ureídica; no entanto, para as atmosféricas não existem ainda estudos a respeito. Quanto à fotossíntese, plantas adultas com tanque de *G. monostachia* apresentam um sistema facultativo, isto é, numa condição hídrica favorável realizam a fotossíntese C₃, já sob seca, podem alterar para o metabolismo ácido das crassuláceas (CAM). Por outro lado, as plantas atmosféricas dessa espécie expressam o CAM constitutivamente. Em resposta às adversidades ambientais, como a seca temporária ou a indisponibilidade de nutrientes, um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pode ocorrer e, dependendo da concentração alcançada nos tecidos, pode causar injúrias. Entretanto, as ROS também podem estar envolvidas com processos de sinalização celular, desde que em baixas concentrações. Folhas destacadas de plantas adultas de *Guzmania monostachia*, submetidas a um déficit hídrico e cultivadas na presença de diferentes fontes nitrogenadas, mostraram diferentes intensidades de CAM e teores consideráveis de ROS no ápice foliar. Entretanto, pouco se conhece, até o momento, sobre a modulação do CAM e a produção de ROS em plantas da fase juvenil. Os principais objetivos desta pesquisa foram 1) investigar quais seriam as fontes nitrogenadas mais propícias ao crescimento e desenvolvimento de plantas atmosféricas de *Guzmania monostachia* cultivadas in vitro na presença isolada de nitrato, amônio, glutamina ou ureia, na concentração total de N de 5mM. 2) analisar os efeitos do cultivo prévio de plantas atmosféricas em diferentes fontes de nitrogênio (mesmas condições acima) submetidas, em seguida, a um período de 7 dias de déficit hídrico provocado por PEG adicionado ao meio de cultura, sobre a modulação da intensidade do CAM, produção de ROS e atividades das enzimas antioxidantes. Foram realizadas análises morfológicas, anatômicas, além das fisiológicas, como conteúdo de pigmentos fotossintéticos (capítulo 1). Além disso, analisaram-se a suculência foliar, o acúmulo noturno de ácidos orgânicos, conteúdo de H₂O₂, atividade das enzimas PEPC e das relacionadas ao sistema antioxidante (capítulo 2). Os resultados de cultivo in vitro apontam que diferentes fontes nitrogenadas modificam metabolicamente e estruturalmente a bromélia *Guzmania monostachia* na fase atmosférica, sendo a fonte nítrica a que propiciou o surgimento de maiores proporções dos parênquimas aquífero e clorofiliano, aumentando a possibilidade de estocagem de água e de produção de clorofilas e carotenoides. Diferentemente das outras fontes de N, o nitrato foi a que propiciou o maior acúmulo noturno de ácidos orgânicos nas plantas submetidas à deficiência hídrica. Houve também uma maior suculência dos tecidos no tratamento com nitrato, mesmo após a imposição dos 7 dias de deficiência hídrica, indicando que um aumento na capacidade de armazenar água possa ser uma condição estrutural importante para se incrementar a expressão do CAM. O conteúdo de peróxido de hidrogênio aumentou quando as plantas previamente cultivadas em nitrato foram submetidas ao déficit hídrico, sugerindo que essa ROS poderia atuar como um sinalizador na modulação positiva do CAM; já que as atividades das enzimas

antioxidantes diminuíram em relação ao controle (SOD e GR) ou permaneceram iguais estatisticamente (CAT, APX, GPOX). Em conclusão, as plantas atmosféricas de *Guzmania monostachia*, cresceram e se desenvolveram mais adequadamente na presença de nitrato e esta forma de N propiciou um aumento da suculência e da intensidade do CAM, quando houve a posterior imposição de um período de deficiência hídrica, sugerindo um aumento da tolerância à falta de água. Ao contrário, trabalhos anteriores do grupo mostraram que as plantas adultas com tanque de *G. monostachia* intensificaram o CAM na presença de amônio, indicando, portanto, que plantas de diferentes fases de desenvolvimento possuem, além de diferenças morfológicas, comportamentos fisiológicos diferentes.

Palavras-chave: Bromeliaceae, fontes nitrogenadas, cultivo in vitro, fotossíntese CAM, enzimas antioxidantes.

Abstract

Bromeliads are plants that can use inorganic and organic nitrogen forms. Some of them feature the heteroblastic behavior which in adulthood have an overlapping of leaves forming a tank that can store water and nutrients. On the other hand, the juvenile phase, also called atmospheric, does not form the tank. Adult plants of the bromeliad species *Guzmania monostachia* are heteroblastic when growing in the wild and seem to prefer ammonium and urea. However, to the best of our knowledge, there are no studies with the atmospheric plants. Considering the photosynthetic metabolism, *G. monostachia* adult plants have a facultative system where the plant performs the C₃ metabolism in good water conditions and change to the Crassulacean acid metabolism (CAM) under drought. Furthermore, plants of this species can express CAM constitutively. In response to environmental adversities, such as drought or variation in nutrient availability, an increase in the production of reactive oxygen species (ROS) can occur and, depending on the concentration achieved in their tissues, can cause injury. However, the ROS can also be involved in the processes of signaling of the cells when at low concentrations. Leaves that were withdrawn from adult plants of *G. monostachia* and were subjected to treatments of water deficit and different nitrogen sources showed different intensities of CAM and considerable levels of ROS in the foliar apex. However, little is known about the modulation of the CAM metabolism and the production of ROS in the juvenile *G. monostachia* bromeliads. The aims of this research were to 1) investigate which nitrogen source contribute more to the growth and development of atmospheric plants cultivated in vitro with isolated nitrate, ammonium, glutamine or urea, in a total N concentration of 5 mm; 2) examine the effects of the previous cultivation of atmospheric plants in different nitrogen sources on the modulation of the intensity of the CAM, ROS production and activities of antioxidant enzymes when the plants were submitted to in a period of seven days of water deficit caused by PEG added to the culture medium. Morphometric, physiological, anatomical and the photosynthetic pigments were analyzed (Chapter 1). In addition, foliar succulence the accumulation of nocturnal organic acids, H₂O₂ content, the activity of PEPC enzymes and the antioxidant system related were analyzed, (Chapter 2). The results of in vitro cultivation indicated that different nitrogen sources modified the metabolism and the tissue structure of the atmospheric *Guzmania monostachia*, as the nitrate provided the emergence of the larger proportions of the aquifer and chlorophyll parenchyma, increasing the possibility of water storage and production of chlorophylls and carotenoids. Unlike other sources of N, nitrate was the only that provided the greatest accumulation of nocturnal organic acids in plants submitted to water deficiency.

There was also a greater succulence in the tissues submitted to the nitrate treatment, even after the exposition of seven days of water deficit, indicating an increase in the capacity of storing water that can be an important structural condition to increase the expression of CAM. The H₂O₂ content increased when the plants previously cultivated in nitrate were submitted to water deficit, suggesting that ROS could act as a signaling in the modulation of the CAM metabolism as the activities of antioxidant enzymes decreased compared to the control treatments (SOD and GR) or remained the statistically same (CAT, APX, GPOX). In conclusion, the atmospheric plants grew and developed more in the presence of nitrate and this form of N provided an increment in leaf succulence and intensification of CAM when there was the subsequent imposition of a period of water deficit, suggesting an increment of the tolerance for water deficit conditions. In contrast, previous researches showed that the adult plants of *G. monostachia* with tank intensified the CAM in the presence of ammonium, indicating that plants of different stages of development have, in addition to morphological differences, differences in their physiological behaviors.

Keywords: Bromeliaceae, nitrogenous sources, in vitro cultivation, CAM photosynthesis, antioxidant enzymes.