Camila Aguetoni Cambuí

Absorção e assimilação de ureia pela bromélia epífita com tanque *Vriesea gigantea*

São Paulo

2009

Camila Aguetoni Cambuí

Absorção e assimilação de ureia pela bromélia epífita com tanque *Vriesea gigantea*

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências, na área de Botânica.

Orientadora: Prof.ª Drª. Helenice Mercier
Co-orientadora: Prof.ª Drª. Marília Gaspar

Ficha catalográfica

Cambuí, Camila Aguetoni
Absorção e assimilação de ureia pela bromélia epífita com tanque *Vriesea gigantea*
Número de páginas: 146

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

1. Ureia 2. Nutrição nitrogenada 3. Bromeliaceae
I. Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências. Departamento de Botânica

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).	Prof(a). Dr(a).
Prof(a). Dr(a).	Prof(a). Dr(a).

Prof[a]. Dr[a]. Helenice Mercier

Orientadora

Aos meus pais, às minhas irmãs e ao Erich,

Pelo amor incondicional, compreensão e

incentivo em todos os momentos

Dedico.

A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências.
O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada.

Albert Einstein

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos…

À Prof^{a}. Dr^{a}. Helenice Mercier, pela orientação e ensinamentos valiosos ao longo desses 8 anos de convivência, pela amizade sincera, pelo apoio constante e incentivo nos momentos críticos do trabalho. Obrigada pela confiança e liberdade concedida. Tenha certeza de que levo comigo lições para o resto da vida, como, por exemplo, ser sempre otimista e encontrar "ouro" onde os outros nada veem.

À Prof^{a}. Dr^{a}. Marília Gaspar, primeiramente por aceitar esse desafio em me co-orientar, mesmo sem eu ter experiência alguma na área de biologia molecular e com pouca disponibilidade de tempo o desenvolvimento do trabalho. Obrigada por todos os ensinamentos, tanto teóricos quanto na bancada do laboratório, pela paciência em esclarecer todas as minhas dúvidas e por estar à disposição, dia e noite. Agradeço pela amizade, pelas conversas agradáveis, pelas caronas na hora de ir pra casa. Obrigada por tudo, mesmo.

À Cassia, pela amizade, pela companhia valiosa e pela ajuda sempre que precisei. Obrigada pelos momentos de risadas, mesmo sob luz verde durante a madrugada no laboratório. Crescemos juntas no laboratório e grande parte desse trabalho devo a ela.

À Auri e ao Luciano, por sempre estarem disponíveis a ajudar, quaisquer fossem as circunstâncias. Obrigada pela amizade, pelas dicas valiosas, pelos ensinamentos na bancada e pelo exemplo profissional.

À Thaís, pela amizade, companhia e paciência. Por me aturar o tempo todo, tanto na época do laboratório quanto em casa, agora. Pela enorme ajuda sempre que precisei, principalmente quando o assunto se relaciona com computador e internet.

À Alê, pela amizade, pelo apoio em todos os momentos, pelas deliciosas conversas de "meninas", pela alegria e exemplo de vida.

Às Alines, Lia, Cíntia, Ilton, Pri, Paulo, Yepes e todos os colegas de laboratório, recentes ou que já se foram, pela convivência agradável e harmoniosa, pelas risadas, pela companhia na hora do almoço e festinhas em datas comemorativas.

À Susan e à Profª. Bianca Zingales, pela disposição em me ajudar nos momentos finais desse trabalho, pelos ensinamentos e ajuda imprescindíveis para a realização das análises de expressão gênica.

Ao Prof. Dr. Gilberto Kerbauy, por sempre se preocupar com todos do laboratório, tentando manter tudo em perfeito estado de funcionamento. Agradeço pelas valiosas discussões em grupo, pelo exemplo de dedicação e de amor à pesquisa.

Ao Prof. Dr. Eduardo Purgatto, por se disponibilizar em me ajudar no início das análises de aminoácidos.

Ao Prof. Dr. Ladaslav Sodek, pelas melhores aulas sobre enzimologia que já tive. Pelo conhecimento valioso, divididos sem restrição com todos que o procuram. Obrigada por tantas vezes esclarecer minhas dúvidas, principalmente via e-mail.

Ao Prof. Dr. Torgny Näsholm e toda equipe (Margaretha, Rupali, Annika, dentre outros), pela oportunidade a mim concedida para estagiar na Suécia. Agradeço pelo carisma, pela preocupação constante, pela conversas agradáveis e muito proveitosas. Obrigada por se disponibilizar a me ajudar com as análises de aminoácidos marcados, por compartilhar todo o seu conhecimento e experiência no assunto, por ceder gentilmente seu laboratório e toda equipe técnica.

Às técnicas Ana Maria e Ingrid, por estarem sempre dispostas a ajudar, mantendo a organização e funcionalidade do laboratório.

Aos professores e equipe técnica do Instituto de Botânica, por disponibilizarem toda uma estrutura essencial para o desenvolvimento de parte desse trabalho. Agradeço pelo convívio agradável, pelas sugestões valiosas, pelos momentos de descontração.

A todos os colegas de laboratório, do IBUSP e do Instituto de Botânica, que estiveram envolvidos no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Rosário, alunos e professores do Laboratório de Ficologia do IBUSP, por estarem sempre dispostos a ajudar, seja doando N líquido, seja emprestando equipamentos ou reagentes.

A toda a equipe do laboratório, técnicos, colegas de trabalho, todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores, técnicos e alunos do Laboratório de Biologia Molecular da USP, pelas dicas valiosas, pelos ensinamentos teóricos e práticos, além da disponibilização de equipamentos e reagentes.

A todos os funcionários do IBUSP que permitiram, direta ou indiretamente, o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Erich, pelo amor, carinho e dedicação, mesmo estando na maioria das vezes tão longe. Obrigada pelo companheirismo, pela confiança, paciência e preocupação constante. Agradeço por estar sempre disposto a me ajudar, das mais diversas maneiras, desde lavando vidrarias ou macerando plantas, até nas discussões dos meus resultados.

À minha família, pelo amor incondicional, paciência e apoio em todos os momentos. Por serem exemplos de caráter e de dedicação. Obrigada por me oferecem todas as oportunidades para que eu chegasse onde estou hoje. E tenham certeza que sempre terei comigo seus mais preciosos ensinamentos de vida.

A todos aquele aqui não mencionados, mas que me auxiliaram na execução deste trabalho.

À Fapesp, por me conceder bolsas desde a Iniciação cientifica.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL 1

Bibliografia 7

CAPÍTULO II

Estariam as aquaporinas envolvidas na absorção de uréia pelos tecidos foliares de *Vriesea gigantea*? 10

Introdução 11

Objetivos 15

Material e Métodos 16

- **I) Obtenção de seqüências de cDNA parciais de aquaporinas** 16
  - **I-1) Construção dos iniciadores** 16
  - **I-2) Extração de RNA total** 17
  - **I-3) Síntese da primeira fita de cDNA** 17
  - **I-4) Obtenção das seqüências parciais de aquaporinas** 18
  - **I-5) Clonagem dos fragmentos obtidos por PCR** 18
  - **I-6) Seqüenciamento das seqüências isoladas** 19
  - **I-7) Verificação das seqüências gênicas obtidas** 20
- **II) Obtenção da seqüência completa dos cDNAs de interesse** 20
  - **II-1) Construção dos iniciadores** 21
  - **II-2) Síntese da primeira fita de cDNA** 21
  - **II-3) Obtenção de cDNA dupla fita** 21
  - **II-4) Circularização do cDNA dupla fita** 22
  - **II-5) Obtenção das regiões 5'e 3' dos cDNAs** 22
  - **II-6) Clonagem dos fragmentos obtidos por PCR, seqüenciamento das seqüências isoladas e verificação das seqüências gênicas obtidas** 23
  - **II-7) Obtenção e clonagem dos cDNAs completos de aquaporinas** 23
- **III) *Southern blot*** 23
  - **III-1) Extração do DNA genômico**..... 23
  - **III-2) Digestão do DNA genômico com enzimas de restrição** 24
  - **III-3) Eletroforese e transferência do DNA**

digerido para membranas Hybond-N$^+$ 24
III-4) Obtenção e marcação das sondas de aquaporinas 25
III-5) Hibridização da membrana e análise da marcação 26

IV) *Slot blot 26*
IV-1) Extração do RNA total 26
IV-2) Preparo das amostras e aplicação em membrana Hybond-N$^+$ 27
IV-3) Obtenção e marcação das sondas de aquaporinas 27
IV-4) Hibridização das membranas e análise da marcação 27
Resultados 28
Discussão 32
Bibliografia 35

CAPÍTULO III

ROTA DE ASSIMILAÇÃO DA URÉIA EM AMINOÁCIDOS NA ESPÉCIE DE BROMÉLIA *Vriesea gigantea*

Introdução 42
Objetivo 44
Material e Métodos 45

I) Obtenção do material vegetal e delineamento experimental 45
I -1) Material vegetal 45
I-2) Delineamento experimental 45
II) Quantificação dos conteúdos endógenos de amônio e uréia 46
II-1) Extração de uréia e amônio presentes em tecidos foliares 46
II-2) Quantificação de amônio 47
II-3) Quantificação de uréia 47
III) Quantificação da atividade *in vivo* da urease 47
III-1) Ensaio *in vivo* da urease 47
IV) Quantificação da atividade *in vitro* da arginase 48
IV-1) Ensaio *in vitro* da arginase 48
V) Quantificação dos aminoácidos livres 49

V-1) Extração dos aminoácidos livres 49
V-2) Purificação da fração de aminoácidos 49
V-3) Derivatização e análise dos aminoácidos 49
V-4) Análise da sensibilidade de detecção de aminoácidos marcados 50
VI) Número amostral e análise estatística 50
Resultados 51
I) Dinâmica dos metabólitos amônio e ureia e das enzimas urease e arginase nos tecidos foliares de bromélias cultivadas na presença de 10 mM de N nas formas de ureia ou amônio 51
II) Assimilação de ureia em aminoácidos 54
Discussão 63
Bibliografia 73
CAPÍTULO IV 77
CONTRIBUIÇÃO DA UREASE NA UTILIZAÇÃO DA URÉIA: UM POUCO ALÉM DE UMA SIMPLES HIDRÓLISE 77
Introdução 78
Objetivos 80
Material e Métodos 81
I) Obtenção do material vegetal e delineamento experimental 81
I-1) Material vegetal 81
I-2) Delineamento experimental 82
II) Quantificação da atividade *in vitro* da urease 82
II-1) Extração de proteínas solúveis, de parede celular e membranas 82
II-2) Quantificação da atividade *in vitro* da urease 83
III) Dot Western Immunoblotting 83
III-1) Extração de proteínas solúveis, de parede celular e membranas 83

III-2) Dot Western Immunoblotting 84

IV) Quantificação do grau de contaminação citoplasmática nas frações de parede celular e membranas 85

V) Detecção citoquímica da urease 86

VI) Número amostral e análise estatística 86

Resultados 88

Discussão 93

Bibliografia 95

CAPÍTULO IV 98

A URÉIA COMO FONTE PREFERENCIAL DE NITROGÊNIO PARA A BROMÉLIA *VRIESEA GIGANTEA*: VANTAGEM EVOLUTIVA? 98

Introdução 99

Objetivos 101

Material e Métodos 102

I) Obtenção do material vegetal e delineamento experimental 102

I-1) Material vegetal 102

I-2) Delineamento experimental 102

II) Quantificação do consumo de uréia e amônio do meio de cultura 103

III) Detecção citoquímica do CO_2 gerado pela urease 104

IV) Determinação isotópica de ^{13}C e ^{15}N nos tecidos foliares 105

***V)* Cálculos empregados para a determinação da incorporação dos isótopos de ^{13}C e ^{15}N nos tecidos foliares de *Vriesea gigantea* 105**

VI) Número amostral e análise estatística 106

Resultados 107

1)Fonte de nitrogênio preferencial para absorção 107

2) Detecção citoquímica do CO_2 gerado pela urease..... 108

3) Assimilação de ^{13}C e ^{15}N proveniente da ureia pelos tecidos foliares de *Vriesea gigantea* 109

Discussão 112

Bibliografia 115

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES 119

Resumo 123

Abstract 124

ANEXOS I

ANEXO A

Verificação da presença de microorganismos endofíticos nos tecidos foliares de *Vriesea gigantea* 126

ANEXO B

Padronização do ensaio *in vitro* da urease 129

ANEXO C

Padronização do ensaio *in vitro* da arginase 135

ANEXO D

Composição dos meios de cultura 142

ANEXO II

Publicações …….. 147

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

O hábitat epifítico representa um ambiente altamente dinâmico, sujeito a variações temporais e espaciais de intensidade luminosa, disponibilidade de água e de nutrientes (Nadkarni e Primack, 1989; Benzing, 2000; Reich *et al.*, 2003), sendo por muitos considerado um dos ambientes mais áridos e inférteis já ocupados pelas plantas vasculares. Embora se estime que aproximadamente 10% de todas as plantas vasculares sejam epífitas, poucos táxons estão representados nesse ambiente, na sua grande maioria monocotiledôneas. Mais de 30% das plantas pertencentes a esse clado são epífitas, enquanto meros 2% das dicotiledôneas se qualificam como tal.

Dentre as monocotiledôneas, grande destaque tem a família Bromeliaceae, segunda maior representante em número de espécies epífitas dentro das angiospermas (Benzing, 1987). Devido ao seu pronunciado epifitismo e importância ecológica em muitas comunidades tropicais e subtropicais do Novo Mundo, por muitos anos essa família tem atraído a atenção de pesquisadores. Dentre os maiores interesses está a elucidação das diversas adaptações que permitem as bromélias viver em habitats tão incomuns. Exemplos são os trabalhos publicados por Benzing e Renfrow (197la, b), Benzing (1973), Benzing *et al.* (1976), Benzing et al. (1978), Nyman *et al* (1987), Zotz e Andrade (1998), Inselsbacher *et al.* (2007), Takahashi *et al.* (2007), Zotz e Schultz (2008), Winkler e Zotz (2009) e Cambuí *et al.* (2009), dentre muitos outros, que documentaram a existência da combinação de especializações funcionais e estruturais únicas bastante efetivas para lidar com esse ambiente usualmente seco e estéril.

De acordo com diversos autores, a ocorrência de tricomas foliares foi a peça-chave para o sucesso dessa família no ambiente epifítico. Estruturas especializadas únicas, presentes em maior ou menor densidade, dependendo da espécie e/ou região foliar em questão, elas permitem a absorção rápida e eficiente de água e nutrientes (Benzing, 1970a, b, 1974, 2000). Outras duas adaptações também tiveram grande contribuição para esse pronunciado epifitismo: a natureza xeromórfica das bromélias, além da ocorrência, em muitas das espécies, de uma estrutura formada pelas bases foliares capaz de interceptar e armazenar água e matéria orgânica, denominada cisterna ou tanque de bromélias (Benzing, 1970b; 1990; 2000). Também, em decorrência da presença do tanque, uma profunda alteração na divisão convencional de funções entre o sistema caulinar e radicular pode ser observada. Possuindo uma função praticamente restrita de fixação à planta hospedeira, as raízes das bromélias são bastante reduzidas e com pouca importância para a absorção de água e nutrientes. Essa

função foi transferida para as folhas, em especial para as bases foliares formadoras do tanque (Takahashi *et al.*, 2007), enquanto o sítio de assimilação fotossintética em si é desempenhado pela porção mediana e apical das mesmas (Freschi *et al.*, dados não publicados). Todas essas características contribuíram para que as plantas dessa família se libertassem da dependência convencional do solo, aumentando sua capacidade de explorar fontes de água e nutrientes não terrestres.

Embora a ocorrência de uma estrutura capaz de interceptar e armazenar água e detritos seja verificada em diversas famílias, como Liliaceae, Commelinaceae, Costaceae, Pandanaceae e Zingiberaceae, em nenhuma delas sua presença é tão efetiva em criar um substituto do solo e nem tão importante para a sobrevivência das plantas em Bromeliaceae (Benzing, 1990). Formado pela sobreposição parcial das bases foliares expandidas, bem como pelo formato em funil das folhas, o tanque permite a formação de reservatórios de água que, em ambientes úmidos e em indivíduos maiores, podem funcionar como fontes permanentes de água fresca. Com isso, um dos principais problemas enfrentados pelas plantas epífitas, a disponibilidade intermitente de água da chuva, neblina e orvalho, é atenuado.

A existência do tanque também proporciona um incremento na quantidade de nutrientes a que as plantas têm acesso. Sem raízes em contato direto com o solo, a mais importante fonte de recursos minerais para as plantas terrestres, o tanque possibilita a estocagem dos nutrientes provenientes da atmosfera (chuva, poeira, neblina), além daqueles contidos na água que escorre pelas folhas, galhos e troncos da árvore hospedeira e que carreiam consigo vários tipos de íons e moléculas orgânicas (Benzing 1973, 1990, 2000), além de todo material foliar que cai e se acumula no interior da roseta (Leme, 1993; Benzing, 2000).

Além disso, justamente por armazenar água por períodos relativamente longos, o tanque de bromélias é também o principal núcleo de suporte de uma extensa biota a ele associado, como, por exemplo, uma enorme variedade de microorganismos, invertebrados e vertebrados, tanto terrestres quanto aquáticos (Picado, 1913; Laessle 1961), os quais procuram esses locais para sua alimentação, reprodução e/ou proteção (Benzing 1980, 2000). Em troca, esses organismos contribuem em muito para a nutrição dessas plantas, tanto por meio da liberação de excretas na água do tanque quanto pelo acúmulo de restos de esqueleto (Benzing, 1990; Eterovick, 1999; Lopez *et al.*, 1999).

Essa bem-sucedida associação entre bromélias com tanque e animais pode também ser avaliada pela natureza das especializações morfológicas e fisiológicas observadas nesses

organismos. Diversos invertebrados e vertebrados encontrados no tanque de bromélias possuem forma corporal, histórico de vida e comportamento que sugerem uma associação bastante antiga com essas plantas. Muitas vezes, uma dependência obrigatória dessas espécies de animais em relação às bromélias é observada (Wake, 1987; Diesel, 1992). Exemplo disso são os anfíbios, comumente encontrados no tanque de bromélias (Richardson, 1999) e onde chegam a passar todo o seu ciclo de vida (Abendroth, 1971; Eterovick 1999). Algumas espécies, como *Phyllodytes luteolus*, usam o tanque da bromélia *Vriesea neoglutinosa* como seu habitat natural, possuindo a forma do corpo e biologia reprodutiva influenciadas pela forma da planta (Wake, 1987).

Mas, ao longo da evolução, não só os animais parecem ter se adaptado às vantagens ecológicas proporcionadas com essa associação. Enquanto para a maioria das plantas terrestres as fontes de nitrogênio inorgânicas são as mais importantes para o desenvolvimento vegetal, as bromélias com tanque têm mostrado preferência pela utilização de fontes orgânicas, tais como a ureia e aminoácidos (Benzing, 1970b; Mercier *et al.*, 1997; Endres e Mercier, 2001). Mercier *et al.* (1997), por exemplo, trabalhando com a bromélia formadora de tanque *Vriesea phillipocoburgii* cultivada *in vitro*, observaram um melhor crescimento vegetativo dessas plantas quando na presença de ureia, em detrimento de recursos inorgânicos. O mesmo foi verificado por Endres e Mercier (2001) para a espécie *Vriesea gigantea*.

É muito provável que o desenvolvimento e/ou aperfeiçoamento de uma série de estratégias fisiológicas tenham sido necessários para que essa fonte orgânica de nitrogênio seja utilizada com grande eficiência por essas bromélias. A começar pela sua absorção a partir da água do tanque. Apesar de o tanque proporcionar o acúmulo de minerais e matéria orgânica para as plantas, é muito grande a competição interespecífica por nutrientes nesse microcosmo. As bromélias precisam competir avidamente com os microorganismos pela utilização desses recursos, principalmente pelas fontes nitrogenadas orgânicas, que também são utilizadas preferencialmente pelos microorganismos (Inselsbacher *et al.*, 2007). Nesse cenário, alguns aspectos bastante interessantes foram verificados, dentre eles a capacidade das bromélias secretarem enzimas na água do tanque, tornando parte desses recursos orgânicos indisponíveis para os microorganismos, além da impressionante capacidade de absorção de alguns nutrientes, como a ureia e o amônio (Inselsbacher *et al.*, 2007).

Estudos recentes mostraram que, além de absorver a ureia como uma molécula intacta, a espécie *Vriesea gigantea* possui uma cinética de transporte transmembrana para

esse composto bastante incomum, muito diferente daquelas verificadas para as demais fontes de nitrogênio inorgânicas e orgânicas absorvidas por essas plantas (Inselsbacher *et al.*, 2007). No referido trabalho, observou-se que, mesmo na presença de altas concentrações de ureia, nenhuma saturação no seu transporte foi observada. Além disso, apesar dessa linearidade na absorção de ureia, é muito provável que a participação de transportadores protéicos esteja envolvida, uma vez que o uso de $HgCl_2$ (10 μM) ou CCCP (inibidor de ATPase, na concentração de 20 μM) inibiram em 78% e 52% a absorção dessa molécula orgânica, respectivamente (Inselsbacher *et al.*, 2007).

Uma vez absorvida pelas células, o próximo passo seria a sua assimilação. Nessa etapa, novamente parece existir um diferencial entre essas bromélias epífitas e as plantas terrestres. Embora exista o consenso geral de que o nitrogênio da ureia não está disponível para o metabolismo vegetal a menos que ela seja hidrolisada a CO_2 e NH_3 pela urease (Marschener, 1995; Lam *et al.*, 1996), existem evidências de que uma via alternativa de assimilação da ureia ocorra em bromélias com tanque. Mercier (1993) observou que a espécie *Vriesea philippocoburgii*, quando cultivada com ureia como fonte exclusiva de nitrogênio, apresentava em seus tecidos conteúdos endógenos de NH_4^+ bastante inferiores àqueles obtidos quando cultivada em meio contendo amônio. Era de se esperar que, se toda a ureia absorvida pela planta fosse hidrolisada a amônio anteriormente à sua assimilação, não deveria haver diferenças quanto ao conteúdo endógeno desse íon em plantas cultivadas em ambas as fontes de nitrogênio, uma vez que o mecanismo de assimilação nos dois casos seria o mesmo (via GS/GOGAT e/ou GDH). Duas hipóteses foram sugeridas pela autora: ou a ureia absorvida do meio de cultura seria inicialmente estocada e metabolizada lentamente a amônio de acordo com as necessidades fisiológicas das plantas ou a assimilação do nitrogênio presente na molécula de ureia ocorreria por meio de alguma outra via independente da hidrólise pela urease.

Por fim, a ureia, uma vez assimilada, proporciona a essas plantas um melhor crescimento e acúmulo de massa seca, se comparado com as demais fontes inorgânicas de nitrogênio (Mercier e Kerbauy, 1997; Endres e Mercier, 2001). Mas os motivos de tamanha diferença ainda contituem uma questão em aberto. Que *Vriesea gigantea* possua diversas estratégias para absorver e utilizar a ureia com grande eficiência é fato, embora seja ao mesmo tempo intrigante justamente por se tratar de um recurso ocasional e altamente disputado por microorganismos que co-habitam o tanque (ao contrário do amônio, que está disponível de forma mais constante e em maiores concentrações) (Inselsbacher *et al.*, 2007).

Muitos dos mecanismos que explicam a considerável diversidade ecológica de Bromeliaceae, bem como as estratégias adotadas pelos membros dessa família para a utilização de recursos incomuns para a maioria das plantas terrestres, permanecem completamente desconhecidos. Embora essa família represente um material de pesquisa farto e extremamente favorável para estudos de fisiologia devido à sua enorme plasticidade e às estratégias únicas adotadas por suas espécies, o estudo da fisiologia de bromélias ainda é restrito a poucos grupos de pesquisa. Assim, este trabalho foi desenvolvido com o intuito de se compreender parte dos mecanismos referentes à nutrição nitrogenada orgânica dessas plantas, elucidando as estratégias adotadas pela espécie *Vriesea gigantea* para a utilização rápida e eficiente da ureia como fonte de nitrogênio. Foram estudados o possível envolvimento das aquaporinas na absorção de ureia pelos tecidos foliares de plantas de *Vriesea gigantea*, as prováveis vias utilizadas para a assimilação do nitrogênio proveniente dessa fonte orgânica, bem como os possíveis motivos que levariam essa espécie a possuir tamanha preferência por ureia.

Bibliografia

Abendroth A., 1971. Bromeliads and frogs. Journal of Bromeliad Society 21: 83-84.

Benzing D.H, Henderson K., Kessel B., Sulak J, 1976. The absorptive capacities of bromeliad trichomes. *American Journal of Botany* **63** (7): 1009-1014.

Benzing D.H., 1970a. An investigation of two bromeliad myrmecophytes: Tillandsia Butzii Mez, T. caput-medusae E. Morren and their ants. Bulletin of the Torrey Botanical Club 97: 109-115.

Benzing D.H., 1970b. Foliar permeability and the absorption of minerals and organic nitrogen by certain tank bromeliads. *Botanical Gazette* **131**: 23-31.

Benzing D.H., 1973. Mineral nutrition and related phenomena in Bromeliaceae and Orchidaceae. *The Quarterly Review of Biology* **48** (2): 277-290.

Benzing D.H., 1980. The biology of bromeliads. Mad River Press. California.

Benzing D.H., 1987. Vascular epiphytism: taxonomic participation and adaptive diversity. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **74** (2): 183-204.

Benzing D.H., 1990. Vascular epiphyts, general biology and related biota. Ashton, P.S. (ed.), Cambridge, Cambridge University Press.

Benzing D.H., 2000. Bromeliaceae: profile of an adaptative radiation. Cambridge, Cambridge University Press.

Benzing D.H., Renfrow A., 1971a. Significance of the patterns of CO2 exchange to the ecology and phylogeny of the Tillandsioideae (Bromeliaceae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **98**: 322-327.

Benzing D.H., Renfrow A., 1971a. The significance of photosynthetic efficiency to habitat preference and phylogeny among Tillandsioid bromeliads. *Botanical Gazette* **132** (1): 19-30.

Benzing D.H., Renfrow A.,1974. The Mineral Nutrition of Bromeliaceae. *Botanical Gazette* **135** (4): 281-288.

Benzing D.H., Seemann J., Renfrow A., 1978. The foliar epidermis in Tillandsioideae (Bromeliaceae) and its role in habitat selection. *American Journal of Botany* **65** (3): 359-365.

Cambui C.A., Gaspar M., Mercier H., 2009. Detection of urease in the cell wall and membranes from leaf tissues of bromeliad species. *Physiologia Plantarum* **136** (1): 86-93.

Diesel R., 1992. Maternal care in the bromeliad crab Metopaulias depressus: protection of larva from predation by damselfly nymphs. Animal Behavior 43: 308-312.

Endres L., Mercier H., 2001. Influence of nitrogen forms on the growth and nitrogen metabolism of bromeliads. *Journal of Plant Nutrition* **24** (1): 29-42.

Eterovick P.C., 1999. Use and sharing of calling and retreat sites by *Phyllodytes luteolus* in a modified environment. *Journal of Herpetology* **33**: 17-22.

Inselsbacher E., Cambui C.A., Richter A., Stange C.F., Mercier H., Wanek W., 2007. Microbial activities and foliar uptake of nitrogen in the epiphytic bromeliad *Vriesea gigantea*. *New Phytologist* **175** (2): 311-320.

Laessle A., 1961. A micro- limnological study of Jamaican bromeliads. *Ecology* **42**: 499-517.

Lam H.M., Coschigano K.T., Oliveira I.C., Melo-Oliveira R., Coruzzi G.M., 1996. The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 569-593.

Leme E.M.C, Marigo L.C., 1993. Bromélias na natureza. Marigo Comunicação Visual Ltda. Rio de Janeiro. Pág. 183.

Lopez L.C.S., Rodrigues P.J.F.P., Rios R.I., 1999. Frogs and snakes as phoretic dispersal agents of bromeliad ostracods (*Limnocytheridae: Elpidium*) and annelids (*Naididae: Dero*). *Biotropica* **31**: 705-708.

Marschner H., 1995. Mineral nutrition of higher plants. Second edition. Academic Press London.

Mercier, H, 1993. Efeitos de fonts nitrogenadas sobre o desenvolvimento, teores hormonais endógenos, perfis polipeptídicos e isoenzimáticos em três bromélias cultivadas in vitro. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

Mercier H., Kerbauy G.B., Sotta B., Miginiac E., 1997. 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* **20** (3): 387-392.

Nadkarni N.M., Primack R.B., 1989. A comparison of mineral uptake and translocation by above-ground and below-ground root systems of *Salix syringiana*. *Plant and Soil* **113** (1): 39-45.

Nyman L.P., Davis J.P., O'dell S.J., Arditti J., Stephens G.C., Benzing D.H., 1987. Active uptake of amino acids by leaves of an epiphytic vascular plant, *Tillandsia paucifolia* (Bromeliaceae). *Plant Physiology* **83**: 681-684.

Picado C., 1913. Les Bromeliacées epiphytes considérée comme milieu biologique. *Bull. Sci. France Belgique* **47**: 215-360.

Reich A., Ewel J.J., Nadkarni N.M., Dawson T., Evans R.D., 2003. Nitrogen isotope ratios shift with plant size in tropical bromeliads. *Oecologia* **137**: 587-590.

Richardson B. A., Richardson M. J., Scatena F. N., McDowells W. H., 2000. Effects of nutrient availability and other elevational changes on bromeliad population and their invertebrate communities in a humid tropical forest in Puerto Rico. *Journal of Tropical Ecology* **16**: 167-188.

Takahashi C.A., Ceccantini G.C.T., Mercier H., (2007). Differential capacity of nitrogen assimilation between apical and basal leaf portions of a tank epiphytic bromeliad. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **19**(2): 119-126.

Wake D.B., 1987. Adaptative radiation of salamanders in middle American cloud frogs. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **74**: 242-264.

Winkler U., Zotz G., 2009. Highly efficient uptake of phosphorus in epiphytic bromeliads. *Annals of Botany* **103**: 477-484.

Zotz G., Andrade J.L., 1998. Water relations of two co-occurring epiphytic bromeliads. *Journal of Plant Physiology* **152** (4-5): 545-554.

Zotz G., Schultz E., 2008. The vascular epiphytes of a lowland forest in Panama - species composition and spatial structure. *Plant Ecology* **195**:131–141.

CAPÍTULO II

Estariam as aquaporinas envolvidas na absorção de ureia pelos tecidos foliares de *Vriesea gigantea*?

Introdução

A ureia, também conhecida como carbamida, é uma molécula pequena, neutra, embora altamente polar, e que possui um diâmetro de 75,3 Å. Está presente de forma disseminada na natureza, onde se caracteriza como uma fonte de nitrogênio prontamente disponível para o crescimento de diversos organismos, incluindo bactérias, fungos e plantas (Wang *et al.*, 2008). Embora possua baixa solubilidade através de bicamadas lipídicas artificiais ($4x10^{-6}$ cm s^{-1} a 25º C) (Galluci *et al.*, 1971), altas permeabilidades foram observadas em sistemas biológicos, sugerindo o envolvimento de proteínas no transporte transmembrana de ureia (Wieth *et al.*, 1974; Walter e Gutknecht, 1986; Sands *et al.*, 1987; Lande *et al.*, 1995).

Em plantas, sistemas de transporte de ureia só foram identificados há pouco tempo. Foram caracterizados dois mecanismos até o presente: um de alta afinidade, desempenhado pelo homólogo de DUR3, e um de baixa afinidade, desempenhado por algumas aquaporinas. Inicialmente descrita em *Arabidopsis thaliana*, AtDUR3 é uma proteína integral de membrana plasmática que contém 14 domínios transmembrana e que atua como um transportador ativo de ureia, acoplado a um fluxo de prótons (Liu *et al*, 2003). Pertencente à superfamília SSS ("sodium solute symporter"), que compreende mais de uma centena de membros em procariotos e eucariotos relacionados com o transporte de açúcares, aminoácidos, nucleosídeos, inositol, vitaminas e ânions (Reizer *et al.*, 1994; Turk e Wright, 1997; Saier, 2000), a proteína AtDUR3 apresenta alta afinidade e especificidade por ureia (Liu *et al*, 2003).

Enquanto DUR3 apresenta grande potencial para captar ureia disponível na ordem de micromolar, as aquaporinas possuem um maior espectro de absorção. Devido à sua cinética linear de transporte, as aquaporinas são caracterizadas como transportadores de baixa afinidade, dependente da concentração. Descobertas no fim da década de 80 devido à sua enorme abundância em eritrócitos (Denker *et al.*, 1988), as aquaporinas foram, inicialmente, relacionadas ao transporte de água. Na época, esse achado teve um importante impacto nos estudos sobre a permeabilidade de água através de biomembranas. Nos últimos anos, contudo, a capacidade de transporte de outros substratos, muitos deles de enorme significância fisiológica, tem sido identificada, atraindo ainda mais interesse para essas proteínas.

As aquaporinas, pequenas proteínas hidrofóbicas encontradas em animais, plantas, fungos e bactérias, pertencem à grande família das Proteínas Intrínsecas de Membrana (MIP) e mediam o transporte bidirecional de água e/ou outros solutos através das membranas. A maioria delas possui de 250 a 300 aminoácidos (Park e Saier 1996) e massa molecular entre 23 e 31 kDa (Maurel *et al.*, 2008). São caracterizadas por seis domínios transmembrana, 5 alças de ligação e extremidades amino e carboxi-terminais localizadas no lado citoplasmático da membrana. As

aquaporinas possuem duas repetições de três aminoácidos (Asn-Pro-Ala/NPA) presentes em todos os membros da família, que formam uma constrição no centro do poro, além de uma segunda constrição, ainda mais estreita, denominada região aromática/arginina (aromática/R). Essas duas constrições se constituem como "nódulos" hidrofílicos dentro do canal e entram em contato direto com o substrato (Wallace e Roberts, 2004).

Enquanto em mamíferos foram identificadas 10 aquaporinas até o momento (sendo esse o provável número total de genes de MIPs nesse grupo de organismos), no reino vegetal uma simples espécie expressa um número consideravelmente maior de aquaporinas. Em *Arabidopsis thaliana*, por exemplo, 35 genes foram identificados (Wallace e Roberts, 2004), enquanto em arroz, 33 até o momento (Sakurai *et al.*, 2005). Em plantas, a família de MIPs pode ser subdividida em 4 subfamílias distintas, com base na presença de aminoácidos altamente conservados e outras características estruturais, como diferenças no tamanho das extremidades amino e carboxi-terminais (Schäffner, 1998, Johanson *et al.*, 2001): PIPs ("Plasma Membrane Intrinsic Proteins"), TIPs ("Tonoplast Membrane Intrinsic Proteins"), NIPs ("NOD26-like MIP") e SIPs ("Small and Basic Intrinsic Proteins").

As PIPs representam a subfamília com o maior número de membros, sendo 13 em Arabidopsis e arroz (Wallace e Roberts, 2004; Sakurai *et al.*, 2005). A subfamília PIP pode ainda ser subdividida em dois grupos filogenéticos, denominados PIP1 e PIP2, que compartilham um alto grau de homologia (Schäffner, 1998). Eles diferem principalmente em sua porção N- e C-terminal e pelas características de transporte de água, analisadas em diferentes sistemas heterólogos. Os resíduos de aminoácidos que conferem seletividade são similares entre PIP1 e PIP2. Entretanto, as PIP1 apresentam menor permeabilidade à água e funções celulares distintas de PIP2 (Biela *et al.* 1999, Chaumont *et al.* 2000). Apesar da menor permeabilidade, o papel de PIP1 nas relações hídricas em plantas já foi claramente demonstrado em diversos experimentos. Segundo alguns autores, as aquaporinas do tipo PIP1 poderiam ser preferencialmente transportadoras de pequenos solutos ou gases e/ou precisariam ser ativadas para funcionar como canais de água. Mecanismos de regulação como fosforilação já foram demonstrados em diversas isoformas de aquaporinas e podem ser um dos mecanismos moleculares de controle da atividade destes canais (Johansson *et al.* 1998, Tornroth-Horsefield *et al.* 2005). Também, membros de TIP e NIP podem ser classificados em vários subgrupos, ainda mais divergentes.

Além de constituir uma família multigênica, as aquaporinas são proteínas muito abundantes. Em *Arabidopsis thaliana*, por exemplo, as proteínas codificadas por 5 genes de subfamília PIP1 representam pelo menos 1% do conteúdo protéico da membrana plasmática

(Robinson *et al.*, 1996b). Quantidades ainda maiores foram encontradas em folhas de espinafre, onde 10 e 15% do total de proteínas de membrana de tonoplasto e membrana plasmática, respectivamente, eram representadas por TIPs e PIP2 (Karlsson *et al.*, 2000).

Essa grande diversidade estrutural de aquaporinas tem sido associada a propriedades de transporte e/ou regulação distintas, desempenhando funções específicas em diferentes membranas celulares, tecidos e órgãos, tanto em períodos de curta duração (ao longo do ciclo circadiano) quanto durante as diferentes fases do desenvolvimento, bem como em resposta a diferentes estímulos e estresses (Grote *et al.*, 1998; Baiges *et al.*, 2002; Lopes *et al.*, 2003; Aroca *et al.*, 2006; Flexas *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2007; Kaldenhoff *et al.*, 2008; Maeshima e Ishikawa, 2008; Mut *et al.*, 2008; Uehlein e Kaldenhoff, 2008; Uehlein *et al.*, 2008).

Dentre todas essas funções, a capacidade diferencial de transporte entre os diferentes membros dessa família protéica tem tido grande destaque. Nos últimos 12 anos, tem-se demonstrado o papel das aquaporinas no transporte de uma grande variedade de pequenos solutos, como ureia, glicerol, CO_2, amônia, ácido bórico, ácido salicílico, peróxido de hidrogênio, dentre outros (Baiges *et al.*, 2002; Beitz *et al.*, 2006; Biela *et al.*, 1999; Gerbeau *et al.*, 1999; Holm *et al.*, 2004; Jahn *et al.*, 2004; Gaspar *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003; Meinild *et al.*, 1998; Tyerman *et al.*, 1999; Tyerman *et al.*, 2002; Uehlein *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2006; Takano *et al.*, 2006). Em particular, a capacidade das aquaporinas em transportar ureia foi primeiramente observada em células renais de animais (Ishibashi *et al.*, 1994). Posteriormente, essa propriedade também foi verificada em plantas, onde aquaporinas relacionadas com o transporte de ureia foram isoladas do tonoplasto (Gerbeau *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2003) e da membrana plasmática (Otto & Kaldenhoff, 2000; Gaspar *et al.*, 2003) de diferentes espécies.

Embora em mamíferos as aquaporinas transportadoras de ureia possam ser preditas por meio de análises filogenéticas, em plantas essa relação não é tão óbvia (King *et al.*, 2004). Recentemente, a especificidade das aquaporinas por diferentes substratos foi relacionada a mecanismos variados, incluindo a exclusão por tamanho nos dois principais pontos de constrição da proteína (grupo aromático/R e NPA) e o reconhecimento específico do substrato mediado por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas em posições espacialmente definidas (Fujiyoshi *et al.*, 2002; Tajkhorshid *et al.*, 2002; Beitz *et al.*, 2006). Enquanto os aminoácidos NPA, sequência assinatura desta família de proteínas, atuam como uma barreira eletrostática, essencial para a exclusão de prótons (de Groot *et al.*, 2003; Chakrabarti *et al.*, 2004; Ilan *et al.*, 2004; Kato *et al.*, 2006), a região aromático/R é a parte mais estreita do canal e contitui o principal filtro de seletividade (Fu *et al.*, 2000; Sui *et al.*, 2001). Foi verificado que os resíduos nessa região

diferem entre os membros da família de aquaporinas, resultando em constrições com tamanho e hidrofobicidade variadas (Wallace e Roberts, 2004).

Para algumas espécies vegetais, a ureia assume um papel de grande importância biológica. É o caso de algumas espécies de bromélias epífitas formadoras de tanque, por exemplo, que utilizam a ureia como fonte preferencial de nitrogênio, uma característica incomum para a grande maioria das plantas terrestres e geralmente associada a questões evolutivas (Mercier *et al.*, 1997; Endres e Mercier, 2001). Essas bromélias possuem as folhas distribuídas em roseta e sobrepostas parcialmente, formando, entre as bases foliares, reservatórios de água que são frequentemente visitados por animais. Dentre esses se destacam os anfíbios, que, por meio de excretas, disponibilizam ureia às plantas, recurso rico em nitrogênio. Outra característica bastante peculiar dessas plantas é a divisão espacial de funções dentro de uma mesma folha: enquanto a base é associada principalmente à absorção de nutrientes, o ápice assume o papel fotossintético e de assimilação de N (Takahashi *et al.*, 2007).

Estudos mais detalhados sobre a absorção de ureia foram feitos para a espécie *Vriesea gigantea*, verificando-se a alta capacidade dos tecidos foliares em captar a ureia como molécula intacta, e segundo uma cinética linear (mesmo na presença de altas concentrações de ureia) (Inselsbacher *et al.*, 2007). Além disso, o envolvimento de transportadores protéicos nesse processo foram evidenciados por meio do uso dos inibidores $HgCl_2$ (10 μM) e CCCP (20 μM), os quais reduziram em 78 e 52% a absorção de ureia (Inselsbacher *et al.*, 2007). Levando-se em consideração essas características de influxo, o transporte de ureia via poros foi sugerido, ocorrendo provavelmente por meio de aquaporinas. Embora já se tenha caracterizado a capacidade de algumas aquaporinas em transportar ureia, *Vriesea gigantea* seria a primeira espécie para a qual esse processo teria um papel biológico importante em plantas, o que a torna um modelo de estudo bastante interessante e valioso nesse campo de pesquisa.

Objetivos

Considerando o grande potencial de *Vriesea gigantea* em absorver ureia, esse estudo teve o objetivo de verificar o possível envolvimento de aquaporinas durante o seu transporte transmembrana. Para tanto, cDNAs completos de aquaporinas de membrana plasmática (PIP) e de membrana de tonoplasto (TIP) foram inicialmente clonados a partir dos tecidos foliares de *Vriesea gigantea* e suas sequências comparadas com as de outras espécies vegetais. O potencial de transporte de ureia das aquaporinas isoladas foi analisado em regiões foliares distintas (ápice e base) e em resposta a diferentes fontes de nitrogênio (ausência de N, ureia e amônio + nitrato) por meio de experimentos de expressão gênica.

Material e Métodos

I) Obtenção de sequências de cDNA parciais de aquaporinas

I-1) Construção dos iniciadores

Os iniciadores utilizados para a amplificação dos genes de aquaporinas foram baseados em sequências já isoladas em outras espécies de vegetais. Deu-se preferência às espécies pertencentes à ordem Poales, na qual se inclui a família Bromeliaceae, devido à maior similaridade entre suas sequências gênicas. Para a construção dos iniciadores foram escolhidas regiões conservadas, de preferência próximas ao início e final das regiões codantes, de modo a se obter sequências de interesse com um maior número de bases (Figs.1 A e B).

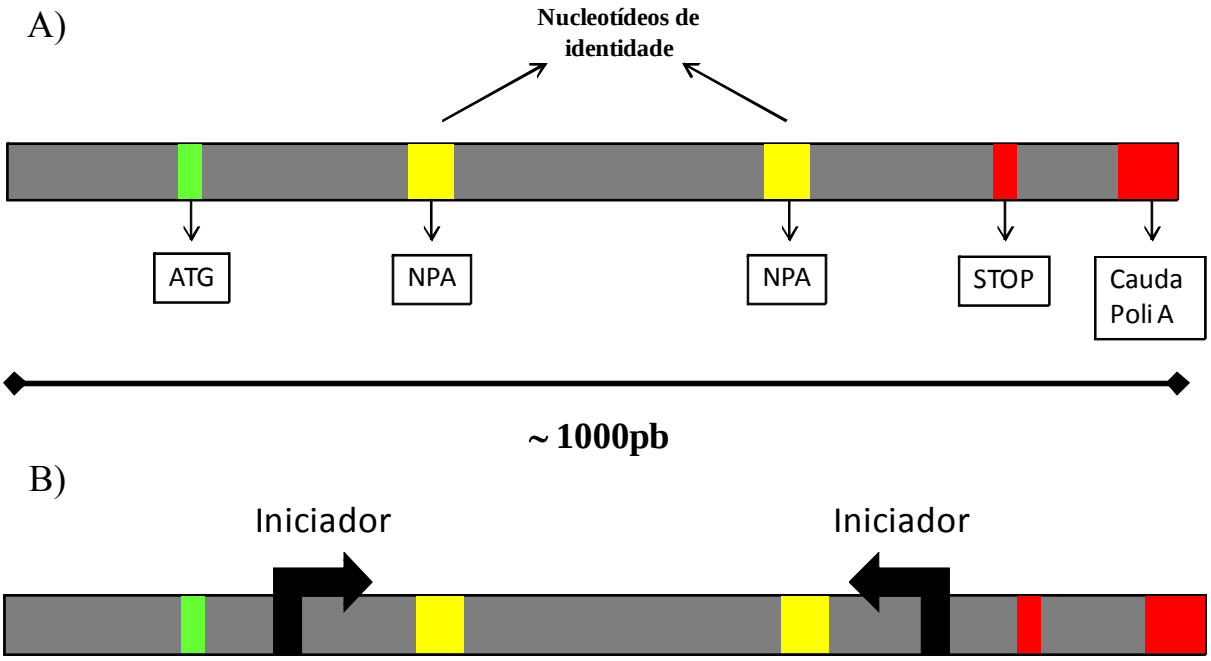


Figura 1: A) desenho esquemático da sequência codificadora de aquaporinas, evidenciando os nucleotídeos que conferem sua identidade (codificadores dos aminoácidos NPA, cuja localização é no interior do poro dessa proteína), bem como os códons de início (ATG) e o de parada (STOP) da transcrição gênica; B) representadas pelas setas pretas, as regiões escolhidas para a construção dos iniciadores encarregados de amplificar a região central dos genes de interesse por RT-PCR.

Os iniciadores utilizados para a amplificação de aquaporinas potencialmente envolvidas no transporte de ureia foram: para PIP1- 5'ACGACAAGGACTACAAGGAGCC 3' e 5'GCCRACCCAGAAGATCCARTG3' e para TIP2 - 5'GCSAACATCTCCGGCGGCCA 3' e 5'GCSAACATCTCCGGCGGCCA 3'.

I-2) Extração de RNA total

Plantas de *Vriesea gigantea* de aproximadamente 2 anos de idade foram inicialmente cultivadas durante 10 dias em meio de cultura sem nitrogênio, de forma a esgotar parte das suas reservas nitrogenadas. Após esse período, as plantas foram transferidas para um novo meio de cultura contendo 5 mM de ureia como fonte exclusiva de N, onde permaneceram por 16 horas. Esse foi o tempo estimado para que os genes relacionados à absorção de ureia (mais especificamente as aquaporinas transportadoras dessa fonte de N) estivessem expressos em abundância. As folhas foram então coletadas, divididas em porções apical e basal, e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido, sendo em seguida maceradas e estocadas a -80ºC.

O RNA total dos tecidos foi isolado com o reagente Trizol® (Invitrogen), segundo as instruções do fabricante. O RNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro e a razão entre os comprimentos de onda 260 e 280 nm, analisada. A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose 1% em tampão TAE (40 mM de tampão Tris-acetato, 1 mM EDTA) por meio da visualização das bandas referentes ao RNA ribossomal 28S e 18S.

I-3) Síntese da primeira fita de cDNA

O cDNA foi obtido a partir do RNA total com auxílio do kit Superscript First-Strand Synthesis® (Invitrogen), segundo normas do fabricante. Para tal, 1 μg do RNA total extraído dos tecidos foliares foi misturado a 500 ng de Oligo (dT)12-18 e 1 mM de dNTP. A reação foi mantida a 65ºC por 5 minutos e imediatamente transferida para gelo por um minuto. Adicionou-se tampão de reação contendo 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl, 5 mM de $MgCl_2$, 10 mM de DTT, 40 unidades de inibidor de RNase e 50 unidades de transcriptase reversa do tipo II. A reação foi mantida por 50 minutos a 42 ºC seguidos de 15 minutos a 70ºC. A remoção do RNA original foi feita por meio de incubação dessa reação a 37ºC por 20 minutos com 2 unidades de RNase H.

I-4) Obtenção das sequências parciais de aquaporinas

Para amplificação dos cDNAs de interesse, foi utilizada a enzima Platinum® Pfx DNA Polymerase (Invitrogen) e os pares de iniciadores gene-específicos descritos anteriormente (item I-1). A reação consistiu em 2 µL de cDNA fita simples, 5 µL de tampão de reação, 300 µM de dNTP, 1 mM de $MgSO_4$, 0,3 µM de iniciadores e 1,25 unidades de Platinum® Pfx DNA Polymerase (Invitrogen). As condições da reação PCR para amplificação do cDNA foram: 4 minutos a 94ºC; seguido por 35 ciclos 94ºC durante 45 segundos, 58,1ºC (PIP) ou 61,9ºC (TIP) durante 60 segundos e 68ºC por 90 segundos. A extensão final foi realizada a 68ºC durante 10 minutos.

Para a TIP, dez microlitros da primeira amplificação PCR foram reamplificados com as seguintes condições: 94ºC durante 2 minutos, seguidos de 34 ciclos de amplificação (94ºC durante 45 segundos, 58,1ºC durante 60 segundos e 72ºC durante 90 segundos). A extensão final foi realizada a 72ºC durante 10 minutos (Taq PCR System).

Os produtos resultantes da PCR foram visualizados em gel de agarose 1% em tampão TAE (40 mM de tampão Tris-acetato, 1 mM EDTA) para verificação de tamanho dos fragmentos amplificados. Esses fragmentos foram eluídos do gel de agarose e purificados com o auxílio do kit QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen). Em seguida, foram quantificados em gel de agarose 1% em tampão TAE, juntamente com o marcador Low DNA Mass Ladder (Invitrogen).

I-5) Clonagem dos fragmentos obtidos por PCR

Os fragmentos de cDNA purificados foram então submetidos à ligação em vetor pGEM® - T Easy, segundo as orientações sugeridas pelo fabricante. Fragmentos com extremidade "Blunt" (produzidos pela ação da Platinum® *Pfx* DNA Polymerase) foram previamente modificados pela adição de extremidade A, possibilitando dessa forma sua ligação ao vetor. Para tanto, uma alíquota de 7 µL do fragmento purificado foi incubada 70 ºC por 30 minutos em tampão Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), contendo 50 mM de KCl, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dATP e 5 unidades de *Taq* DNA polimerase.

Otimizou-se a ligação utilizando a proporção de 3 partes de inserto para 1 parte de vetor, calculada por meio da seguinte fórmula:

$$ng\ inserto = \frac{ng\ do\ vetor \times tamanho\ do\ inserto\ (Kb)}{tamanho\ do\ vetor\ (Kb)} \times razão\ \frac{inserto}{vetor}$$

A ligação foi realizada durante 16 horas a 4ºC, em tampão Tris-HCl (pH 7,8) 30 mM, contendo 10 mM de $MgCl_2$, 10 mM de DTT, 1 mM de ATP, 1% de polietilenoglicol e 3 unidades de T4 DNA ligase.

Os vetores foram posteriormente utilizados na transformação de bactérias competentes de *E. coli* JM109 (Promega). Um volume de 2 µL do produto da ligação foi adicionado a 50 µL de bactérias em suspensão, seguido de incubação em gelo por 20 minutos e choque térmico a 42 ºC por 45 segundos. Após o choque térmico, as bactérias foram transferidas imediatamente para o gelo, onde permaneceram por 2 minutos. Foram então adicionados às bactérias 950 µL de meio SOC em temperatura ambiente (2% de bacto-triptona, 0,5% de extrato de levedura, 2 mM glicose, 2 mM de Mg^{2+}, 1 mM NaCl e 250 µM de KCl), incubando-as a 37 ºC com agitação de 150 rpm durante 90 minutos. Foram plaqueados 150 µL de cada transformação em meio LB contendo 100 µg mL^{-1} de amplicilina, 40 µg mL^{-1} de X-Gal e 40 µg mL^{-1} de IPTG. As placas foram incubadas a 37 ºC por 16 horas. Colônias bacterianas brancas de cada transformação foram repicadas em meio LB líquido contendo 50 µg mL^{-1} de ampicilina, e foram mantidas a 37ºC com agitação de 225 rpm por 16 horas.

Para avaliar o tamanho dos insertos nos plasmídeos, 5 µL de cada cultura foram amplificados por PCR com os iniciadores M13 direto e reverso que se anelam no vetor utilizado. As condições da reação de PCR foram: 94ºC durante 3 minutos, seguido por 35 ciclos de 94ºC durante 45 segundos, 50ºC durante 60 segundos e 72ºC durante 90 segundos. A extensão final foi realizada a 72ºC durante 10 minutos. Quinze microlitros de reação PCR foram analisados em gel de agarose 1% em tampão TAE (40 mM de tampão Tris-acetato, 1 mM EDTA).

Clones contendo insertos de tamanho desejado foram selecionados para extração do DNA plasmidial com a utilização do kit S.N.A.P.™ Mini Prep (Invitrogen), segundo as orientações do fabricante. Ao restante da cultura foram adicionados 250 µl de glicerol, para manutenção de culturas permanentes a -80ºC.

I-6) Sequenciamento das sequências isoladas

Para a reação de sequenciamento, foram adicionados a 100 ng de DNA plasmidial purificado 2 µL do reagente Big Dye® Terminator v.3.1 (Applied Biosystems), 3 µL do tampão de sequenciamento (5X) fornecido pelo kit e 3pmol de iniciadores M13 direto e reverso. Em seguida, as amostras foram desnaturadas a 96 ºC por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificação (96 ºC durante 45 segundos, 50 ºC durante 30 segundos e 60 ºC por 4 min), de acordo com recomendações do Serviço de Sequenciamento de DNA do IQ-USP.

O DNA das amostras foi precipitado com NaOAc 3 M (pH 5,2) e etanol 96% gelado, sendo as amostras mantidas em gelo durante 15 minutos e, em seguida, centrifugadas a 4000 rpm por 30 min, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o resíduo foi lavado com etanol 70% gelado, sendo a seguir seco em temperatura ambiente por 1 hora na ausência de luz. As amostras foram sequenciadas no equipamento ABI PRISM® 3100 GeneticAnalyzer (Hitachi) do IQ-USP.

I-7) Verificação das sequências gênicas obtidas

Os dados de sequenciamento dos clones selecionados foram comparados com as sequências disponíveis no banco de sequências GenBank por meio da ferramenta BLASTN 2.2.21 (Basic Local Alignment Search Tool), segundo Zhang *et al.* (2000), e disponível em http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi.

II) Obtenção da sequência completa dos cDNAs de interesse

A obtenção da sequência de cDNA completa das aquaporinas de interesse foi possibilitada por meio de circularização do pool de cDNA extraído de *Vriesea gigantea* e subsequente realização de reações de amplificação utilizando iniciadores invertidos em regiões já conhecidas dos genes, pela técnica conhecida como IPCR (Fig. 2).

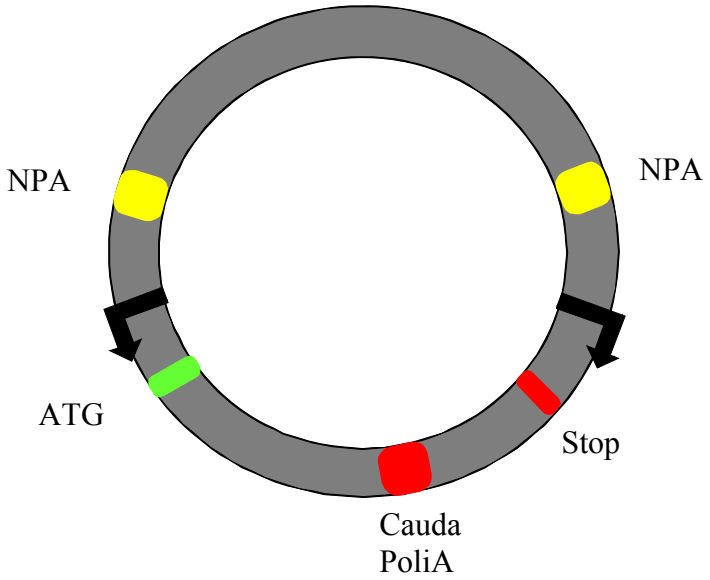


Figura 2: com base nas sequências de aquaporinas isoladas, iniciadores específicos (representados pelas setas pretas) foram utilizados para a obtenção das extremidades 5' e 3' dos cDNAs por meio da realização de RT-PCR inversa, possível após a circularização dos cDNAs de

interesse. Conhecendo-se a sequência completa, primers específicos foram desenhados nas regiões não codantes de cada gene para a obtenção do cDNA completo .

II-1) Construção dos iniciadores

Uma vez conhecidas as sequências parciais dos genes de aquaporinas isolados de *Vriesea gigantea* (PIP1 e TIP2), foram escolhidas então regiões próximas às suas extremidades para a construção dos iniciadores invertidos a serem utilizados para a obtenção da porção ainda desconhecida dos genes. Os iniciadores desenhados para PIP1 foram 5'CTA TCCCCGCCCTGTAGAATGAC 3' e 5' GCTTTGCTGTCTTCCTTGTCCAC 3', e para TIP2 foram 5'CGGCGAAGACGAACAGTAGAGTAG 3' e 5'GATTTGACACACC CACCCACG 3'.

II-2) Síntese da primeira fita de cDNA

Foram utilizados 10 μg de RNA total para a síntese de cDNA. O procedimento utilizado foi similar ao descrito no item I-3, exceto pela última etapa de tratamento da amostra com RNase H, a qual foi omitida. Dessa forma, manteve-se o molde de RNA original.

II-3) Obtenção de cDNA dupla fita

A dupla fita de cDNA foi sintetizada utilizando-se como molde a primeira fita de cDNA + RNA, produto da reação descrita no item anterior, em reação catalisada pela DNA polimerase I. Essa reação consistiu na incubação, durante 2 horas a 16 ºC, do produto obtido com a reação de síntese da primeira fita de cDNA, em tampão de reação da DNA polimerase I contendo 21,4 unidades de DNA polimerase I, 12 unidades de RNAse H e 167 μM de dNTP.

Após incubação, a dupla fita de cDNA foi purificada por meio de adição de 120 μL de fenol/clorofórmio (1:1, v/v). A mistura foi centrifugada durante 15 minutos a 14.000 rpm em temperatura ambiente e à fase superior, transferida para outro tubo, foi adicionado 1 volume de clorofórmio (v/v). Repetiu-se a centrifugação e a nova fase superior foi coletada e adicionada de 3 volumes de etanol 100%, 0,1 volume de NaAc 3M (pH 7,0) e 1 μL de glicogênio, processo esse realizado para a precipitação do cDNA. Após 1 hora a -20 ºC, o material foi centrifugado a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4 ºC e a fase aquosa descartada. O precipitado formado foi lavado com 100 μL de etanol 70% e recentrifugado como no passo anterior. Após esse procedimento, o precipitado de cDNA dupla fita foi seco e ressuspendido em 50 μL de água.

II-4) Circularização do cDNA dupla fita

O cDNA dupla fita purificado foi circularizado por meio de reação catalisada pela T4 DNA ligase. Para a ligação, foram adicionados 50 μL do cDNA dupla fita purificado, 25 unidades de T4 DNA ligase (Promega) e 50 μL de tampão de reação da enzima T4 ligase, num volume final de 500 μL. O material foi incubado a 15 ºC durante 16 horas e em seguida submetido à precipitação com 0,1 volume de NaAc 3M (pH 5,2) e 1 volume de isopropanol. A mistura foi centrifugada a 11.000 rpm durante 15 minutos e o precipitado foi lavado com 500 μL de etanol 70%. As amostras foram novamente centrifugadas a 11.000 rpm durante 5 minutos e o material precipitado foi seco e ressuspendido em 20 μL de água. Para assegurar a completa dissolução do DNA, as amostras foram incubadas a 50 ºC durante 5 minutos. O cDNA dupla fita circularizado foi utilizado na reação de PCR com iniciadores invertidos.

II-5) Obtenção das regiões 5'e 3' dos cDNAs

Utilizando-se o cDNA dupla fita circularizado e os iniciadores invertidos descritos no item II-1, deu-se sequência à obtenção das regiões ainda desconhecidas dos genes de interesse (porções inicial e terminal das sequências de aquaporinas). O procedimento adotado para as reações de PCR foi idêntico àquele utilizado para a obtenção da região central dos genes, como descrito no item I- 4, com exceção da temperatura de anelamento que foi específica para cada par de iniciadores utilizado. As temperaturas de anelamento utilizadas para PIP1,5 e TIP2 foram 58 ºC e 56 ºC, respectivamente.

Os produtos resultantes da PCR foram visualizados em gel de agarose 1% em tampão TAE para verificação de tamanho dos fragmentos amplificados. Esses fragmentos foram eluídos do gel de agarose e purificados com o auxílio do kit QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen). Em seguida, foram quantificados em gel juntamente com o marcador Low DNA Mass Ladder (Invitrogen).

II-6) Clonagem dos fragmentos obtidos por PCR, sequenciamento das sequências isoladas e verificação das sequências gênicas obtidas

Os procedimentos utilizados para a realização dessas etapas foram exatamente os mesmos adotados durante a obtenção da porção central dos genes de aquaporinas, descritos nos items I-5, I-6 e I-7 deste capítulo.

II-7) Obtenção e clonagem dos cDNAs completos de aquaporinas

Tendo-se conhecimento das sequências de nucleotídeos das regiões centrais e 5'e 3' das aquaporinas PIP1 e TIP2, o próximo passo foi a obtenção e clonagem dos cDNAs completos. Para tanto, iniciadores específicos para cada gene, desenhados de modo a amplificar toda a região codante (incluindo a ATG e o códon de parada), foram utilizados. Para PIP1 utilizou-se o par de iniciadores 5' GAGAGAGAGAGAGAGGAAATGGAG 3' e 5' GACAG ATGAGGAATGGAAGCAAG 3' e para TIP2 os iniciadores 5' CTCGAAGTAGA ACCTAGCCATG 3' e 5' TCAAGGATAATCACTAGCTGACAC 3'. As regiões escolhidas para a síntese desses iniciadores e as sequências completas de nucleotídeos obtidas com a montagem das sequências parciais clonadas encontram-se disponíveis no anexo VII-5 A e B.

Os procedimentos empregados para a amplificação dos genes de interesse, sua clonagem e sequenciamento foram os mesmos descritos nos item I-4 a I-7 deste capítulo.

III) *Southern blot*

O número de cópias dos genes PIP1,5 e TIP2 no genoma de *Vriesea gigantea* foi verificado por meio da realização da análise de *Southern blot*, procedimento esse descrito abaixo.

III-1) Extração do DNA genômico

Para a extração do DNA genômico, amostras de 2 g de tecidos foliares de *Vriesea gigantea*, pulverizadas em nitrogênio líquido, foram adicionadas de 27 mL de tampão de extração Tris-HCl 100 mM (pH 7,5) contendo 700 mM de NaCl, 50 mM de EDTA (pH 8,0), 1% de CTAB (m/v) e 140 mM de beta-mercaptoetanol. As amostras foram homogeneizadas delicadamente e incubadas a 65 ºC durante 90 minutos. Após esse tempo de incubação, as amostras foram resfriadas até atingirem a temperatura ambiente, adicionadas de 13,5 mL de clorofórmio/octanol (proporção de 24:1, v/v) e misturadas suavemente por inversão durante 10

minutos. As amostras foram centrifugadas a 2500 g por 10 minutos em temperatura ambiente e a fase aquosa coletada e adicionada de 13,5 mL de clorofórmio/octanol (24:1). Após mistura delicada durante 10 minutos, as amostras foram novamente centrifugadas. A fase aquosa foi então adicionada de RNAse A, para a degradação do RNA extraído juntamente com o DNA, e incubada durante 2 horas em temperatura ambiente. Após esse procedimento, o DNA presente nas amostras foi precipitado com a adição de 18 mL de isopropanol e incubação a -20 ºC durante 16 horas. O material foi centrifugado a 2500 rpm por 15 minutos a 4 ºC e o precipitado formado lavado com 5 mL de etanol 70%. A centrifugação foi repetida, a fase aquosa descartada, o precipitado formado foi seco e posteriormente dissolvido em 500 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM).

O DNA foi quantificado em espectrofotômetro e a razão entre os comprimentos de onda 260 e 280 nm, analisada. Sua integridade, bem como a confirmação da ausência de RNA, foram verificados em gel de agarose 1% em tampão TAE.

III-2) Digestão do DNA genômico com enzimas de restrição

Dez µg do DNA extraído foram digeridos com um excesso de 5x das enzimas de restrição EcoRI, EcoRV, HindIII e SacI (Invitrogen) na presença de 2,5 mM espermidina em um volume final de 400 µL. A reação foi incubada durante 16 horas a 37ºC. A completa digestão do DNA genômico foi verificada em gel de agarose 1% em tampão TAE. A reação foi interrompida com a adição de 16 µL de EDTA 0,5 M (pH 8,0).

O DNA digerido foi então precipitado adicionando-se à reação 0,1 volume de acetato de sódio 3 M (pH 5,2) e 2,5 volumes de etanol. O material foi mantido a -70 ºC durante 1 hora e em seguida centrifugado a 11.000 rpm por 30 minutos a 4 ºC. O DNA precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70% e a centrifugação repetida. O precipitado foi então seco e ressuspendido em 25 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM).

III-3) Eletroforese e transferência do DNA digerido para membranas Hybond-N^+

As amostras de DNA digerido foram adicionadas de 0,1 volumes de tampão de amostra (10X) e submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE 1X, juntamente com o marcador de peso molecular 1Kb Ladder (Invitrogen). A corrida do gel foi realizada a 60V por aproximadamente 4 horas. O gel foi fotografado juntamente com uma régua milimetrada, com a finalidade de se dispor de referência do tamanho real. O DNA foi depurinado colocando-se o gel

em solução de HCl 0,25 N durante 10 minutos. A desnaturação foi feita pela lavagem do gel em solução de NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 N por 15 minutos, procedimento esse realizado duas vezes. O gel foi neutralizado em solução contendo Tris-HCl 1 M (pH 7,5) e NaCl 1,5 M durante 15 minutos, procedimento esse realizado duas vezes. Os diferentes tratamentos foram intercalados com lavagens do gel em água destilada. O DNA foi transferido por capilaridade durante 16 horas para uma membrana de náilon Hybond-N+ (Amersham), em tampão SSC (NaCl 0,15 M; citrato trissódico 0,015 M) 2 vezes concentrado. Após a transferência, a membrana foi lavada em solução de SSC 2X por 10 minutos para remoção dos vestígios de agarose e foi mantida em temperatura ambiente até secagem completa. O DNA foi fixado à membrana por irradiação de luz UV (254 nm, a 120.000 $\mu J/cm^2$) durante 2 minutos.

III-4) Obtenção e marcação das sondas de aquaporinas

As sondas empregadas para a realização do *Southern blot* foram obtidas por meio da amplificação de fragmentos de cDNA utilizando-se iniciadores desenhados, de preferência, nas regiões não codantes dos genes de interesse. Devido ao pequeno tamanho das regiões não codantes do gene TIP2, não foi possível selecionar iniciadores específicos para este gene. Nesse caso, optou-se por utilizar como sonda o cDNA completo da TIP2. Os iniciadores utilizados para a amplificação da sonda específica PIP1 foram 5' CAGAGCCATCCCATTTGAGAGC 3' e 5'CAACAAGAGCCCTGGACAGAAC 3' e para TIP2 foram 5' CTCGAAGTAGAACCTAGC CATG3' e 5' TCAAGGATAATCACTAGCTGACAC 3'. Nas figuras 1A e 2A do anexo VII-5 encontram-se as regiões selecionadas para o desenho desses iniciadores, bem como as regiões referentes às sondas.

Os fragmentos amplificados por PCR foram purificados do gel de agarose, clonados e sequenciados, procedimentos esses descritos nos itens I-4 a I-7 deste capítulo. Após sequenciamento, os plamídeos contendo os insertos de interesse foram extraídos e purificados, sendo então submetidos a uma nova PCR para a amplificação destes insertos, os quais foram isolados, purificados e quantificados.

Os fragmentos de DNA utilizados como sonda foram marcados radioativamente com $\alpha[P^{32}]$dATP segundo as especificações do kit de marcação Random Primer Extension (Invitrogen). A remoção dos nucleotídeos não incorporados se deu por purificação das sondas marcadas em coluna Sephadex-G50 (marca), equilibrada segundo Sambrook e Russell (2001).

III-5) Hibridização da membrana e análise da marcação

As membranas foram pré-hibridizadas durante 90 minutos a 60°C em solução contendo SSC 3X; EDTA 0,5 mM; 0,05% de Ficoll; 0,05% de PVP, 0,1% de SDS e 0,1 mg mL^{-1} de solução de DNA de esperma de salmão desnaturado. Em seguida, adicionou-se à solução de pré-hibridização a sonda marcada radioativamente. A hibridização foi realizada a 60°C por 14 a 16 horas. Após hibridização, as membranas foram lavadas em solução contendo SSC 3X e 0,1% de SDS durante 30 minutos a 60ºC e, posteriormente, em solução de SSC 1X e 0,1% de SDS por 60 minutos. As membranas foram expostas a filmes de raio-x em cassetes contendo intensificadores. As autoradiografias foram escaneadas e o número de bandas analisado.

IV) *Slot blot*

Com o intuito de se verificar a expressão gênica das aquaporinas de interesse em diferentes condições nitrogenadas e em porções foliares distintas (ápice e base) de *Vriesea gigantea*, plantas de 2 anos de idade foram inicialmente privadas de nitrogênio durante duas semanas e posteriormente transferidas para meios de cultura contendo 5 mM de ureia (10 mM de N), 10 mM de fontes nitrogenadas inorgânicas (meio Knudson, contendo amônio e nitrato) ou para meio ausente de nitrogênio (controle negativo). Coletas foram realizadas a cada 2 horas, durante 24 horas, e o material vegetal foi rapidamente lavado em água destilada para a retirada de resquícios de meio de cultura, sendo então as folhas divididas em porções apical e basal e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Os tecidos foram macerados com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino e armazenados a -80 ºC.

IV-1) Extração do RNA total

O RNA total dos tecidos foi isolado com o reagente Trizol® (Invitrogen), segundo as instruções do fabricante. O RNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro e a razão entre os comprimentos de onda 260 e 280 nm, analisada. A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose 1% contendo TAE 1X por meio da visualização das bandas referentes do RNA ribossomal 28S e 18S.

IV-2) Preparo das amostras e aplicação em membrana Hybond-N^{+}

Alíquotas referentes a 5 μg de RNA total de cada amostra foram inicialmente desnaturadas pela adição de 30 μL de SSC 20X e 20 μL de formaldeído e incubação a 60 ºC durante 30 minutos, sendo em seguida transferidas para o gelo. Como controle positivo, utilizou-se plasmídeos contendo as sondas de interesse nas concentrações de 0,5 a 20 ng de DNA, sendo esse material desnaturado por incubação de 5 minutos em água fervente e transferência imediata para gelo.

As amostras foram aplicadas em membranas de náilon Hybond-N^+ (previamente umedecidas com água tratada com DEPC e em seguida com tampão SSC 10X) utilizando-se o molde de aplicação em *slots* e bomba de vácuo a uma pressão negativa de 30 mm de Hg. O RNA ou DNA foram fixados à membrana por meio de secagem em estufa a 80 ºC durante 2 horas.

IV-3) Obtenção e marcação das sondas de aquaporinas

As sondas utilizadas foram as mesmas empregadas para a análise por *Southern blot*, cujos procedimentos de obtenção e marcação encontram-se descritos no item III-4.

IV-4) Hibridização das membranas e análise da marcação

As membrana foram pré-hibridizada durante 90 minutos a 42ºC em solução de SSPE 5X contendo 50% de formamida (v/v), 5X Denhardt's e 0,1% de SDS. Posteriormente, adicionou-se à solução de pré-hibridização a sonda marcada radioativamente. A hibridização foi realizada a 42ºC por 14 a 16 horas. Após hibridização, as membranas foram lavadas em solução contendo SSPE 2X e 0,1% de SDS durante 30 minutos a 42ºC e, posteriormente, em solução de SSPE 1X a e de 0,1% de SDS por 60 minutos. As membranas foram expostas a filmes de raio-x e as autoradiografias foram escaneadas e analisadas por densitometria com o auxílio do programa computacional ImageJ 1.41o (Waney Rasdand, National Institutes of Health, USA).). Os valores de expressão dos genes de interesse foram corrigidos com base nos valores de expressão do gene constitutivo 18S, obtidos por hibridização das membranas com a sonda heteróloga de *Ananas comosus*.

Resultados

Dois cDNAs completos codificando duas diferentes MIPs foram isolados de *Vriesea gigantea* pela estratégia de RT-PCR. O cDNA denominado *VgPIP1,5* (de acordo com a nomenclatura proposta em 2001 por Johansson *et al.*) possui 1140 pb e ORF de 867 pb, flanqueada por sequências 5'e 3'não codantes de 22 e 251 pb, respectivamente. A sequência de proteína deduzida tem 288 aminoácidos, 6 regiões transmembrana, peso molecular estimado de 30,7 kDa e pI 9,14. Quinze sítios putativos de fosforilação foram encontrados na proteína, conforme demonstrado na figura 1B do anexo VII-5.

O cDNA denominado *VgTIP2* possui 871 pb e ORF de 750 pb, flanqueada por sequências 5'e 3'não codantes de 47 e 74 pb, respectivamente. A sequência de proteína deduzida tem 249 aminoácidos, 6 regiões transmembrana, peso molecular estimado de 25,2 kDa e pI 5,33. Nove sítios putativos de fosforilação foram encontrados na proteína, conforme demonstrado na figura 2B do anexo VII.

De forma geral, nas análises de blast (não mostradas), tanto VgPIP1,5 quanto VgTIP2 apresentaram maior identidade com MIPs de monocotiledôneas. A sequência de proteína de VgPIP1,5, em particular, possui identidade de 95% com aquaporina isolada de *Ananas comosus* (AcAQP1, n^{o} de acesso ACB56912), seguido por *Oryza sativa* (OsPIP1,2, n^{o} de acesso Q7XSQ9) (93%) e *Zea mays* (ZmPIP1,2, n^{o} de acesso ACG37183) (92%). Ao alinhá-la com sequências de proteínas da subfamília PIP1 de *Zea mays* e *Arabidopsis thaliana*, espécies que possuem genoma completo sequenciado e cuja família multigênica completa já foi anotada, uma maior identidade com a proteína PIP1,5 destas espécies pode ser observada (Fig. 3).

Já VgTIP2 possui maior identidade com proteínas de *Populus trichocarpa* (PtTIP, n^{o} de acesso XP_002298233) (84%), *Oryza sativa* (OsTIP2,2, n^{o} de acesso Q5Z6FO) (82%), e *Lolium perenne* (LpTIP2,1, n^{o} de acesso ACR45958) (81%). O seu alinhamento com as proteínas TIP2 de *Zea mays*, *Triticum aestivum* e *Arabidopsis thaliana* mostrou maior similaridade com as proteínas TIP2 de trigo e com TIP2,2 e TIP2,3 de *Arabidopsis* (Fig. 4).

Os perfis de bandas obtido com a hibridrização do DNA genômico de *Vriesea gigantea* com as sondas *VgPIP1,5* e *VgTIP2* indicam a ocorrência de cópia única de ambos os genes (Fig. 5). Para *VgPIP1,5*, foi observada uma única banda para cada digestão. Na hibridização com *VgTIP2*, duas bandas foram detectadas na digestão com SacI, enquanto somente uma foi observada para as demais enzimas. A ocorrência de duas bandas na amostra digerida com SacI era esperada, uma vez que *VgTIP2* possui um sítio de corte dessa enzima na posição 8-12 da sequência de cDNA

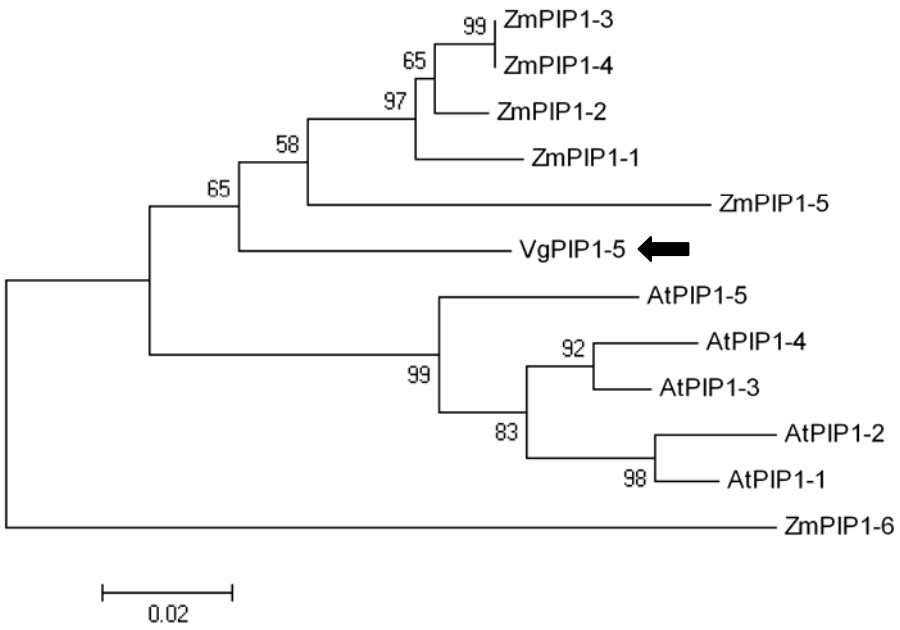


Figura 3: Dendrograma mostrando as relações de distância entre a sequência de proteína deduzida de PIP1,5 isolada de *Vriesea gigantea* (indicada por seta) com PIPs da subfamília 1 de *Zea mays* e *Arabidopsis thaliana*. As sequências de aminoácidos foram alinhadas com o programa ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) e analisadas pelo método de neighbor-joining (Saitou e Nei, 1987). As árvores e os cálculos de bootstrap foram feitos com o programa MEGA (http://www.megasoftware.net).

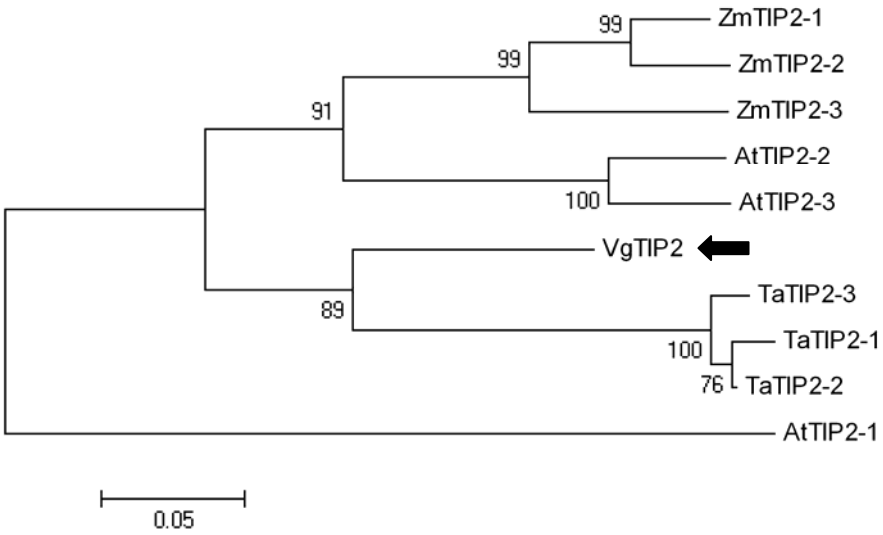


Figura 4: Dendrograma mostrando as relações de distância entre a sequência de proteína deduzida de TIP2 isolada de *Vriesea gigantea* (indicada por seta) com TIPs da subfamília 2 de *Zea mays* e *Arabidopsis thaliana*. As sequências de aminoácidos foram alinhadas com o programa ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) e analisadas pelo método de neighbor-joining (Saitou e Nei,1987). As árvores e os cálculos de bootstrap foram feitos com o programa MEGA (http://www.megasoftware.net).

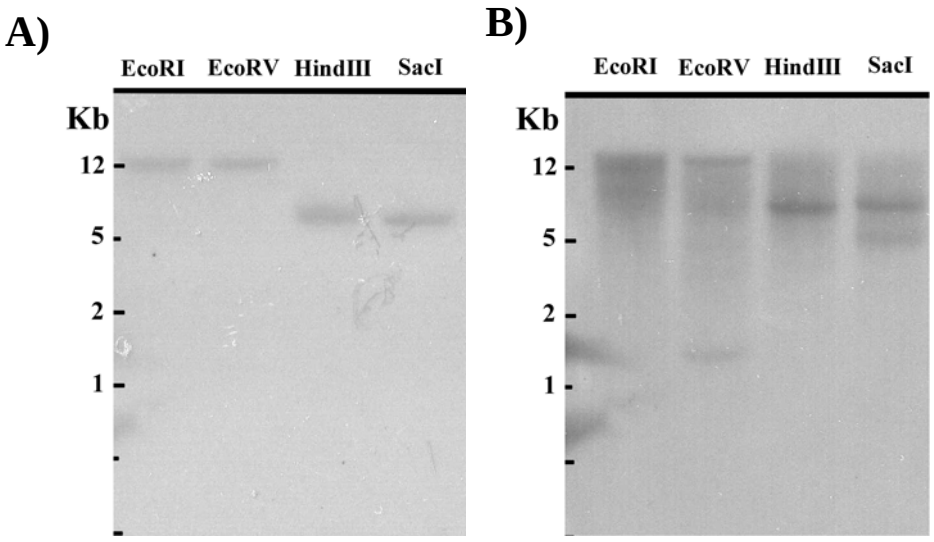


Figura 5: Análises de *Southern blot* de *VgPIP1,5* (A) e *VgTIP2* (B). Dez microgramas de DNA genômico foram digeridos com EcoRI, EcoRV, HindIII e SacI e hibribizados com sondas marcadas com α[P^{32}]dATP. O tamanho dos marcadores (kilobases) está indicado à esquerda das figuras.

O perfil de expressão de *VgPIP1,5* e *VgTIP2* nos tecidos apical e basal das folhas de *V. gigantea* foi avaliado por *Northern dot blot* e revelou aspectos bastante interessantes (Fig. 6 e 7). A maior expressão desses genes foi observada na região basal das folhas, sítio de absorção de ureia, em comparação com a região apical. Em ambas as regiões foliares, não foi possível a identificação de um padrão nítido de expressão ao longo do ciclo diuturno. Os perfis de expressão de AQPs na base e ápice das folhas também foram diferenciados, tanto para o controle (sem nitrogênio) quanto na presença de ureia ou amônio+nitrato (Knudson). Na base das folhas, foi observado que o cultivo em ureia resultou em maior indução da expressão de *VgPIP1,5* e *VgTIP2*, quando comparado com plantas cultivadas em meio sem nitrogênio ou em meio Knudson. Apesar de ambas as aquaporinas serem induzidas na presença de ureia, a expressão da *VgPIP1,5* foi praticamente o dobro de*VgTIP2*. Para *VgPIP1,5*, uma queda acentuada na expressão foi observada nas duas primeiras horas, que pode estar relacionada com a manipulação e transplante das plantas ou com o período do ciclo diuturno. Nas plantas sem nitrogênio a recuperação da expressão foi mais demorada, e se deu após um período de 4 horas. Nas plantas cultivadas em ureia, o nível de expressão se manteve mais elevado durante praticamente todo o período de análise, apresentando uma queda após 20 horas. Um padrão similar de expressão foi observado para *VgTIP2* Já no ápice das folhas, não foram verificadas alterações significativas na expressão dessas aquaporinas em resposta às diferentes fontes de nitrogênio.

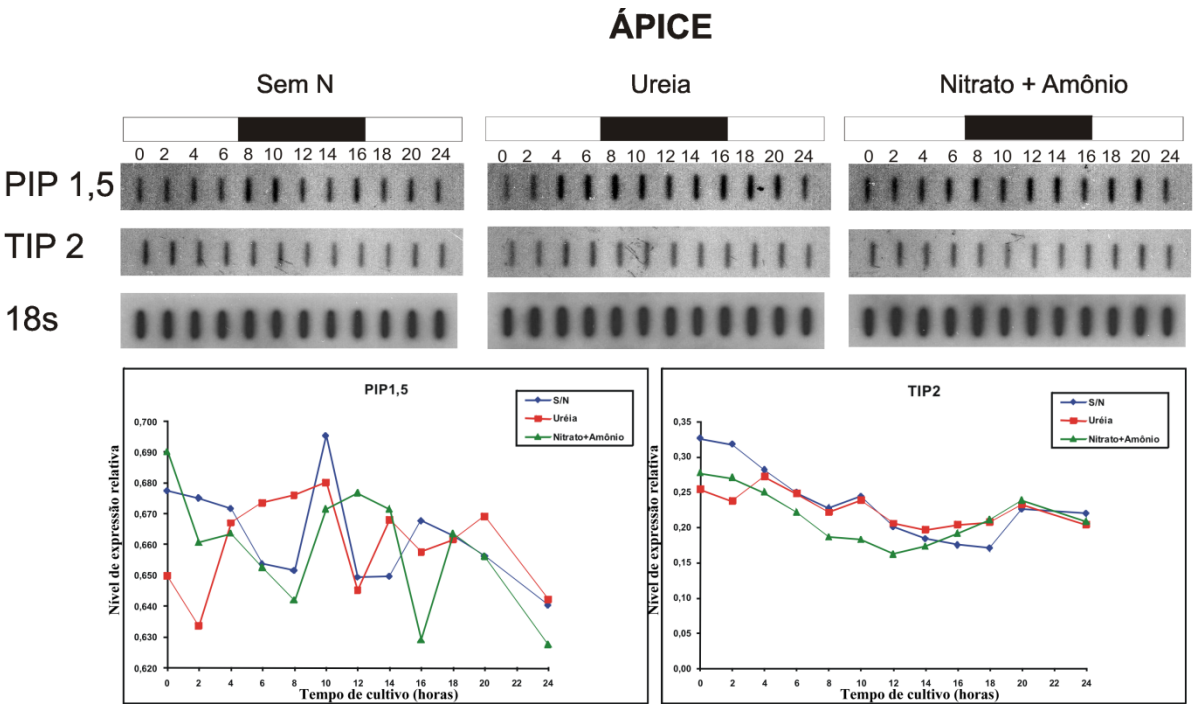


Figura 6: Análises de expressão por *Northern dot blot* de *PIP1,5* , *TIP2* e *18S* na porção apical das folhas de *Vriesea gigantea* cultivada em meio sem N (controle) e na presença de ureia ou amônio + nitrato (Knudson). Cinco microgramas de RNA total foram hibribizados com sondas específicas para *VgPIP1,5* e *VgTIP2* e com sonda heteróloga constitutiva *Ac18S* marcadas com α[P32]dATP.

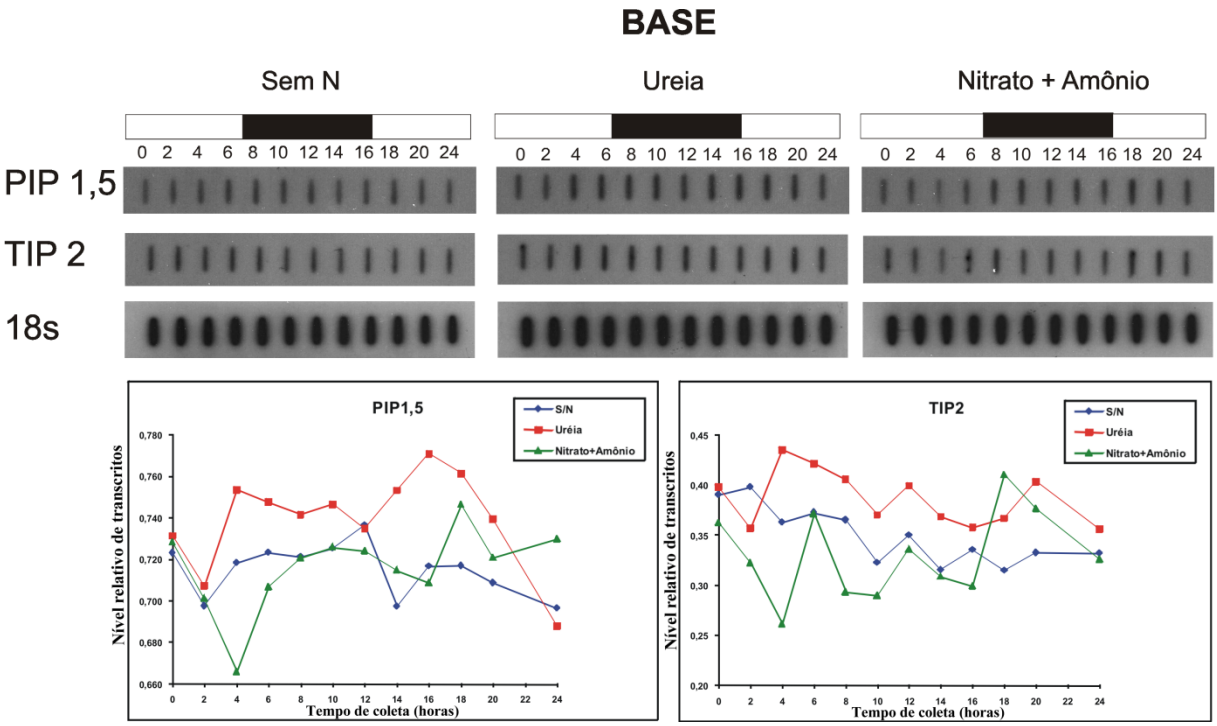


Figura 7: Análises de expressão por *Northern dot blot* de *PIP1,5* , *TIP2* e *18S* na porção basal das folhas de *Vriesea gigantea* cultivada em meio sem N (controle) e na presença de ureia ou amônio + nitrato (Knudson). Cinco microgramas de RNA total foram hibribizados com sondas específicas para *VgPIP1,5* e *VgTIP2* e com sonda heteróloga constitutiva *Ac18S* marcadas com α[P32]dATP.

Discussão

A utilização preferencial de ureia por algumas espécies de bromélias tem sido alvo de interesse há mais de 10 anos. Recentemente, estudos realizados com *Vriesea gigantea* sugeriram o potencial envolvimento de aquaporinas durante o seu transporte transmembrana, evidenciado pela cinética linear de absorção mesmo em altas concentrações de ureia e inibição de transporte por inibidores protéicos. Para tentar elucidar se a alta capacidade de transporte de ureia em *V. gigantea* seria dependente da expressão dessas proteínas, o isolamento e análise da expressão gênica de aquaporinas das classes PIP1 e TIP2 (proteínas cujo transporte de ureia já foi demonstrados em outras espécies vegetais) foram propostos neste trabalho.

Dois cDNAs completos codificando aquaporinas de *Vriesea gigantea* foram isolados por meio da estratégia de RT-PCR. Um deles, denominado *VgPIP1,5*, corresponde a uma aquaporina de membrana plasmática e o segundo, denominado *VgTIP2*, codifica uma aquaporina de membrana de tonoplasto. Tal nomeação foi adotada de acordo com a nomenclatura proposta por Johansson *et al.* (2001), considerando a similaridade com as demais proteínas já identificadas em plantas. As MIPs isoladas neste trabalho, em especial a VgPIP1,5, possuem alta identidade com proteínas já isoladas de outras espécies vegetais, com destaque para as monocotiledôneas. Análises da sequência protéica revelaram um grande número de sítios potenciais de fosforilação. VgPIP1,5 mostrou possuir os resíduos putativos de serina altamente conservados e comuns a todas PIP1s pertencentes a *Zea mays* (posições 16, 78 e 130)

Apesar da clássica regulação diuturna da expressão de aquaporinas observada em raízes de *Lotus japonicus* e *Zea mays* (Henzler *et al.*, 1999; Gaspar *et al.*, 2003; Lopez *et al.*, 2003), não foram verificadas variações evidentes nos níveis de transcritos *VgPIP1,5* e *VgTIP2* em função do regime de luz, em ambas as regiões foliares. Esse foi um resultado inesperado e ao mesmo tempo interessante. Para *VgPIP1,5*, a queda acentuada de expressão observada durante as duas primeiras horas de análise poderia estar relacionada com a manipulação e transplante do material vegetal. Contudo, a presença de nitrogênio no meio de cultura possibilitou uma retomada de expressão adiantada em comparação às plantas controle (sem N).

Em *Zea mays* e *Lotus japonicus*, a variação da expressão de *PIP1,5* ao longo do ciclo diuturno foi correlacionada a variações do fluxo de água nas raízes. Em *Vriesea gigantea*, contudo, a ausência de um padrão nítido de expressão dia-noite sugere que esse gene seja expresso de forma aproximadamente contínua, principalmente nas bases foliares. É provável que essa característica peculiar de expressão seja essencial para a nutrição dessa bromélia, uma vez que a disponibilidade de nutrientes, em especial de ureia, é totalmente imprevisível e sujeita a

rápida degradação e/ou utilização por outros organismos habitantes do tanque. Nessas condições, a presença de sistemas de transporte constantemente ativos atuação possibilitaria que *Vriesea gigantea* absorvesse a ureia de maneira rápida e eficiente, mesmo quando na presença de microorganismos. Contudo, estudos subsequentes serão necessários para elucidar os motivos que levariam a esse tipo incomum de regulação. Também vale ressaltar que o período luminoso imposto às plantas desse trabalho difere em relação aos demais estudos (13 e 16 horas de luz, respectivamente), tornando difícil esse tipo de comparação em relação ao ciclo circadiano.

Também foi observada uma maior expressão de *VgPIP1,5* e *VgTIP2* na região basal das folhas de *Vriesea gigantea*. A expressão de ambas as aquaporinas tem sido associada às raízes das plantas terrestres, onde desempenhariam funções de transporte de água e/ou solutos (Otto e Kaldenhoff, 2000; Chaumont *et al.*, 2001; Gaspar *et al.*, 2003; Liu *et al*., 2003). Apesar de serem órgãos morfologicamente diferenciados, esse padrão de expressão já era esperado, uma vez que em bromélias a porção basal das folhas assume o papel fisiológico correspondente ao das raízes, cuja função de restringe basicamente à fixação da bromélia à planta suporte. Devido à formação do tanque, o acúmulo de água e nutrientes fica concentrado na base das folhas, onde um grande potencial para a absorção de nutrientes foi observado. Exemplo disso são as altas densidades de tricomas absorventes, bem como altas atividades hidrolíticas de ureia e redutoras de nitrato, constatadas nessa região foliar (Takahashi *et al.*, 2007; Takahashi, 2008).

A maior expressão de *VgPIP1,5* e *VgTIP2* na porção basal das folhas em reposta à exposição à ureia é um indício do potencial dessas proteínas atuarem como transportadoras desse soluto. Embora essa seja uma característica aparentemente restrita a poucas aquaporinas vegetais, essa função de transporte já foi comprovada para as proteínas de membrana plasmática PIP1,5 de milho (Gaspar *et al.*, 2003) e para AQP1 de tabaco (Otto e Kaldenhoff, 2000). Em membranas de tonoplasto, outras cinco aquaporinas já foram identificadas como transportadoras de ureia, 4 delas isoladas de *Arabidopsis thaliana* (AtPIP1,1; AtPIP1,2; AtPIP2,1 e At PIP4,1) e uma de *Nicotiana tabacum* (NtTIPa) (Wang *et al.*, 2008). Embora todas essas proteínas transportem ureia em testes funcionais em sistemas heterólogos, estudos fisiológicos têm demonstrado que aquaporinas de tonoplasto são mais permeáveis à ureia em comparação com as de membrana plasmática (Gerbeau *et al.*, 1999). Isso parece não ser aplicável a *V. gigantea*, para a qual foi observada uma expressão de *VgPIP1,5* bastante superior a de *VgTIP2*, tanto na ausência como na presença de ureia.

Levando-se em consideração os resultados de expressão gênica, aparentemente nenhuma das aquaporinas isoladas de *V. gigantea* parece estar envolvida no transporte de amônio. O transporte desse nutriente por aquaporinas vegetais já foi observado em *Triticum aestivum* e

Arabidopsis thaliana. A expressão de TaTIP2,1, TaTIP2,2, AtTIP2,1 e AtTIP2,3 em cepas de fungos deficientes em transportadores de amônio resultou no crescimento de colônias, mesmo em baixas concentrações desse íon (Jahn *et al.*, 2004; Holm *et al.*, 2005; Loque *et al.*, 2005). Além disso, já foi verificado que, em milho, que possui preferência por nitrato como fonte nitrogenada, a presença deste íon induz o acúmulo de transcritos de *PIP1,5* em raízes (Gaspar *et al.*, 2003), o que não foi verificado em *Vriesea gigantea*, que absorve preferencialmente ureia (mesmo na presença simultânea de outros compostos nitrogenados). Embora análises de expressão heteróloga sejam imprescindíveis para a determinação das propriedades de transporte de aquaporinas, o perfil de expressão de *VgPIP1,5* e *VgTIP2* na presença de diferentes fontes de nitrogênio fornece evidências de que essas proteínas estariam envolvidas no transporte de ureia.

Levando-se em consideração a importância da ureia como fonte de nitrogênio para *Vriesea gigantea*, sua absorção é provavelmente dependente da atuação conjunta de sistemas de transporte de alta (DUR3) e baixa afinidade (MIPs). De acordo com as propriedades de cada transportador, é esperado que a captação de ureia via DUR3 seja predominante quando baixas concentrações desse nutriente estão disponíveis. Já quando presente em altas concentrações na água do tanque, a atuação das aquaporinas se tornaria predominante. Isso proporcionaria às plantas um amplo espectro de absorção de ureia, que, aliado à sua rapidez e eficiência de captação, tornaria essa espécie altamente competitiva para a utilização dos recursos ocasionais e temporários a que estão sujeitas em ambiente natural.

Bibliografia

Aroca R., Porcel R., Ruiz-Lozano J.M., 2007. How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in Phaseolus vulgaris under drought, cold or salinity stresses? *New Phytologist* **173**:808–16.

Baiges I., Schäffnerb A.R., Affenzellerb M.J., Mas A., 2002. Plant aquaporins. *Physiologia Plantarum* **115**: 175–182.

Beitz E., Wu B., Holm L.M., Schultz J.E., Zeuthen T., 2006. Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia, and protons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 269–74.

Benzing D.H., 1990. Vascular epiphyts, general biology and related biota. Ashton, P.S. (ed.), Cambridge, Cambridge University Press.

Biela A., Grote K., Otto B., Hoth S., Hedrich R., Kaldenhoff R., 1999. The *Nicotiana tabacum* plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercury-insensitive and permeable for glycerol. *Plant Journal* **18**:565–70.

Chakrabarti N., Tajkhorshid E., Roux B., Pomes R., 2004. Molecular basis of proton blockage in aquaporins. *Structure* **12** (1): 65-74.

Chaumont F., Barrieu F., Jung R., Jung R., Chrispeels M.J., 2000. Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity *Plant Physiology* **122** (4): 1025-1034.

de Groot B.L., Frigato T., Helms V., Grubmüller H., 2003. The mechanism of proton exclusion in the aquaporin-1 water channel. *Journal of Molecular Biology* **333** (2): 279-293.

Denker B.M., Smith B.L., Kuhajda F.P., Agre P., 1988. Identification, purification and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *J Biol Chem* **263**: 15634–15642.

Endres L., Mercier H., 2001. Influence of nitrogen forms on the growth and nitrogen metabolism of bromeliads. *Journal of Plant Nutrition* **24** (1): 29-42.

Flexas J., Ribas-Carbó M., Hanson D.T., Bota J., Otto B., Cifre J., McDowell N., Medrano H., Kaldenhoff R., 2006. Tobacco aquaporin NtAQP1 is involved in mesophyll conductance to CO_2 in vivo. *Plant Journal* **48**:427–39.

Fu D.X., Libson A., Miercke L.J.W., Weitzman C., Nollert P., Krucinski J., Stroud R.M., 2000. Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science* **290**: 481-486.

Fujiyoshi Y., Mitsuoka K., de Groot B.L., Philippsen A., Grubmüller H., Agre P., Engel A., 2002. Structure and function of water channels. *Curr. Opin. Struct. Biol* **12**: 509-515.

Galluci E., Micelli C., Lippe C., 1971. Non-electrolyte permeability across thin lipid membranes. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie* **79**: 881–887.

Gaspar M., Bousser A., Sissoëff I., Roche O., Hoarau J., Mahe A., 2003. Cloning and characterization of ZmPIP1–5b, an aquaporin transporting water and urea. *Plant Science* **165**:21–31.

Gerbeau P., Güclü J., Ripoche P., Maurel C., 1999. Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes. *Plant Journal* **18**: 577–87.

Henzler, T., Waterhouse, R.N., Smyth, A.J., Carvajal, M., Cooke, D.T., Schaffner, A.R., Steudle, E. and Clarkson, D.T. (1999) Diurnal variations in hydraulic conductivity and root pressure can be correlated with the expression of putative aquaporins in the roots of *Lotus japonicus*. *Planta* **210**: 50–60.

Holm L.M., Jahn T.P., Moller A.L., Schjoerring J.K., Ferri D., Klaerke D.A., Zeuthen T., 2005. NH_3 and NH_4^+ permeability in aquaporin-expressing Xenopus oocytes, *Pflugers Arch*. **450**: 415–428.

Holm L.M., Klaerke D.A., Zeuthen T., 2004. Aquaporin 6 is permeable to glycerol and urea. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* **448** (2): 181-186.

Ilan B., Tajkhorshid E., Schulten K., Voth G.A., 2004. The mechanism of proton exclusion in aquaporin channels. *Proteins-Structure Function And Bioinformatics* 55 (2): 223-228.

Inselsbacher E., Cambui C.A., Richter A., Stange C.F., Mercier H., Wanek W., 2007. Microbial activities and foliar uptake of nitrogen in the epiphytic bromeliad *Vriesea gigantea*. *New Phytologist* **175** (2): 311-320.

Ishibashi K., Sasaki S., Fushimi K., Uchida S., Kuwahara M., Saito H., Furukawa T., Nakajima K., Yamaguchi Y., Gojobori T., 1994. Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 6269–6273.

Jahn T.P., Moller A.L., Zeuthen T., Holm L.M., Klaerke D.A., Mohsin B., Kuhlbrandt W., Schjoerring J.K., 2004. Aquaporin homologues in plants and mammals transport ammonia. *FEBS Lett*. *574*: 31–36.

Jang J.Y., Kim D.G., Kim Y.O., Kim J.S., Kang H., 2004. An expression analysis of a genefamily encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **54**:713–25.

Johanson U., Karlsson M., Johansson I., Gustavsson S., Sjövall S., Fraysse L., Weig A.R., Kjellbom P., 2001. The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in Arabidopsis provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiology* **126**: 1358–1369.

Johansson I., Karlsson M., Shukla V.K., Chrispeels M.J., Larsson C., Kjellbom P., 1998. Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. *Plant Cell* **10**:451–60.

Kaldenhoff R., Ribas-Carbo M., Sans J.F., Lovisolo C., Heckwolf M., Uehlein N., 2008. Aquaporins and plant water balance. *Plant, Cell and Environment* **31**: 658–666.

Karlsson M., Johansson I., Bush M., McCann M.C., Maurel C., Larsson C., Kjellbom P., 2000. An abundant TIP expressed in mature highly vacuolated cells. *Plant Journal* **21**: 83–90.

Kato M., Pisliakov A.V., Warshel A., 2006. The barrier for proton transport in aquaporins as a challenge for electrostatic models: The role of protein relaxation in mutational calculations *Proteins-Structure Function And Bioinformatics* **64** (4): 829-844.

King S.L., Kozono D., Agre P. 2004. From structure to disease: The evolving tale of aquaporin biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* **5**: 687-698.

Lande M.B, Donovan J.M., Zeidel M.L., 1995. The relationship between membrane fluidity and permeabilities to water, solutes, ammonia, and protons. *Journal of General Physiology* **106** (1): 67-84.

Liu L., U. Ludewig, W.B. Frommer, N. von Wire´ n, AtDUR3 encodes a new type of high affinity Urea/H+ symporter in Arabidopsis, Plant Cell 15 (2003) 790–800.

Liu L.H., Ludewig U., Frommer W.B., von Wirén N., 2003. AtDUR3 encodes a new type of high-affinity urea/H+ symporter in Arabidopsis. *Plant Cell* **15**: 790–800.

Lopez F., Bousser A., Sissoëff I., Gaspar M., Lachaise B., Hoarau J., Mahe A., 2003. Diurnal regulation of water transport and aquaporin gene expression in maize roots: contribution of PIP2 proteins. *Plant Cell Physiology* **44**:1384–95.

Loque, D., Ludewig, U., Yuan, L., von Wiren, N., 2005. Tonoplast intrinsic proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 facilitate NH_3 transport into the vacuole. *Plant Physiology*. **137**: 671–680.

Ma J.F., Tamai K., Yamaji N., Mitani N., Konishi S., Katsuhara M., Ishiguro M., Murata Y., Yano M., 2006. A silicon transporter in rice. *Nature* **440**:688-691

Maeshima M., Ishikawa F., 2008. ER membrane aquaporins in plants. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 456 (4): 709-716.

Maurel C., Verdoucq L., Luu D.-T., Santoni V., 2008. Plant aquaporins: Membrane channels with multiple integrated functions *Annual Review of Plant Biology* **59**: 595-624.

Meinild A.K., Klaerke D.A., Zeuthen T., 1998. Bidirectional water fluxes and specificity for small hydrophilic molecules in aquaporins 0-5. *Journal of Biological Chemistry* 273 (49): 32446-32451.

Mercier H., Kerbauy G.B., Sotta B., Miginiac E., 1997. 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* **20** (3): 387-392.

Mut P., Bustamante C., Martinez G., Alleva K., Sutka M., Civello M., Amodeo G., 2008. A fruit-specific plasma membrane aquaporin subtype PIP1;1 is regulated during strawberry (Fragaria x ananassa) fruit ripening. *Physiologia Plantarum* 132 (4): 538-551.

Otto B., Kaldenhoff R., 2000. Cell-specific expression of the mercury-insensitive plasma-membrane aquaporin NtAQP1 from *Nicotiana tabacum*. *Planta* 211 (2): 167-172.

Park J.H., Saier M.H., 1996. Phylogenetic characterization of the MIP family of transmembrane channel proteins. *J Membr Biol* **153**: 171–180.

Peng Y.H., Lin W.L., Cai W.M., Arora R., 2007. Overexpression of a *Panax ginseng* tonoplast aquaporin alters salt tolerance, drought tolerance and cold acclimation ability in transgenic Arabidopsis plants. *Planta* 226 (3): 729-740.

Reizer J., A. Reizer, M.H. Saier Jr., A functional superfamily of sodium/solute symporters, Biochim. Biophys. Acta 1197 (1994) 133–166.

Robinson D.G., Sieber H., Kammerloher W., Schäffner A.R., 1996. PIP1 aquaporins are concentrated in plasmalemmasomes of *Arabidopsis thaliana* mesophyll. *Plant Physiololgy* **111**:645–49.

Saier M.H., 2000. A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* **64**: 354–411.

Saitou N., Nei M., 1987. On the maximum-likelihood method for molecular phylogeny. *Japanese Journal Of Genetics* **62** (6): 547-548.

Sakurai J., Ishikawa F., Yamaguchi T., Uemura M., Maeshima M., 2005. Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. *Plant Cell Physiol* **46**:1568–77.

Sambrook J., Russell D.W., 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. ColdSpring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sands, J.M., Nonoguchi, H.s Knepper, M.A. 1987. Vasopressin effects on urea and H2O transport in inner medullary collecting duct subsegments. Am. J. Physiol. 253:F823–F832

Schäffner A.R., 1998. Aquaporin function, structure, and expression: are there more surprises to surface in water relations? *Planta* **204**:131–39.

Sui H.X., Han B.G., Lee J.K., Walian P., Jap B.K., 2001. Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature* **414**: 872-878.

Tajkhorshid E., Nollert P., Jensen M.O., Miercke L.J.W., O'Connell J., Stroud R.M., Schulten K., 2002. Control of the selectivity of the aquaporin water channel family by global orientational tuning. *Science* **296**: 525-530.

Takahashi C.A., 2008. Assimilação de nitrogênio em diferentes regiões foliares de uma bromélia epífita com tanque. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

Takahashi C.A., Ceccantini G.C.T., Mercier H., (2007). Differential capacity of nitrogen assimilation between apical and basal leaf portions of a tank epiphytic bromeliad. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **19**(2): 119-126.

Takano J., Wada M., Ludewig U., Schaaf G., von Wirén N., Fujiwara T., 2006. The Arabidopsis major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *Plant Cell* **18**:1498-1509.

Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G., 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **24**: 4876-4882.

Törnroth-Horsefield S., Wang Y., Hedfalk K., Johanson U, Karlsson M., Tajkhorshid E., Neutze R., Kjellbom P., 2006. Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature* 439: 688-694.

Turk E., Wright E.M, 1997. Membrane topology motifs in the SGLT cotransporter family. *J. Membr. Biol* **159**: 1–20.

Tyerman S.D., Bohnert H.J., Maurel C., Steudle E., Smith J.A., 1999. Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. *Journal of Experimental Botany* **50**: 1055-1071.

Tyerman S.D., Niemietz C.M., 2002. Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant Cell and Environment* **25**: 173-194.

Uehlein N., Kaldenhoff R., 2008. Aquaporins and plant leaf movements. *Annals of Botany* 101 (1): 1-4.

Uehlein N., Lovisolo C., Siefritz F., Kaldenhoff R., 2003. The tobacco aquaporin NtAQP1is a membrane CO_2 pore with physiological functions. *Nature* **425**:734-737.

Uehlein N., Otto B., Hanson D.T., Fischer M., McDowell N., Kaldenhoff R., 2008. Function of *Nicotiana tabacum* aquaporins as chloroplast gas pores challenges the concept of membrane CO_2 permeability: *Plant Cell* 20(3): 648-657.

Wallace I.S., Roberts D.M., 2004. Homology modeling of representative subfamilies of Arabidopsis major intrinsic proteins. Classification based on the aromatic/arginine selectivity filter. *Plant Physiology* **135**: 1059–1068.

Wang W.-H., Köhler B., Cao F.-Q., Liu L.-H., 2008. Molecular and physiological aspects of urea transport in higher plants. *Plant Science* **175**: 467–477.

Wieth, J.O., Funder, J., Gunn, R.B., Brahm, J. 1974. Passive transport pathways for chloride and urea through the red cell membrane. In: Comparative Biochemistry and Physiology of Transport. Bolis, K., Bloch, K., Luria, S.E., Lynen, F., eds. pp. 317–337. Elsevier/North-Holland, Amsterdam

Zhang Z., Schwartz S., Wagner L., Miller W., 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* **7** (1-2): 203-14.

CAPÍTULO III

ROTA DE ASSIMILAÇÃO DA UREA EM AMINOÁCIDOS NA ESPÉCIE DE BROMÉLIA *Vriesea gigantea*

Introdução

Por um longo tempo acreditou-se que fontes inorgânicas de nitrogênio, como amônio e nitrato, fossem não somente as mais abundantes nos solos como também as únicas formas possíveis de absorção. Assim, fontes orgânicas, quando presentes, deveriam ser decompostas anteriormente à sua assimilação (Schulze *et al.*, 1999). Contudo, estudos em laboratório e em sistemas naturais têm evidenciado a importância das fontes orgânicas de nitrogênio para a nutrição vegetal, principalmente em ambientes onde o suprimento das fontes inorgânicas é limitado (Melin e Nilsson, 1953; Stribley e Read, 1980; Abuzinadah e Read, 1986; Chapin *et al.*, 1993; Kielland, 1994; Raab *et al.*, 1996; Schimel e Chapin, 1996).

Essa limitação de nitrogênio inorgânico ocorre especialmente em ambientes onde as baixas temperaturas e/ou o pH tornam o processo de mineralização baixo, como as regiões ártica, alpina e de floresta boreal (Chapin *et al.*, 1993; Näsholm *et al*., 1998; Raab *et al.*, 1999). Ocorre também em ambientes áridos, onde a disponibilidade de nitrogênio é limitada devido à escassez de chuvas, baixa produtividade primária e baixas taxas de decomposição de matéria orgânica (Smith et al., 1997). Outros grupos vegetais também usualmente sujeitos à baixa disponibilidade de nitrogênio inorgânico em seu habitat natural são as de habitat epífito e as plantas carnívoras (Benzing, 2000; Schulze e Frommer, 1999). Em todos esses ambientes, os compostos orgânicos constituem a maior parte dos recursos nitrogenados disponíveis para a nutrição vegetal.

Mais especificamente em relação às bromélias epífitas, a obtenção de matéria orgânica em várias espécies se deve, principalmente, à posse de uma estrutura bastante especial formada pelo imbricamento das folhas, denominada tanque ou cisterna, que permite o acúmulo de água e material orgânico que caem sobre a planta. Além disso, dada a grande capacidade de estocagem de água no tanque dessas espécies, elas atuam, em seu habitat natural, como um núcleo de suporte de uma grande diversidade de organismos, incluindo desde microorganismos, invertebrados, plantas vasculares e até mesmos alguns vertebrados, como anfíbios (Benzing, 2000), os quais procuram esses tanques para sua alimentação, reprodução e/ou proteção (Benzing, 1980; 2000).

É bem documentada na literatura essa interação entre anfíbios e bromélias com tanque. Um grande número de anfíbios vive em associação com o tanque de bromélias, onde chegam a passar todo o seu ciclo de vida (Abendroth, 1971). Richardson (1999) encontrou 37 anfíbios em 20 bromélias coletadas e Eterovick (1999) observou que o sapo *Phyllodytes luteolus* usa o

tanque da bromélia *Vriesea neoglutinosa* como seu habitat natural. Esses animais chegam a ter a forma do corpo e sua biologia reprodutiva influenciadas pela forma da planta (Wake, 1987).

Uma vez vivendo ou frequentando o tanque, os anfíbios liberam nele suas excretas, as quais constituem um importante recurso de nitrogênio orgânico para essas plantas, a ureia (Benzing, 1990; Eterovick, 1999; Lopez *et al.*, 1999). Vários estudos têm documentado a grande habilidade de bromélias epífitas em utilizar eficientemente fontes orgânicas de nitrogênio, em especial a ureia. Mercier *et al.* (1997), por exemplo, observaram um melhor crescimento da espécie *Vriesea phillipocoburgii* quando cultivada *in vitro* na presença de ureia, em detrimento de fontes inorgânicas de nitrogênio. O mesmo foi relatado por Endres e Mercier (2001) para a espécie *Vriesea gigantea*.

A importância da ureia como fonte nitrogenada para *Vriesea gigantea* também foi evidenciada por meio de descobertas feitas recentemente a respeito da sua absorção. Estudos de cinética de absorção demonstraram a alta capacidade dos tecidos foliares dessa espécie em absorver essa fonte de N na sua forma intacta, transporte esse inibido pela presença de $HgCl_2$, um inibidor de aquaporinas (Inselsbacher *et al.*, 2007).

Uma vez absorvida pelas células, o próximo passo seria a sua assimilação. A grande maioria dos estudos sugere que o nitrogênio da urea não esteja disponível para o metabolismo vegetal a menos que ela seja hidrolisada anteriormente pela urease (EC: 3.5.1.5), produzindo CO_2 e NH_3, sendo esta última incorporada pela ação combinada das enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT), principalmente (Marschener, 1995; Lam *et al.*, 1996). Embora seja amplamente aceita a idea de que existe a necessidade da hidrólise da urea antes da assimilação do N, encontram-se na literatura alguns relatos bastante antigos alegando acerca da possibilidade dessa incorporação ocorrer por meio de vias metabólicas alternativas, independente da sua hidrólise pela urease e com a participação de um aminoácido como aceptor (Hattori 1957, 1958; Walker 1952; Reinbothe & Mothes, 1962). Uma possibilidade sugerida seria a incorporação dessa molécula por meio da ação da arginase, a qual condensaria a urea com a ornitina, formando arginina. Entretanto, até o momento, tal rota metabólica não foi verificada nos seres vivos, encontrando-se na literatura atual somente referências à via oposta a essa, ou seja, a hidrólise da arginina em urea e ornitina.

A arginase, também conhecida como L-arginina amidohidrolase (EC 3.5.3.1.), ocorre amplamente na natureza. Ela tem sido estudada extensivamente nos tecidos animais, particularmente, em relação à excreção de nitrogênio e ao ciclo da urea (Krebs-Henseleit) (Porembska, 1973). Nos vegetais, diferentemente, a arginase é pouco conhecida. Ela tem sido associada, principalmente, à hidrólise das reservas nitrogenadas em órgãos de reserva de muitas

espécies vegetais (Polacco e Holland, 1993; Nordim e Näsholm, 1997). Há relatos que ela também teria grande importância no brotamento de tubérculos e bulbos e/ou na germinação de sementes (Splittstoesses, 1969; Kollöffle e Van Dijke, 1975; King e Gifford, 1997; Nordim e Näsholm, 1997), fornecendo tanto compostos que atuariam como fontes de nitrogênio quanto esqueletos carbônicos para os eixos em crescimento. Além disso, um dos seus produtos, a ornitina, é precursor da prolina e/ou poliaminas e o nitrogênio contido na urea, o outro produto da arginase, é reciclado pela atuação da urease, a qual libera amônio (Polacco e Holland, 1993).

Tendo em vista que a urea é a fonte de nitrogênio preferencial para a bromélia *Vriesea gigantea*, bem como toda a habilidade demonstrada por ela em absorver e utilizar esse recurso, essa espécie parece ser um modelo biológico bastante interessante para o estudo dos mecanismos de assimilação da urea em vegetais. Até o momento, muito pouco se conhece a respeito da fisiologia das epífitas e das bromeliáceas de um modo geral, e, justamente devido às particularidades a que são expostas em seu habitat natural, podem revelar mecanismos não convencionais de nutrição, bem como de mecanismos fisiológicos relacionados a esses processos (Benzing, 1990).

Objetivo

Considerando-se a grande eficiência e rapidez da bromélia epífita com tanque *Vriesea gigantea* em utilizar a urea como fonte nitrogenada, bem como as evidências de que existiria uma via de assimilação alternativa àquela em que há a atuação da urease (com a participação da arginase no sentido de incorporação da urea em ornitina, gerando a arginina), o objetivo desta etapa do trabalho foi identificar as rotas iniciais de assimilação da urea em aminoácidos livres na bromélia epífita com tanque *Vriesea gigantea*. Para isso, fez-se o uso de urea duplamente marcada com isótopos estáveis (^{13}C e ^{15}N), adicionada ao meio de cultura dessas plantas, e a análise temporal do conteúdo endógeno dos aminoácidos livres gerados após a assimilação desse composto. Utilizou-se como controle negativo plantas transferidas para meio sem nitrogênio e coletadas nos mesmos intervalos de tempo.

Material e Métodos

I – Obtenção do material vegetal e delineamento experimental

1) Material vegetal

As plantas de *Vriesea gigantea* foram obtidas por meio da germinação *in vitro* das suas sementes. Para isso, essas foram desinfestadas em etanol 92% durante 5 minutos, seguido de imersão em uma solução de hipoclorito de sódio 2,5%, durante 2h, sob agitação constante. Após este procedimento, em câmara de fluxo de ar laminar, as sementes foram enxaguadas em água ultra-pura e estéril até que todo o hipoclorito fosse eliminado e, então, transferidas para o meio básico de crescimento composto pelos macronutrientes da solução Knudson (1946) e os micronutrientes do MS (Murashige & Skoog, 1962), adicionado de carbonato de cálcio, na concentração de 0.5 $g.L^{-1}$, como agente tamponante do meio de cultura (Salama e Wareing, 1979). O material vegetal foi mantido em sala climatizada com temperatura média de 25ºC ± 2ºC, fotoperíodo de 15h e intensidade luminosa de 50 μmol fótons m^{-2} s^{-1}, fornecida por lâmpadas fluorescentes.

2) Delineamento experimental

Com o intuito inicial de averiguar o grau de envolvimento das enzimas urease e arginase no processo de assimilação da ureia pela bromélia *Vriesea gigantea*, seja por meio de sua hidrólise prévia ou por uma possível via de assimilação direta em aminoácidos, plantas de *Vriesea gigantea* com 2 anos de idade foram inicialmente cultivadas em meio de cultura sem as fontes de N originais, onde permaneceram por 2 semanas com o objetivo de se esgotar pelo menos parte das reservas nitrogenadas vegetais. Esse meio de cultura foi adicionado de $CaSO_4$ (0,64 g L^{-1}), repondo os íons Ca^{2+} e SO_4^{2-} retirados juntamente com os sais nitrogenados, além de níquel na concentração de 10 μM, metal essencial para a atividade da urease. Após esse período, as plantas foram transferidas para dois tratamentos distintos: o experimental, contendo 10 mM de N na forma de ureia, e um controle, constituído de plantas transferidas para meio com 10 mM de amônio. Esse controle foi escolhido como uma forma de se assegurar que as dinâmicas enzimáticas detectadas ao longo do experimento seriam respostas à presença específica de ureia, e não à presença de nitrogênio de forma geral. Coletas dos tecidos foliares foram realizadas após 0, 1, 3, 7 e 15 dias, sempre duas horas após o início do período luminoso,

e o material foi submetido à quantificação das atividades da urease e arginase, bem como dos conteúdos endógenos de amônio e urea.

Uma vez conhecida a dinâmica dessas duas enzimas durante o processo de assimilação de ureia, procurou-se verificar, de forma mais minuciosa, a incorporação dessa fonte nitrogenada em aminoácidos, atentando-se à detecção dos primeiros aminoácidos gerados nesse processo. Com esses resultados, seria possível verificar se a assimilação desse composto seria dependente da sua hidrólise prévia em amônio e dióxido de carbono ou se a arginase poderia atuar no sentido da incorporação direta da ureia em aminoácidos, comprovando a existência dessa via alternativa. Para que isso fosse possível, tornou-se necessária a utilização de urea duplamente marcada com os isótopos naturais ^{13}C e ^{15}N (em todos esses átomos presentes na molécula) e a realização de coletas em períodos curtos de exposição a essa fonte nitrogenada. Esse experimento, realizado com plantas de 2 anos de idade, foi iniciado com a privação de nitrogênio durante 2 semanas, procedimento esse idêntico ao descrito no experimento anterior. Após esse período, as plantas foram transferidas para o meio de cultura experimental contendo 5 mM de urea duplamente marcada (no carbono - ^{13}C e em ambos os nitrogênios - ^{15}N, com 98% de enriquecimento), onde foram mantidas por períodos de 0, 15 min., 30 min., 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24 e 48 horas. As plantas foram coletadas, lavadas com água destilada e os tecidos foliares separados e congelados imediatamente em N_2 líquido. O material foi armazenado a -70º C até o momento da sua utilização. Com o objetivo de se verificar possíveis alterações na síntese de aminoácidos decorrentes do processo de transferência em si e do ciclo circadiano, foi conduzido paralelamente e esse grupo experimental um controle negativo no qual as plantas foram transferidas para um meio de cultura sem N e mantidas durante os mesmos intervalos de tempo. As amostras coletadas foram submetidas à detecção do conteúdo de aminoácidos livres e suas variações isotópicas.

II) Quantificação dos conteúdos endógenos de amônio e urea

1) Extração de urea e amônio presentes em tecidos foliares

Os tecidos foliares de *Vriesea gigantea* foram coletados e congelados imediatamente em nitrogênio líquido. As amostras foram maceradas e homogeneizadas com 4 volumes de água ultrapurificada, sendo em seguida centrifugadas a 11.000 rpm por 15 minutos a 4ºC. O sobrenadante foi coletado e utilizado para as quantificações do conteúdo de amônio e urea.

2) Quantificação de amônio

O conteúdo de amônio presente nos tecidos foliares de *Vriesea gigantea* foi quantificado de acordo com o método descrito por Weatherburn (1967). Alíquotas de 100 μL dos extratos foliares foram foram adicionados de 500 μL do reagente A (solução aquosa constituída de 10 g L^{-1} de fenol e 50 mg L^{-1} de nitroprussiato de sódio) e 500 μL do reagente B (solução aquosa constituída de 5 g L^{-1} de hidróxido de sódio e 8,2 mL L^{-1} de hipoclorito de sódio a 5%). As amostras foram então agitadas e incubadas em temperatura ambiente por 30 minutos, sendo em seguida lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 625 nm.

3) Quantificação de urea

A quantificação da urea presente nos meios de cultura foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Gerendás e Sattelmacher (1997), em que a urea é quantificada indiretamente por meio da determinação do amônio liberado após sua hidrólise pela urease.

Alíquotas de 100 μL do extrato vegetal foram incubadas a 40ºC durante 40 minutos em 900 μL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 2,5 unidades de urease purificada. Em seguida, alíquotas de 100 μL dessa reação de hidrólise foram utilizadas para a determinação do amônio produzido nesse intervalo de tempo, segundo o procedimento descrito para a quantificação do amônio.

III) Quantificação da atividade *in vivo* da urease

1) Ensaio *in vivo* da urease

As plantas foram coletadas e lavadas com água destilada para a retirada de resquícios de meio de cultura presente no material. As folhas foram homogeneizadas, cortadas em pequenos fragmentos e separadas em alíquotas de 400 mg, às quais foram de adicionadas 2 mL de tampão de incubação, previamente desaerado, constituído de fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), 5% de n-propanol e 200 mM de urea. Os tecidos foliares foram submetidos à vácuo por 3 vezes de 1 minuto cada, de modo a facilitar a infiltração do tampão nos tecidos. Alíquotas de 100 μL foram retiradas para a determinação da quantidade inicial de amônio presente nos tecidos. O restante foi incubado a 30ºC durante 60 minutos, retirando-se então uma nova alíquota de 100 μL para a determinação do amônio produzido pela urease nesse intervalo de tempo. O amônio foi quantificado de acordo com o método descrito por McCullough (1967). Aos 100 μL das amostras, foram adicionados 500 μL do reagente A (solução aquosa constituída de 10 g L^{-1} de fenol e 50 mg L^{-1} de nitroprussiato de sódio) e 500μL do reagente B (solução aquosa constituída

de 5 g L^{-1} de hidróxido de sódio, 20 mL L^{-1} de hipoclorito de sódio a 5% e 150 mM de fosfato de sódio dibásico). As amostras foram então agitadas e incubadas a 37ºC por 35 minutos, sendo em seguida lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 625 nm.

IV) Quantificação da atividade *in vitro* da arginase

1) Ensaio *in vitro* da arginase

Os tecidos foliares foram coletados e congelados imediatamente em nitrogênio líquido. Em seguida, o material foi macerado e homogeneizado com 4 volumes (v/v) de tampão de extração (tampão Tris-HCl 100 mM pH 9,5, contendo 5 mM de DTT, 5% de glicerol e 2,5% de albumina). O material foi centrifugado a 12.000 rpm a 4ºC por 20 minutos, sendo o sobrenadante resultante coletado e mantido em gelo.

Para a ativação da arginase, alíquotas de 400 μL do sobrenadante foram pré-incubadas com 100 μL de $MnCl_2$ 25 mM a 40ºC durante 10 minutos. Após esse procedimento, foram adicionados a esse extrato 1 mL de tampão Tris-HCl 100 mM (pH 9,5) contendo 1 mM de $MnCl_2$ e 200 mM de arginina, seu substrato. A reação foi incubada a 30ºC durante 60 minutos, sendo interrompida após esse período com a adição de 10% de ácido perclórico. Para o tempo zero, o ácido perclórico foi adicionado à mistura de ensaio imediatamente após a adição de arginina.

A quantificação de urea formada pela ação da arginase foi feita segundo a metodologia descrita por Schimke (1970). Para tanto, a mistura do ensaio enzimático foi previamente centrifugada, obtendo-se então um sobrenadante livre de proteínas precipitadas. Alíquotas de 600 μL foram adicionadas de 100 μL de uma solução etanólica contendo 3% de isonitrosopropiofenona e 3 mL de uma mistura ácida composta de 9% de ácido sulfúrico e 27% de ácido fosfórico. A mistura foi incubada em banho-maria a 100ºC por 60 minutos, sendo em seguida, resfriada e analisada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. Por tratar-se de uma reação fotossensível, todo o procedimento foi realizado com o mínimo de incidência luminosa possível.

V) Quantificação dos aminoácidos livres

1) Extração dos aminoácidos livres

Para a extração dos aminoácidos livres, amostras de 200 mg de tecidos foliares foram maceradas com nitrogênio líquido e homogeneizadas com 6 mL de uma mistura de MCA (metanol:clorofórmio:água, na proporção de 12:5:3, v/v/v). Foram acrescentados às amostras 2,5 nmoles do padrão interno norleucina. As amostras foram então mantidas sob agitação constante durante 24 h a 4°C e, em seguida, centrifugadas a 2000 rpm por 6 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e mantido no gelo; o precipitado foi ressuspendido com 2 mL de MCA e centrifugado novamente a 2000 rpm por 6 min a 4° C. O sobrenadante resultante foi coletado e acrescentado ao obtido anteriormente. Um volume de 4 mL de clorofórmio foi adicionado ao extrato, seguido de 2 mL de água. A mistura foi deixada em repouso a 4°C até que houvesse a separação completa das fases. A fase aquosa foi então coletada e seca em speed-vac. O resíduo foi armazenado a -20ºC até o momento de preparo e análise.

2) Purificação da fração de aminoácidos

Anteriormente ao procedimento de derivatização e injeção das amostras no UPLC-MS, foi realizada uma etapa de limpeza do material para a purificação da fração de aminoácidos. Os resíduos obtidos após o processo de extração de aminoácidos descrito acima foram inicialmente solubilizados em 1 mL de metanol 60%. Alíquotas de 200 μL dessa solução foram então transferidas para microtubos e secas novamente em speed-vac. O material foi ressuspendido em 200 μL de HCl 0,02 N e aplicado em colunas contendo 200 mg de resina de troca catiônica SCX (Alltech), condicionadas anteriormente com 10 mL de água MilliQ. A resina foi lavada com 2 mL de uma solução de metanol/água (proporção de 8:1 v/v). Em seguida, os aminoácidos foram eluídos da resina com 3 mL de NH_4OH 4M, sendo esse volume recuperado e seco em speed-vac. A fração de aminácidos foi ressuspendida em 1 mL de água MilliQ e 15 μL dessa solução foi utilizada para a derivatização e análise de aminoácidos em UPLC-MS.

3) Derivatização e análise dos aminoácidos

As alíquotas de 15 μL das amostras de aminoácidos purificadas, bem como os padrões de aminoácidos, foram inicialmente secos em speed-vac e ressuspendidos em 10 μL de uma solução contendo um segundo padrão interno (taurina 10^{-4}M), necessário para que possíveis

correções referentes à eficiência da derivatização e corrida no UPLC fossem feitas posteriormente. Para a derivatização dos aminoácidos, foi utilizado o kit "AccQ•Tag™ Ultra Derivatization Kit"(Waters), específico para análise em UPLC. Aos 10 μL da mistura de aminoácidos, adicionou-se 70 μL de tampão borato (AccQ•Tag™ Ultra Borate Buffer), e, após boa homogeneização, 20 μL do reagente de derivatização (6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato – ACQ) solubilizado em acetonitrila. A mistura foi agitada vigorosamente, deixada em repouso em temperatura ambiente por 1 minuto e, em seguida, incubada a 55ºC durante 10 minutos. As amostras foram então analisadas por UPLC-MS, sendo os aminoácidos eluídos com uma mistura de AccQ•Tag™ Eluent A (Waters, Milford USA) e acetonitrila pura, num fluxo contínuo de 0,7 $mL.min^{-1}$.

4) Análise da sensibilidade de detecção de aminoácidos marcados

Para verificar a sensibilidade dessa metodologia (UPLC-MS) para a detecção de moléculas marcadas num pool de aminoácidos, curvas-padrão dos aminoácidos glutamina, glutamato e alanina, contendo proporções diferenciadas de moléculas marcadas e não marcadas (0, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100% de marcação) foram analisadas. Para todos os pontos da curva, a concentração final do pool de aminoácidos foi estabelecida em 10^{-5}M.

III) Número amostral e análise estatística

O experimento realizado para verificar a dinâmica das enzimas urease e arginase, bem como a variação dos conteúdos de amônio e ureia nos tecidos foliares de *Vriesea gigantea*, após o fornecimento de ureia ou amônio às plantas foi conduzido utilizando-se amostras compostas de 20 plantas para cada ponto de coleta. As análises foram feitas com 3 replicatas técnicas. Já o experimento proposto para analisar a incorporação de urea em aminoácidos foi conduzido utilizando-se amostras compostas contendo 12 plantas para cada condição experimental. Foram utilizadas 6 replicatas para a determinação dos aminoácidos nas amostras de plantas cultivadas na presença de urea e 3 replicatas para a condição controle (sem nitrogênio).

Os resultados obtidos foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) seguido por teste de Tukey HSD post hoc, utilizando-se o programa estatístico STATGRAPHICS PLUS 5.0 (Statistical Graphics Corp., Rockville, MD, USA). Foram consideradas diferenças significativas quando $P < 0,05$.

Resultados

I) Dinâmica dos metabólitos amônio e ureia e das enzimas urease e arginase nos tecidos foliares de bromélias cultivadas na presença de 10 mM de N nas formas de ureia ou amônio

As respostas de *Vriesea gigantea* à presença de ureia ou amônio como fonte de nitrogênio foram muito distintas, tanto em relação ao acúmulo desses compostos no interior dos tecidos foliares quanto em relação às atividades da urease e arginase. Quando cultivadas em meio contendo ureia, as plantas apresentaram um incremento de aproximadamente 50% no seu conteúdo endógeno de amônio já nas primeiras 24 horas de cultivo, o qual se manteve relativamente estável até o fim do período de análise. Já em meio de cultura contendo amônio como fonte de N, foi observado um aumento de 450% desse íon no interior dos tecidos durante o primeiro dia de cultivo, seguido de reduções gradativas até o 7º dia de análise e a partir do qual se verificou sua estabilização (teores similares àos das plantas cultivadas em ureia) (Fig. 8A).

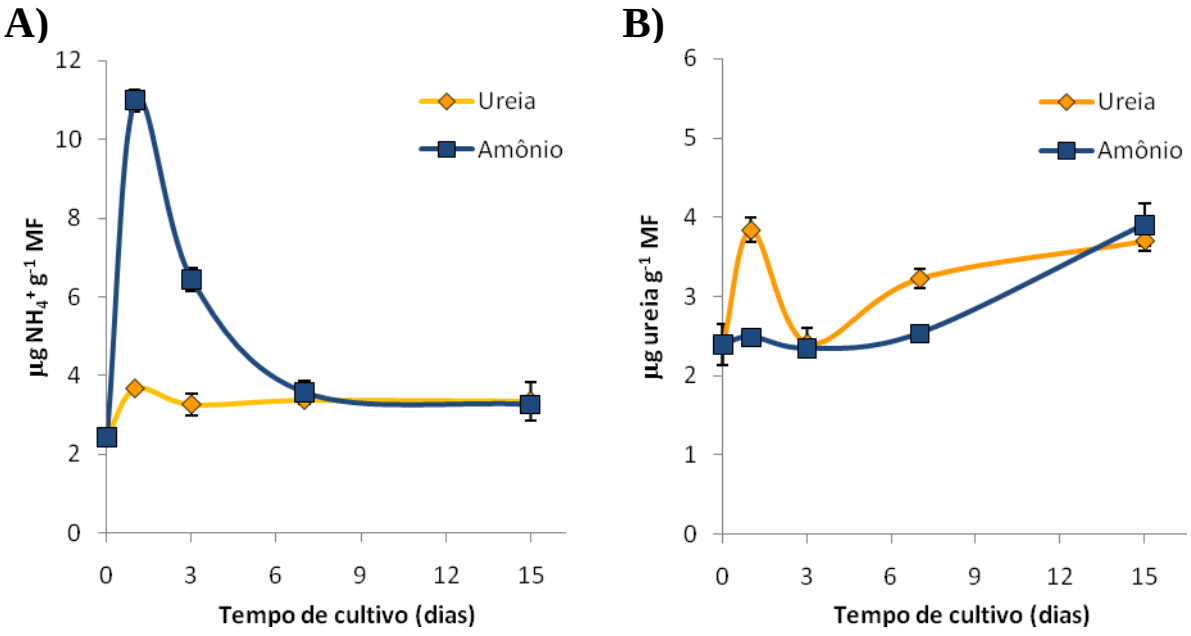


Figura 8: Conteúdos endógenos de amônio (A) e ureia (B) nos tecidos foliares de *Vriesea gigantea* cultivadas *in vitro* em meio contendo 10 mM de N disponibilizados nas formas de ureia

ou amônio. As quantificações foram realizadas utilizando-se amostras compostas provenientes de 20 plantas. Pontos indicam a média ± DP (n=3).

Pequenas variações no conteúdo endógeno de ureia foram observadas nos tecidos de plantas cultivadas na presença de amônio até o 7º dia de análise. Somente após esse período um incremento significativo (equivalente a 60% do conteúdo inicial) foi verificado (Fig. 8B). Quando o fornecimento de N foi disponibilizado na forma de ureia, foi detectado um pico desse composto nas primeiras 24 horas de cultivo (equivalente a um aumento de 60% em relação ao tempo zero), sendo o conteúdo inicial restabelecido já no terceiro dia de análise. Após esse período, um aumento da ureia endógena foi verificado até o fim do experimento (Fig. 8B).

A indução da urease nos tecidos foliares de plantas expostas a ureia só foi verificada após 24 horas de cultivo, momento a partir do qual um aumento superior a 6 vezes na atividade dessa enzima foi observado. Contudo, entre 3 e 7 dias a atividade dessa enzima mostrou-se estável, voltando a aumentar no período subsequente de análise. Já nas plantas cultivadas em meio com amônio, houve um aumento progressivo da atividade da urease até o 7º dia de análise, a partir do qual foi observado seu declínio. Nessa condição experimental, a atividade da urease mostrou-se bastante superior àquela observada em resposta à ureia, com exceção do 15º dia de análise (Fig. 9).

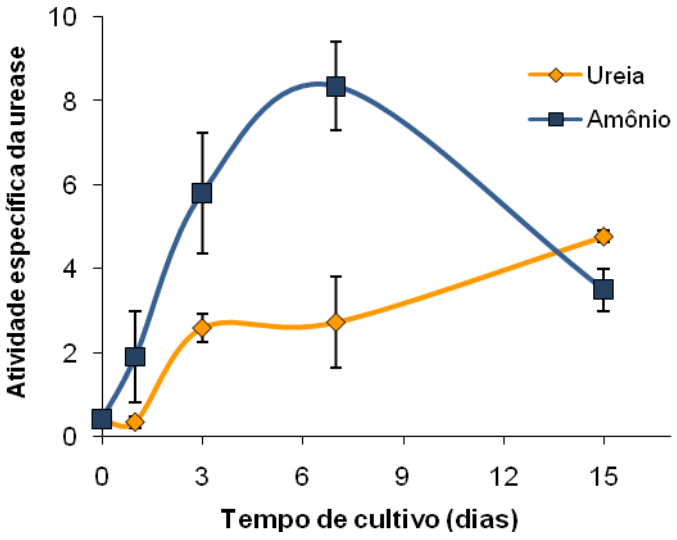


Figura 9: Atividade específica da urease nos tecidos foliares de *Vriesea gigantea* cultivadas *in vitro* em meio contendo 10 mM de N disponibilizados nas formas de ureia ou amônio. As

análises enzimáticas foram realizadas utilizando-se amostras compostas provenientes de 20 plantas. A atividade específica está expressa em µg NH_4^+ produzido . mg^{-1} proteína solúvel. Pontos indicam a média ± DP (n=3).

Em relação a arginase, uma dinâmica praticamente inversa foi observada nos tecidos de plantas cultivadas com ureia ou amônio. Quando expostas a ureia, um aumento significativo da atividade dessa enzima foi detectado até o 7º dia de análise, seguido de queda e restabelecimento da condição inicial no período subsequente. Já nas plantas cultivadas em amônio, uma inibição superior a 50% da atividade da arginase foi verificada nos primeiros 7 dias de cultivo, com posterior elevação da sua atividade até o fim do período de análise (Fig. 10).

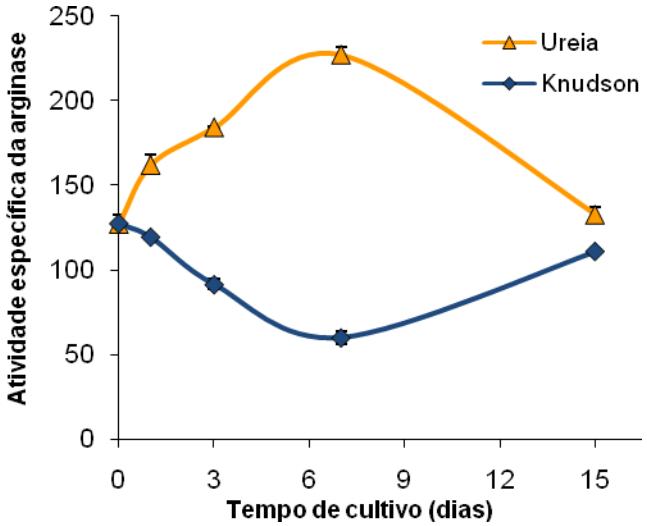


Figura 10: Atividade específica da arginase nos tecidos foliares de *Vriesea gigantea* cultivadas *in vitro* em meio contendo 10 mM de N disponibilizados nas formas de ureia ou amônio. As análises enzimáticas foram realizadas utilizando-se amostras compostas provenientes de 20 plantas. A atividade específica está expressa em µg ureia produzida . mg^{-1} proteína solúvel. Pontos indicam a média ± DP (n=3).

II) Assimilação de ureia em aminoácidos

A técnica empregada para a análise de aminoácidos (UPLC-MS) permitiu uma alta resolução na separação e análise de todos os aminoácidos, como pode ser visualizado na figura 11. A utilização do espectrômetro de massa acoplado ao UPLC foi essencial para a distinção de aminoácidos contendo ou não isótopos, embora, nesse equipamento, não fosse possível determinar o tipo (^{13}C ou ^{15}N) e localização do isótopo presente na molécula.

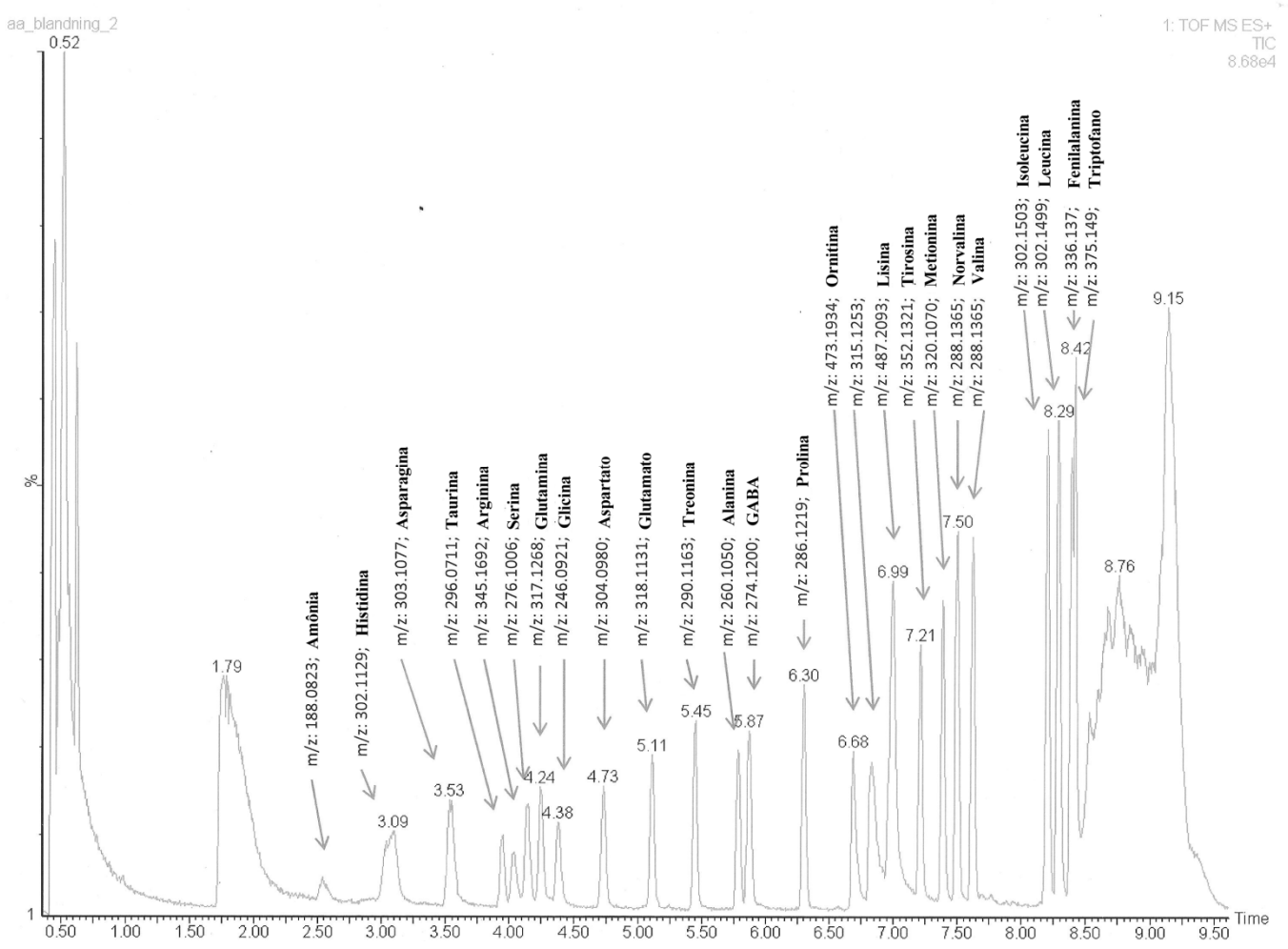


Figura 11: Cromatograma representavivo da análise de aminoácidos por UPLC-MS. A amostra padrão de aminoácidos foi preparada de forma a conter uma concentração final de 10^{-5}M de cada aminoácido. Para a derivatização, utilizou-se o kit "AccQ•Tag™ Ultra Derivatization Kit"(Waters), de acordo com os procedimentos recomendados pelo fabricante.

Já a sensibilidade do equipamento para a detecção dos aminoácidos contendo isótopos naturais foi verificada por meio de curvas-padrão dos aminoácidos glutamina, glutamato e alanina contendo proporções diferenciadas entre moléculas marcadas e não marcadas Nos três casos, uma alta correlação positiva (R^2 > 0,99) entre aumento da proporção de aminoácidos marcados presentes na solução e sua detecção pelo equipamento foi verificada (Fig. 12).

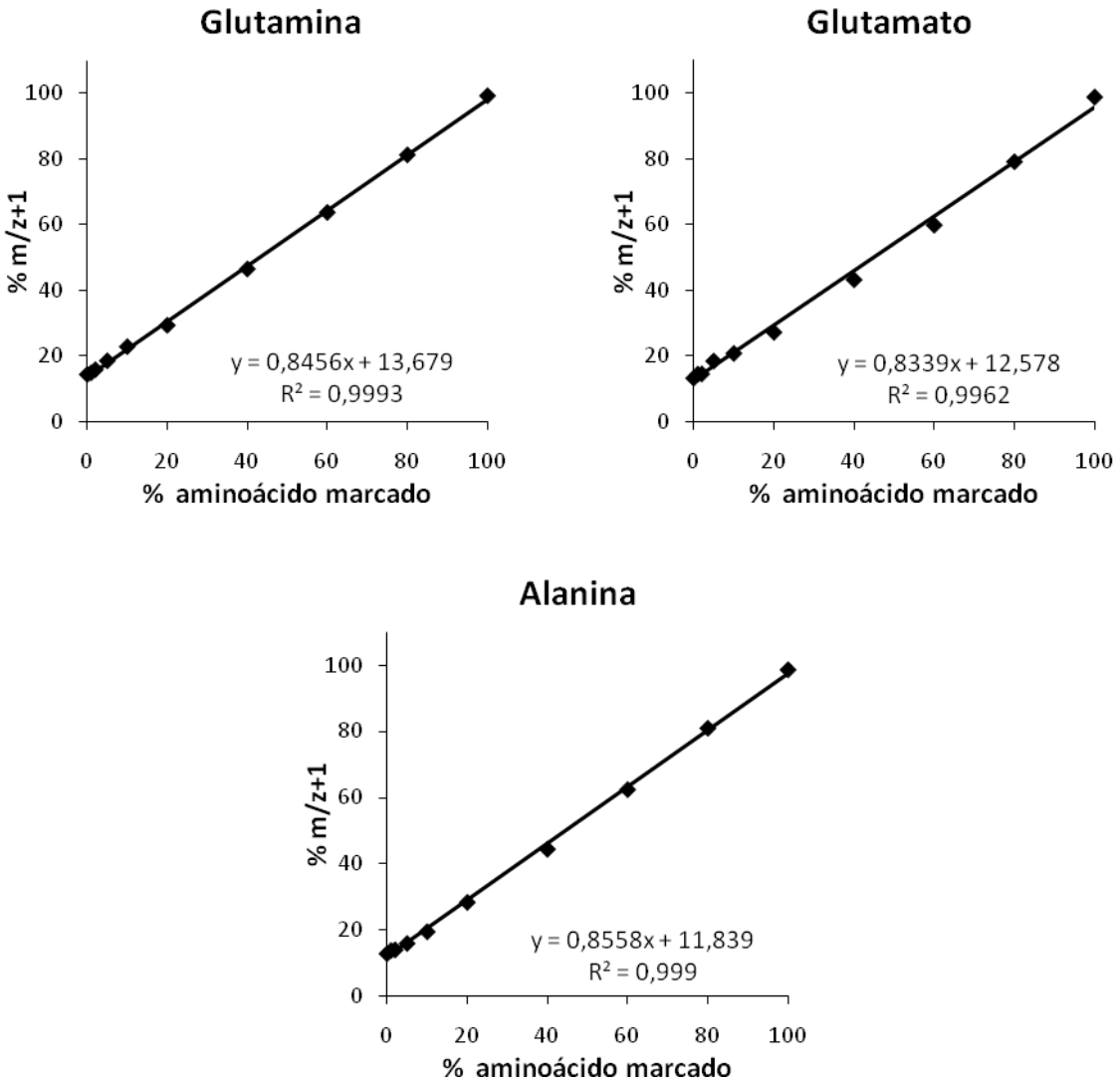


Figura 12: Curva padrão dos aminoácidos glutamina, glutamato e alanina marcados com ^{15}N. Uma mistura de aminoácidos marcados e não marcados foi utilizada, mantendo-se a concentração final em 10^{-5}M e variando a proporção entre eles (0, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100% de aminoácido marcado).

Foi possível a detecção de praticamente todos os aminoácidos solúveis nos tecidos foliares de *Vriesea gigantea*, com exceção de ornitina, da metionina, da norvalina e do triptofano, os quais se apresentaram em baixíssimas concentrações e não puderam ser quantificados em todos os tempos de coleta. O perfil de aminoácidos obtida para essa espécie, contudo, mostrou possuir uma distribuição bastante heterogênea e que permaneceu praticamente inalterada ao longo do tempo e condição nitrogenada (Fig. 13). De forma geral, um montante de aproximadamente 88% de todos os aminoácidos foi encontrado na forma de asparagina, seguido do aspartato (~7%) e glutamina (~1,6%). Os demais aminoácidos representavam menos de 1% do conteúdo total de aminoácidos solúveis.

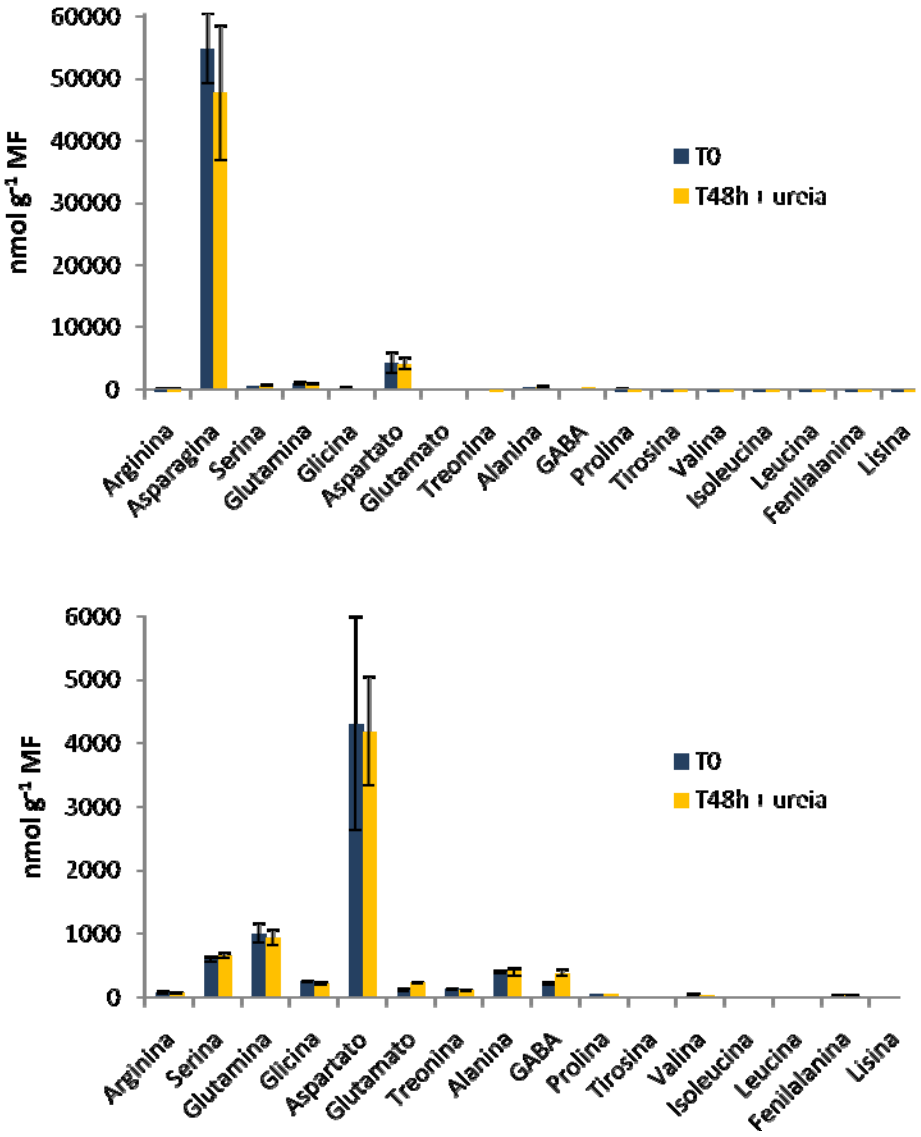


Figura 13: Distribuição de aminoácidos solúveis nos tecidos foliares de *Vriesea gigantea*. A) Todos os aminoácidos; B) Aminoácidos com exceção da asparagina. Resultado apresentado é

referente a plantas cultivadas em meio contendo 5 mM de ureia, coletadas após 0 e 48 horas. Barras representam a média ± DP (n=6).

Uma vez verificadas a adequação e sensibilidade da metodologia para a separação e análise de aminoácidos (marcados e não marcados), foram verificadas então as possíveis vias de assimilação de ureia pela bromélia epífita com tanque *Vriesea gigantea*. Foi detectada a incorporação dos isótopos ^{15}N ou ^{13}C, proveniente da ureia duplamente marcada, em 10 dos aminoácidos extraídos de *Vriesea gigantea*, sendo eles o glutamato, a glutamina, a alanina, o GABA, a isoleucina, a leucina, a fenilalanina, a serina, a glicina e a valina, como ilustrado nas figuras 14, 15, 16, 17 e 18. Não foram detectados, para esse período de análise, aminoácidos contendo 2 ou mais isótopos. Levando em consideração o tempo decorrente para que a marcação fosse visível, três grandes categorias puderam ser definidas: os aminoácidos de incorporação inicial (aqueles que aparecem em até 4 horas após exposição à ureia, e da qual fazem parte glutamato, glutamina e alanina), os de incorporação intermediária (observados no intervalo entre 5 e 12 horas de análise, na qual se enquadram GABA, isoleucina, leucina, fenilalanina e serina) e os de incorporação tardia (acima de 24 horas após contato com a ureia, representados pelos aminoácidos glicina e valina). Entretanto, apesar da proporção de alguns aminoácidos marcados ser relativamente alta nas plantas cultivadas em ureia (como é o caso do glutamato e alanina, por exemplo, que contaram com aproximadamente 30% de marcação após 48 horas de análise), praticamente nenhuma diferença significativa entre o conteúdo total de cada aminoácido foi constatada, no decorrer do período de análise, entre a condição experimental e o controle.

Embora a metodologia utilizada tivesse alta sensibilidade para a separação e análise de todos os aminoácidos, foram observados alguns problemas na detecção daqueles menos abundantes nos tecidos de *Vriesea gigantea*, como foi o caso da ornitina, da metionina, da norvalina e do triptofano, os quais se apresentaram ausentes na maioria das amostras. Outros aminoácidos, como o aspartato, lisina, tirosina e arginina, apesar de detectados em todos os pontos de coleta, apresentaram uma grande variação entre as replicatas, dificultando as análises. Não foi possível solucionar esses problemas por meio da utilização de maiores volumes amostrais, uma vez que a alta concentração de asparagina nos tecidos dessa espécie vegetal constituiu-se como um fator limitante à acurácia e sensibilidade dos detectores do equipamento.

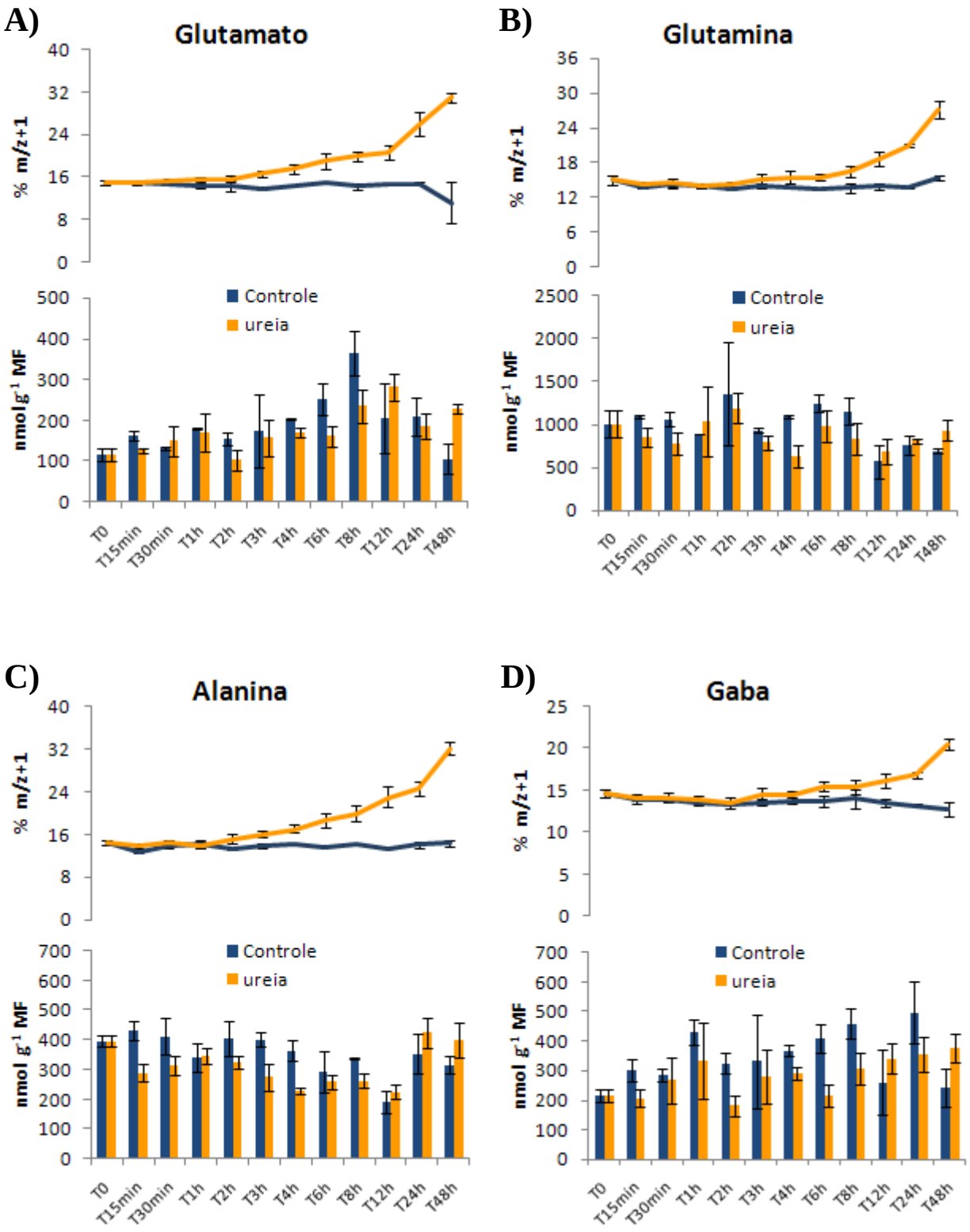


Figura 14: Assimilação de ureia em aminoácidos pela bromélia *Vriesea gigantea*. Análise de glutamato, glutamina, alanina e GABA livres nos tecidos foliares de *Vriesea gigantea*. Parte superior do gráfico representa a porcentagem de aminoácido marcado (% m/z+1), enquanto a parte inferior mostra o conteúdo total de cada aminoácido (nmol g^{-1} MF).

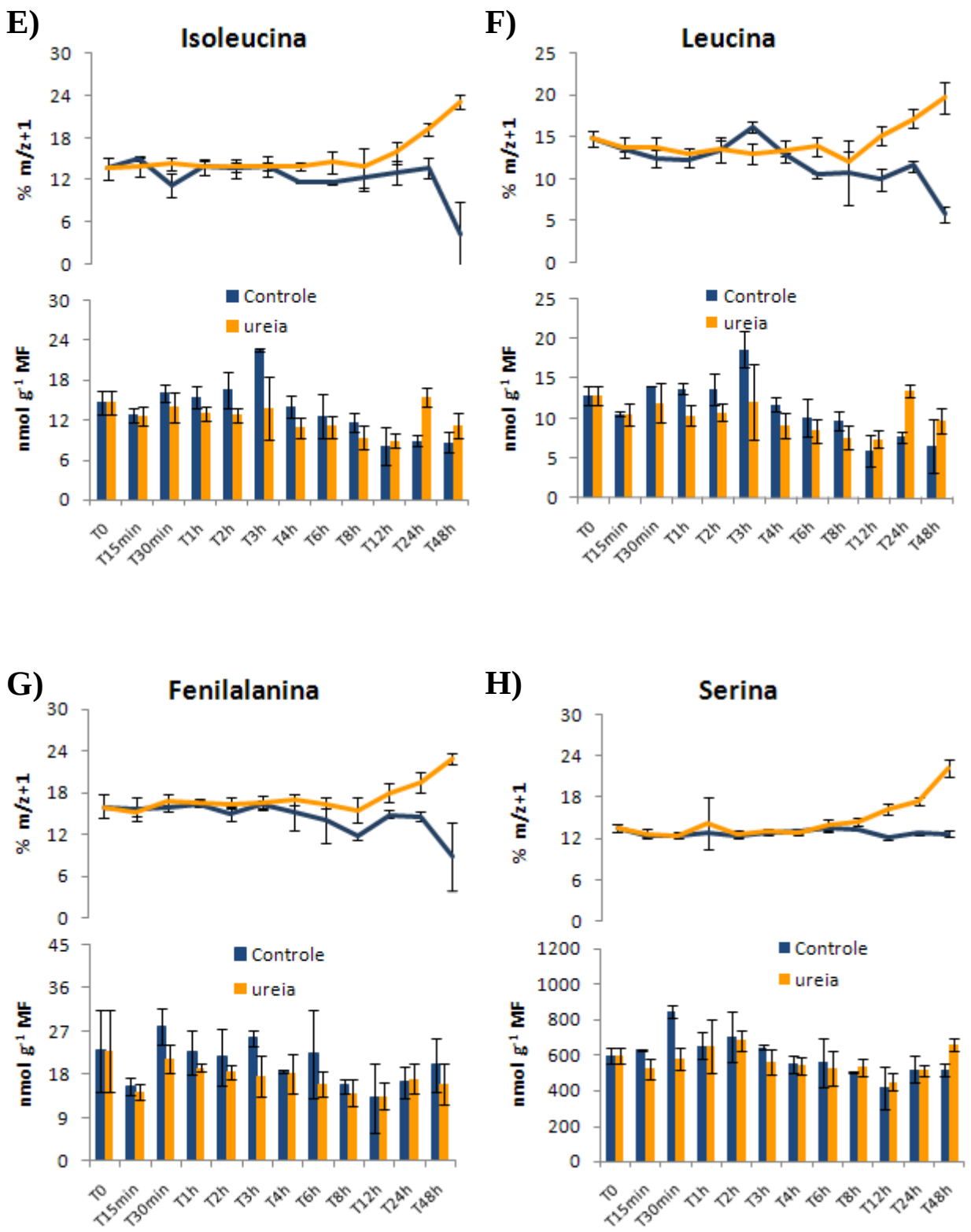


Figura 15: Assimilação de ureia em aminoácidos pela bromélia *Vriesea gigantea*. Análise de isoleucina, leucina, Fenilalanina e serina livres nos tecidos foliares de *Vriesea gigantea*. Parte superior do gráfico representa a porcentagem de aminoácido marcado (% m/z+1), enquanto a parte inferior mostra o conteúdo total de cada aminoácido (nmol g^{-1} MF).

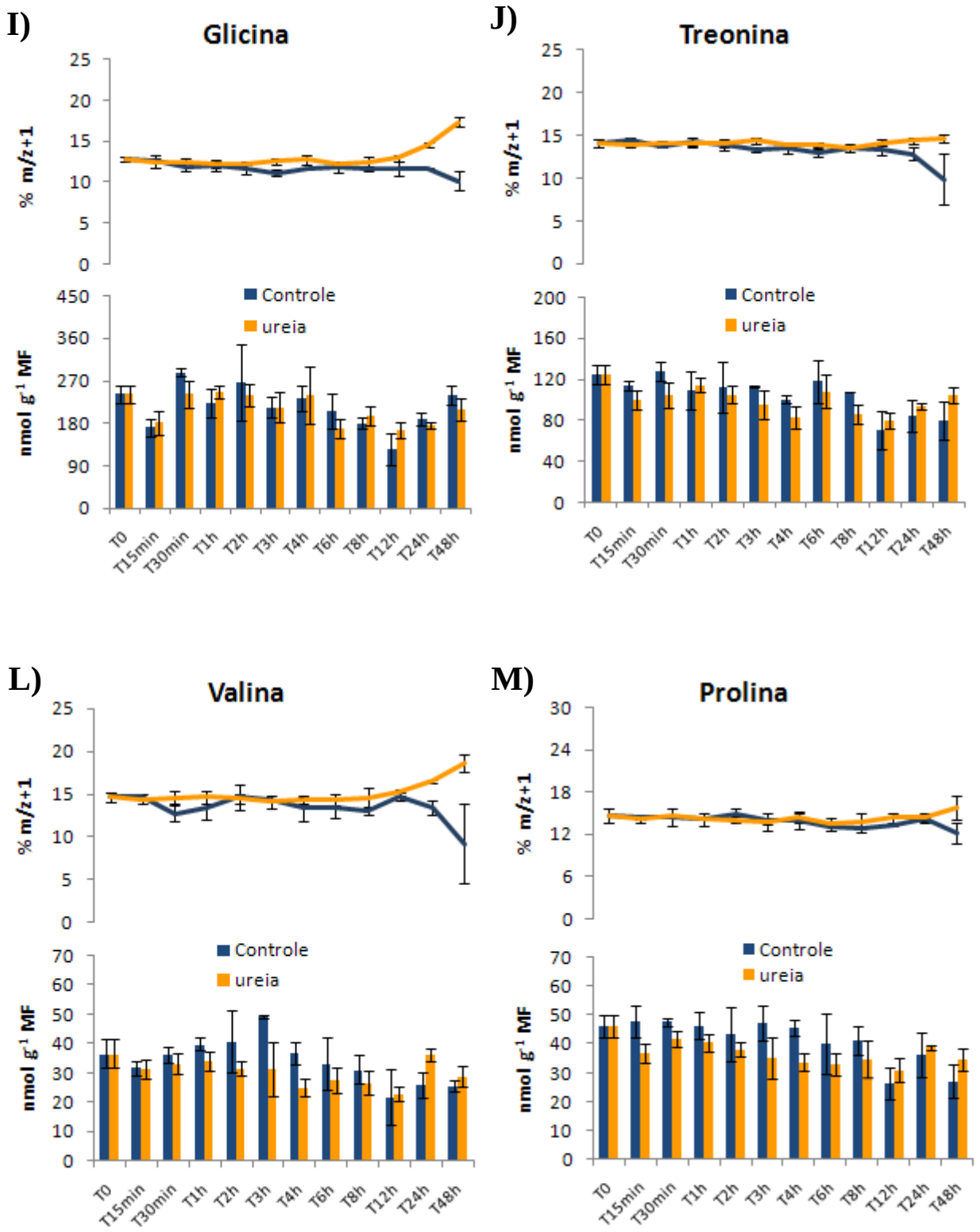


Figura 16: Assimilação de ureia em aminoácidos pela bromélia *Vriesea gigantea*. Análise de glicina, treonina, valina e prolina livres nos tecidos foliares de *Vriesea gigantea*. Parte superior do gráfico representa a porcentagem de aminoácido marcado (% m/z+1), enquanto a parte inferior mostra o conteúdo total de cada aminoácido (nmol g^{-1} MF).

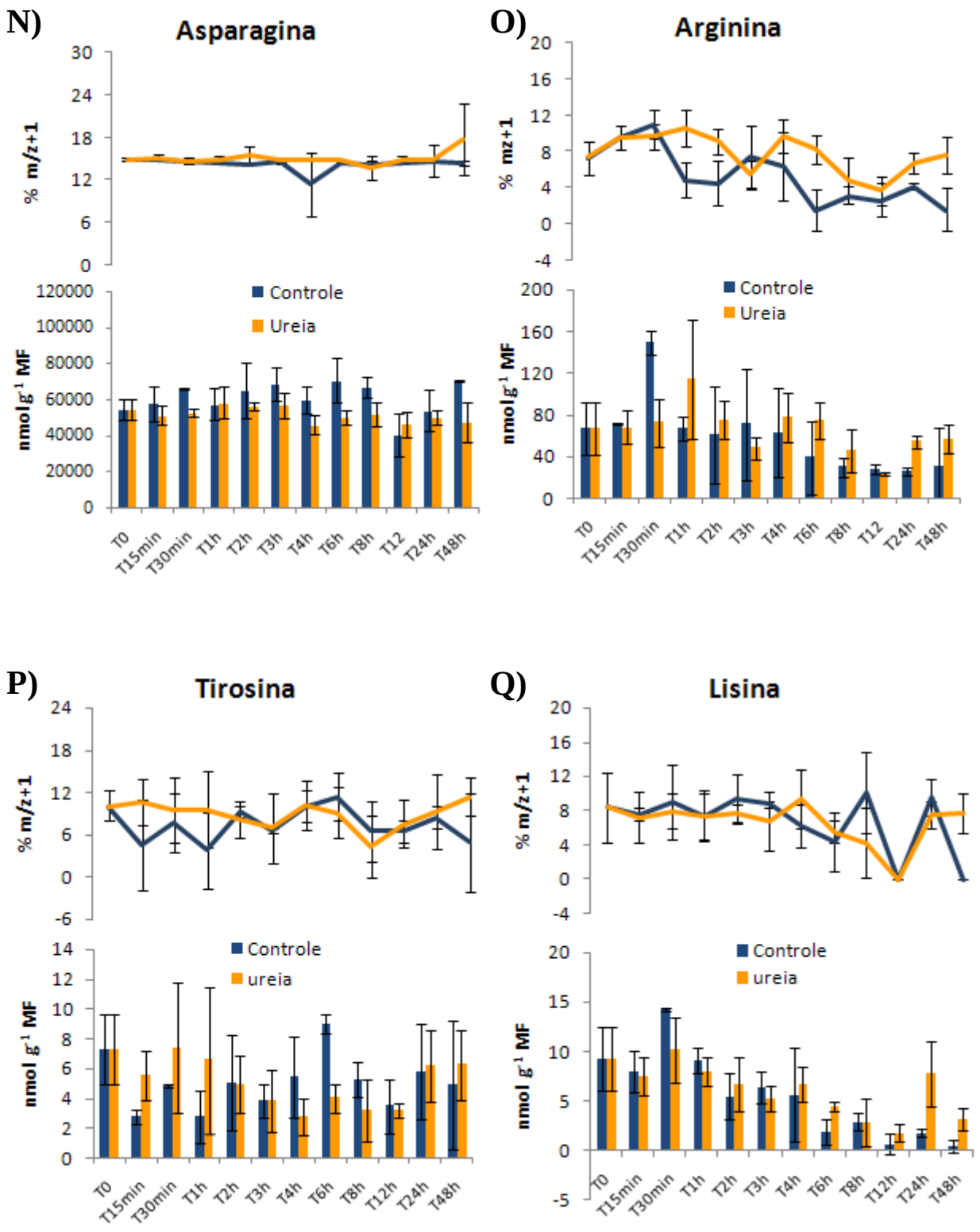


Figura 17: Assimilação de ureia em aminoácidos pela bromélia *Vriesea gigantea*. Análise de asparagina, arginina, tirosina e lisina livres nos tecidos foliares de *Vriesea gigantea*. Parte superior do gráfico representa a porcentagem de aminoácido marcado (% m/z+1), enquanto a parte inferior mostra o conteúdo total de cada aminoácido (nmol g^{-1} MF).

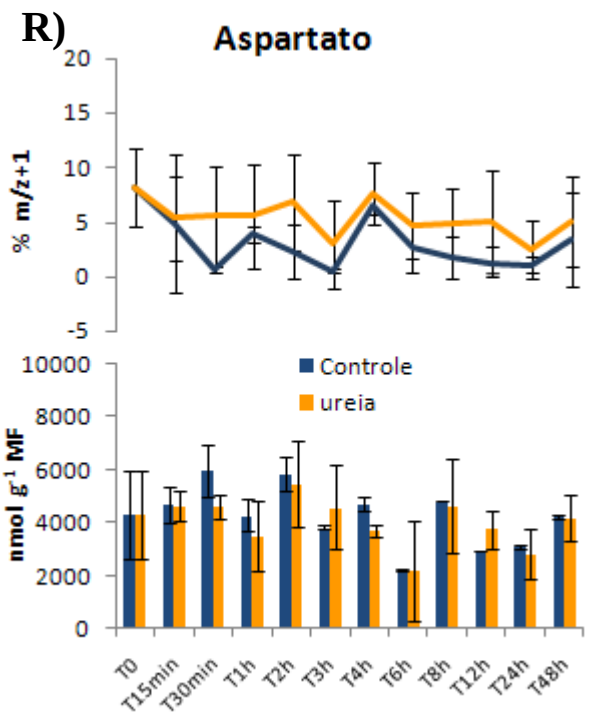


Figura 18: Análise da incorporação de ureia em aminoácidos pela bromélia *Vriesea gigantea*. R: aspartato livre nos tecidos foliares de *Vriesea gigantea*. Parte superior do gráfico representa a porcentagem de aspartato marcado (% m/z+1), enquanto a parte inferior mostra o conteúdo total desse aminoácido (nmol g^{-1} MF).

Discussão

A utilização de ureia como recurso nitrogenado por bromélias epífitas com tanque tem sido alvo de interesse há mais de 10 anos. Ocupando ambientes naturais frequentemente sujeitos à limitação de água e minerais, essas bromélias não só demonstraram ter capacidade de utilizar fontes alternativas de nitrogênio, como também tiveram seu crescimento favorecido na presença de ureia (Mercier *et al.*, 1997; Endres e Mercier, 2001a), recurso pouco usual para a grande maioria das plantas terrestres. Vários aspectos relacionados a esse processo já foram elucidados, como por exemplo as respostas hormonais (Mercier *et al.*, 1997) e as variações dos teores de clorofilas, amônio endógeno e do perfil de aminoácidos livres (Endres e Mercier, 2001 a,b) em plantas expostas à ureia. Mas, até o momento, pouca informação existe a respeito da assimilação desse composto em bromélias.

Embora seja amplamente aceito que a hidrólise prévia da ureia seja uma etapa imprescindível para que o N se torne disponível para as plantas, evidências fisiológicas sugerem a ocorrência de uma via alternativa para sua assimilação em *Vriesea gigantea*. Uma possibilidade seria a incorporação de ureia diretamente em aminoácidos. Reinbothe e Mothes, em 1962, sugeriram que a ureia poderia entrar no metabolismo vegetal via reação inversa da arginase.

Inicialmente, para verificar a possibilidade de ocorrência de tal rota metabólica, as atividades da urease e arginase nos tecidos foliares de *Vriesea gigantea* foram averiguadas durante a assimilação da ureia. De modo interessante, o aumento da atividade da urease só foi observado após 24 horas de cultivo, enquanto que a indução da arginase teve início já nas primeiras horas de exposição à ureia, sendo ela intensificada até o 7º dia de análise. Além disso, a indução dessa enzima ocorreu especificamente na presença de ureia, uma vez que nitrogênio disponibilizado na forma de amônio inibiu grande parte da atividade dessa enzima durante o mesmo intervalo de tempo.

Com uma função geralmente associada à degradação de reservas nitrogenadas, a síntese de arginase pelas células está sujeita a dois tipos de regulação: sua indução pelo acúmulo de arginina (Middelhoven, 1964) e inibição por amônio (Middelhoven 1968; Wiame, 1971). A inibição da arginase nas plantas cultivadas com amônio foi bem marcante neste trabalho, sendo ela coincidente com o período em que o acúmulo endógeno desse íon foi observado nas plantas. Já a indução da arginase nas que foram cultivadas com ureia foi também muito nítida e, a princípio, não existem indícios de que ela possa ter sido uma resposta à elevação do conteúdo de arginina solúvel nos tecidos dessa planta, se levarmos em consideração a análise temporal dos

aminoácidos em até 48 horas após exposição à ureia. De todos os pontos analisados, somente para as amostras referentes à coleta de 24 horas foi observada uma diferença significativa entre o conteúdo de arginina de plantas controle e aquelas cultivadas em ureia. Essa diferença, contudo, já não foi mais perceptível em tempos posteriores de análise, embora a atividade da arginase continuasse em elevação. Levando em consideração esses resultados, a participação direta ou indireta dessa enzima durante o processo de assimilação de ureia tornou-se evidente, podendo-se inclusive sugerir o envolvimento potencial da arginase na assimilação direta da ureia.

Particularmente em relação à urease, as atividades aumentadas observadas a partir do primeiro dia de análise confirmaram sua importância durante a assimilação de ureia. Essa indução da urease é também relatada para diversas outras espécies vegetais, seja pelo cultivo em substrato ou hidroponia ou até mesmo com a aplicação foliar de ureia (Matsumoto *et al.*, 1966; Polacco, 1976; Cheng e Ching, 1988). Contudo, essa indução enzimática foi questionada por Polacco e Holland (1993), os quais atribuíram esse aumento de atividade à indução das ureases de microorganismos comensais associados aos tecidos vegetais e não às enzimas das plantas propriamente dita. Tal posicionamento de Polacco e Holland é bastante pertinente, uma vez que a maioria dos estudos publicados até hoje sobre a utilização de ureia por plantas foi realizado em condições de cultivo não assépticas. A urease é uma enzima frequentemente encontrada em uma enorme variedade de seres vivos, além de ser altamente expressa e até mesmo secretada por várias espécies, em especial de microorganismos (Mobley *et al.*, 1995). Contudo, diferentemente desses estudos contestados por Polacco e Holland (1993), a indução da urease por ureia em *Vriesea gigantea* pôde ser atribuída à própria planta, uma vez que o uso do cultivo *in vitro* excluiu qualquer tipo de interferência por parte de microorganismos.

Para tentar elucidar as possíveis vias de assimilação da ureia, inclusive a possibilidade da arginase atuar diretamente na incorporação desse composto via sua reação inversa (no sentido da incorporação direta da ureia e formação de arginina), o uso de isótopos estáveis tornou-se necessário. Devido ao interesse particular em se determinar a massa dos aminoácidos, em especial da arginina, a busca por uma metodologia adequada foi bastante difícil. Embora para a maioria dos aminoácidos existisse uma ampla bibliografia disponível, em praticamente nenhum deles a arginina foi detectada em análises onde o acoplamento de espectrômetro de massa foi utilizado.

Com a colaboração do Professor Dr. Eduardo Purgatto, membro do Laboratório de Química e Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, os primeiros testes para a análise de aminoácidos por CG-MS foram realizados. Inicialmente foi

testado o MSTFA (N-Metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida) para a derivatização dos aminoácidos, o qual não se mostrou adequado. Alguns dos aminoácidos não foram derivatizados, inclusive a arginina, aminoácido de maior interesse no trabalho (dados não mostrados). É provável que o tamanho, estrutura e polaridade de alguns aminoácidos tenham influenciado no grau de derivatização, além de alterar a estabilidade dessas moléculas. A degradação da arginina foi um exemplo. Essa molécula sofreu uma intensa e diversas quebras durante o processo de derivatização e/ou análise, gerando uma gama de compostos pouco abundantes que não foram identificados com precisão pelo espectrômetro de massa, além de um pico correspondente à ornitina.

Uma segunda tentativa foi feita utilizando-se o MTBSTFA (N-metil-N-tert-butildimetilsilil-trifluoroacetamida) para a derivatização, metodologia descrita por Persson e Näsholm (2001) e que se mostrou adequada inclusive para a detecção de arginina. Contudo, também não tivemos êxito com essa metodologia, o que ocorreu provavelmente devido à grande instabilidade desse reagente e às condições não ideais para manuseá-lo. Posteriormente, uma terceira metodologia foi testada buscando-se uma técnica em que os aminoácidos são fossem submetidos a temperaturas elevadas (como é o caso da cromatografia a gás), diminuindo portanto a probabilidade de degradação dos aminoácidos mais instáveis. Assim, recorremos à Professora Dr[a]. Maria Terêsa Machini de Miranda, responsável pelo Laboratório de Química de Peptídeos do Instituto de Química da USP. Outras técnicas foram testadas, embora nenhuma delas tenha dado bons resultados.

Após todas essas tentativas e o grande interesse em se detectar a possível incorporação de ureia em arginina, recorreu-se à colaboração do Professor Dr. Torgny Näsholm, pesquisador da Universidade Sueca de Ciências da Agricultura em Umeå (Suécia), e especialista em estudos da utilização de aminoácidos por plantas. Naquela época, seu trabalho (Persson e Näsholm, 2001) tinha sido o único a relatar bons resultados para a análise de arginina com o emprego CG-MS. Embora o método descrito nesse artigo fosse adaptado para CG-MS, para as análises de aminoácidos de *Vriesea gigantea* uma nova metodologia foi testada utilizando-se um UPLC (cromatógrafo líquido de ultra performance) acoplado a espectrômetro de massa. Seria a primeira vez que tal método seria utilizado, e, caso funcionasse, possibilitaria análises relativamente rápidas, com alta sensibilidade e em temperatura próximas da ambiente, diminuindo o risco de degradação de moléculas.

Como relatado no item resultado, essa técnica de análise mostrou-se bastante promissora, possuindo uma alta sensibilidade para a separação e quantificação de todos os aminoácidos, inclusive a distinção acurada de moléculas contendo isótopos. Contudo, foram observados

alguns problemas na detecção dos aminoácidos menos abundantes nos tecidos de *Vriesea gigantea*, como foi o caso da ornitina, da metionina, da norvalina e do triptofano, os quais não foram detectados na maioria das amostras. Outros aminoácidos, como o aspartato, lisina, tirosina e arginina, apesar de detectados em todos os pontos de coleta, apresentaram uma grande variação entre as replicatas, dificultando as análises. A solução desses problemas por meio da utilização de maiores volumes amostrais não foi possível, uma vez que a alta concentração de asparagina nos tecidos dessa espécie vegetal constituiu-se um fator limitante à acurácia e sensibilidade dos detectores do equipamento. Dessa forma, a demonstração do envolvimento de algumas vias metabólicas durante a assimilação de ureia (em especial a hipotética reação inversa da arginase, que incorporaria urea em ornitina, formando arginina) foi prejudicada.

Levando em consideração os resultados dos demais aminoácidos e a não detecção de moléculas duplamente marcadas, pôde-se inferir que a via principal de assimilação de ureia seja precedida da sua hidrólise em NH_3 e CO_2. Apesar de não ter sido possível a distinção dos aminoácidos contendo ^{15}N ou ^{13}C, algumas rotas metabólicas puderam ser presumidas por meio da análise do tempo decorrido para a incorporação dos isótopos, bem como a abundância desses aminoácidos marcados, como representado nas figuras 19, 20 e 21. A formação inicial de glutamato e glutamina (detectável entre 2 e 3 horas de análise) sugere a incorporação do N proveniente da ureia tanto via GDH quanto GS/GOGAT, enzimas clássicas de assimilação de amônio (Miflin e Lea, 1980). Embora a GDH possa atuar em duplo sentido, altas concentrações desse íon favorecem sua atividade no sentido aminante (Cammaerts e Jacobs, 1985), importante para a manutenção de baixas concentrações de amônio nos tecidos. Também existe a possibilidade desse íon ter sido incorporado diretamente em piruvato formando serina, reação essa catalisada pela enzima L-serina amônia liase (EC: 4.3.1.17). Entretanto, essa via de assimilação de amônio parece não ter sido importante nos tecidos de *Vriesea gigantea*, pelo menos durante as primeiras horas de análise, uma vez que a marcação em serina só foi detectada decorridas 12 horas após o início do experimento.

Concomitante à formação de glutamina e glutamato, foram detectadas quantidades significativas de alanina e GABA, indicando que parte desse nitrogênio inicialmente assimilado foi rapidamente transferido pela atuação provável das enzimas L-alanina:2oxoglutarato aminotransferase (EC: 2.6.1.2) e L-glutamato 1-carboxiliase (EC: 4.1.1.15), respectivamente. Esses quatro aminoácidos, em especial o glutamato, parecem ter servido de base para a formação dos demais aminoácidos detectados durante as 48 horas de análise, como glicina, serina, fenilalanina, valina, leucina e isoleucina, processo que teve a participação de inúmeras enzimas, com destaque para as aminotransferases. Contudo, predizer com exatidão quais foram essas rotas

torna-se bastante arriscado devido à grande complexidade das vias de formação de aminoácidos, além das inúmeras interconexões com outros ciclos metabólicos. Algumas das prováveis vias envolvidas na síntese desses aminoácidos são apresentadas na figura 20.

Para tornar ainda mais intrincado o processo de assimilação de ureia, é muito provável que o CO_2, produto da sua hidrólise, também tenha sido assimilado por *Vriesea gigantea*. Conforme exposto no capítulo V, a maior parte do CO_2 proveniente da ureia ficou retida nos tecidos foliares dessa planta, mesmo após um longo tempo de análise. Além disso, por meio da técnica de citoquímica, observou-se um acúmulo desse composto ao redor dos cloroplastos, sugerindo sua utilização para a fotossíntese.

Embora o CO_2 possa ser assimilado diretamente em alguns aminoácidos, como é o caso do glutamato e da citrulina, é mais provável que a maior parte da sua incorporação se dê inicialmente via fotossíntese, se levado em consideração à alta concentração de CO_2 (proveniente da ureia) ao redor dos cloroplastos (capítulo V). Também, a incorporação de quantidades significativas do CO_2 em glutamato (via L-glutamato 1-carboxiliase, EC: 4.1.1.15) implicaria na presença de dupla marcação não só nesse aminoácido, mas em vários outros gerados a partir dele, fato esse não observado no período de análise.

Mesmo assimilado primariamente em açúcares, são grandes as chances desse carbono entrar para a via de síntese de aminoácidos por meio de intermediários comuns a várias vias metabólicas. Dentre esses intermediários, vários provém da fotossíntese e glicólise, como por exemplo o piruvato, o oxalacetato, o oxoglutarato, o fosfoenolpiruvato e o acetil-CoA, importantíssimos como doadores de esqueleto carbônico para a síntese de diversos aminoácidos, (Huppe e Turpin, 1994), como ilustrado no esquema 21. Para algumas dessas rotas de síntese, o fluxo de esqueletos carbônicos é bastante expressivo, como é o caso da via do chiquimato (que inclui a síntese de fenilalanina, tirosia e triptofano), para onde se estima que cerca de 20% de todo o carbono fixado pelas plantas seja destinado em condições normais de cultivo (Singh, 1999).

Embora não tenha sido possível distinguir a assimilação de C ou N da molécula de ureia, um alto percentual de marcação foi verificado em vários dos aminoácidos após 48 horas de análise. Apesar disso, poucos foram os pontos em que houve uma diferença estatística entre o conteúdo desses aminoácidos em plantas controle ou cultivadas com ureia, o que sugere rápidas transformações entre eles.

Comparar o perfil de incorporação de ureia em *Vriesea gigantea* com o de outras espécies não é tão simples devido ao pequeno número de trabalhos disponíveis e às diferentes condições experimentais e tempos de análise. As principais semelhanças se concentraram na

síntese inicial de glutamina e glutamato, evidenciando a ocorrência de hidrólise da ureia e o compartilhamento das vias de assimilação do amônio (Dilley e Walker, 1961; Mérigout *et al.*, 2007). Embora alguns dos outros aminoácidos também tenham sido detectados nessas espécies (*Prunus persica*, *Pyrus malus* e *Arabidopsis thaliana*), como por exemplo a alanina e o GABA, eles ocorreram em proporções muito diferenciadas se comparadas à *Vriesea*. Outro aspecto que chamou a atenção foi a não detecção da incorporação de isótopos em asparagina, aminoácido de reserva dessa bromélia. Duas hipóteses podem ser levantadas: ou o tempo de análise não foi longo o suficiente ou, mais provável ainda, que a marcação (mesmo que tenha ocorrido) ficou diluída no pool de asparagina, que é de longe o aminoácido mais abundante nos tecidos de *Vriesea gigantea* (cerca de 88% de total de aminoácidos livres).

Enquanto a maioria dos estudos relativos à assimilação de ureia em plantas se restrinja à análise do nitrogênio, raras são as informações a respeito da utilização do carbono presente nessa molécula. O único trabalho que exibe resultados detalhados sobre a assimilação do carbono da ureia data de 1961, em que os autores detectaram sua incorporação na fração de ácidos orgânicos, precursores para a síntese de aminoácidos. Também foram relatadas diferenças quanto à capacidade das espécies *Prunus persica* e *Pyrus malus* em assimilar esse carbono (Dilley e Walker, 1961).

Embora em *Vriesea gigantea* tenha sido observado um aumento expressivo da atividade da arginase durante o período em que ocorre a assimilação de ureia, a comprovação de que essa enzima possa atuar no seu sentido inverso ainda não foi possível. Uma vez que o problema com a detecção da arginina nos tecidos dessa bromélia foi ocasionado pela sua baixa concentração, novas análises serão feitas de forma a se obter frações de aminoácidos ricas em arginina, aminoácido de maior interesse nesse trabalho. Para isso, as propriedades químicas da resina utilizada na purificação dos aminoácidos serão alteradas de modo a aumentar sua afinidade pelos aminoácidos básicos, que, após eluídos, serão analisados em UPLC-MS. Dessa forma, maiores serão as chances de se encontrar arginina duplamente marcada (m/z+3), comprovando a existência da via de assimilação direta da ureia.

De toda forma, mesmo que futuramente não se confirme a inexistência dessa rota de incorporação via arginase, essa enzima parece desempenhar um papel importante durante a assimilação de ureia. Afirmar qual seria essa função ainda não é possível, pois dependeria de diversas outras análises metabólicas e fisiológicas. Contudo, pode-se sugerir, por exemplo, uma possível interferência na via de síntese de poliaminas, mais especificamente de putrescina. A síntese dessa poliamina envolve a hidrólise inicial da arginina, que gera urea e ornitina, sendo

esse aminoácido então utilizado pela enzima ornitina descarboxilase (ODC) para a produção de putrescina (Walters, 2003).

Por fim, ainda é possível que parte da ureia absorvida por *Vriesea gigantea* esteja sendo incorporada por outra via metabólica não explorada neste trabalho. Justamente pelo fato de haver discrepâncias significativas entre o conteúdo de ureia absorvido pelas plantas, a fração que é acumulada endogenamente e o potencial enzimático para sua hidrólise, pode-se sugerir que essa ureia é, de alguma forma, imobilizada na forma de outro metabólito. Uma série de outras reações enzimáticas bidirecionais utiliza a ureia como substrato e poderiam ser candidatas a assumir essa função de assimilação desse composto. Exemplos disso seriam a enzima guanidinoacetato amidohidrolase (EC: 3.5.3.2), que catalisa a condensação de ureia e glicina gerando guanidinoacetato e água, a enzima N-amidino-L-aspartato amidinohidrolase (EC: 3.5.3.14), que incorpora ureia em aspartato e produz N-amidino-L-aspartato e água, a enzima 3-guanidinopropanoato amidinopropionase (EC: 3.5.3.17), responsável pela condensação de ureia a beta-alanina e formação de 3-guanidinopropanoato e água, e a enzima agmatine amidinohidrolase (EC: 3.5.3.11), que incorpora ureia em putrescina e gera agmatina e água.

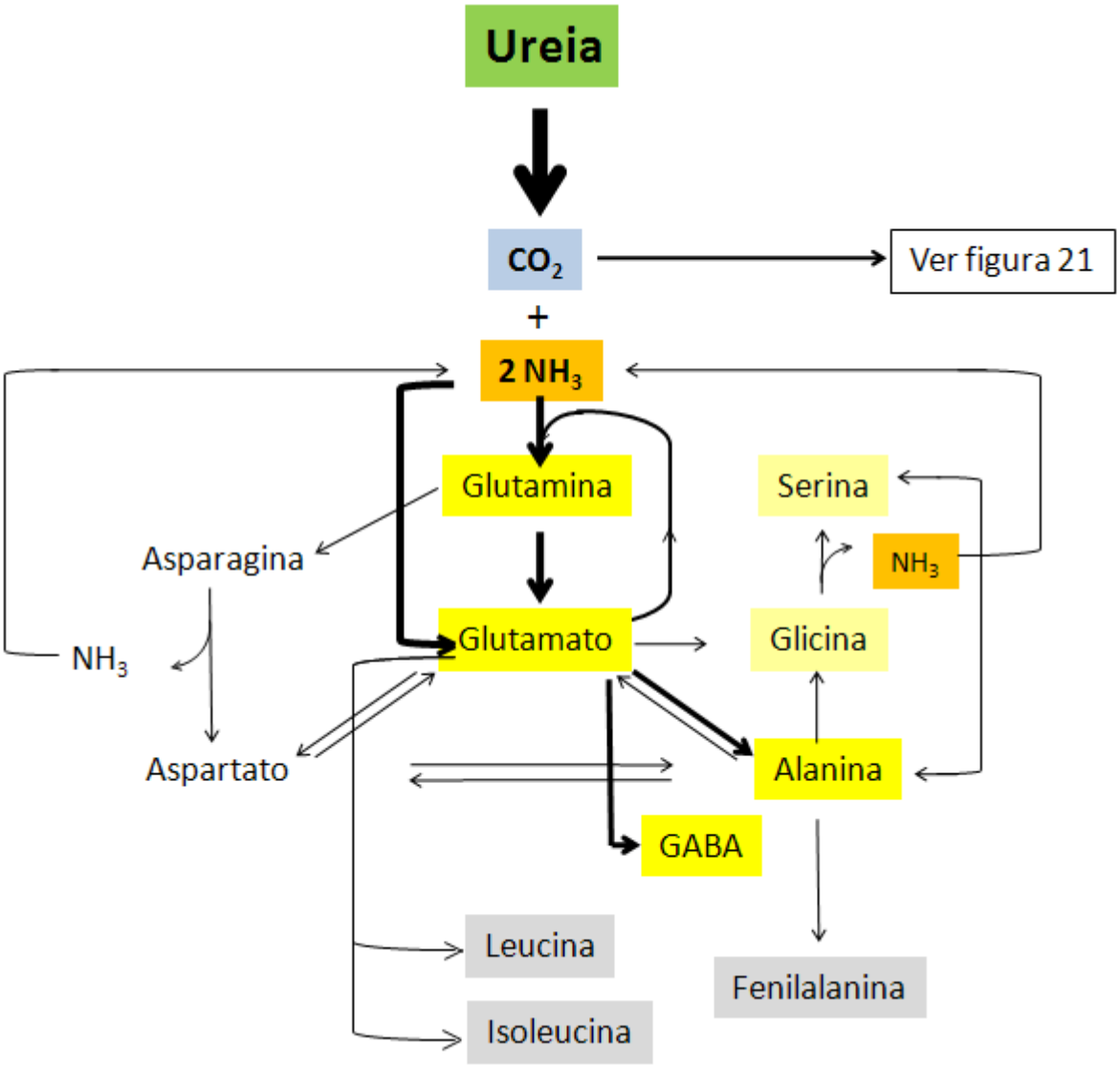


Figura 19: esquema representativo do fluxo principal de ^{15}N durante a assimilação de ureia em *Vriesea gigantea*. Plantas foram cultivadas em meio de cultura contendo 5 mM de urea duplamente marcada (^{13}C e ^{15}N, com 98% de enriquecimento) durante 48 horas. Análises temporais para a determinação de aminoácidos marcados foram realizadas com a utilização de UPLC-MS. Em amarelo escuro, aminoácido produzidos em maior abundância durante assimilação de ureia, (glutamato, glutamina, alanina e GABA, os primeiros aminoácidos formados); em amarelo claro, aminoácidos gerados em quantidades intermediárias (serina e glicina, a partir de 12 e 24 horas, respectivamente); em cinza, aminoácidos formados em pequenas quantidades (entre 12 e 24 horas após exposição à ureia).

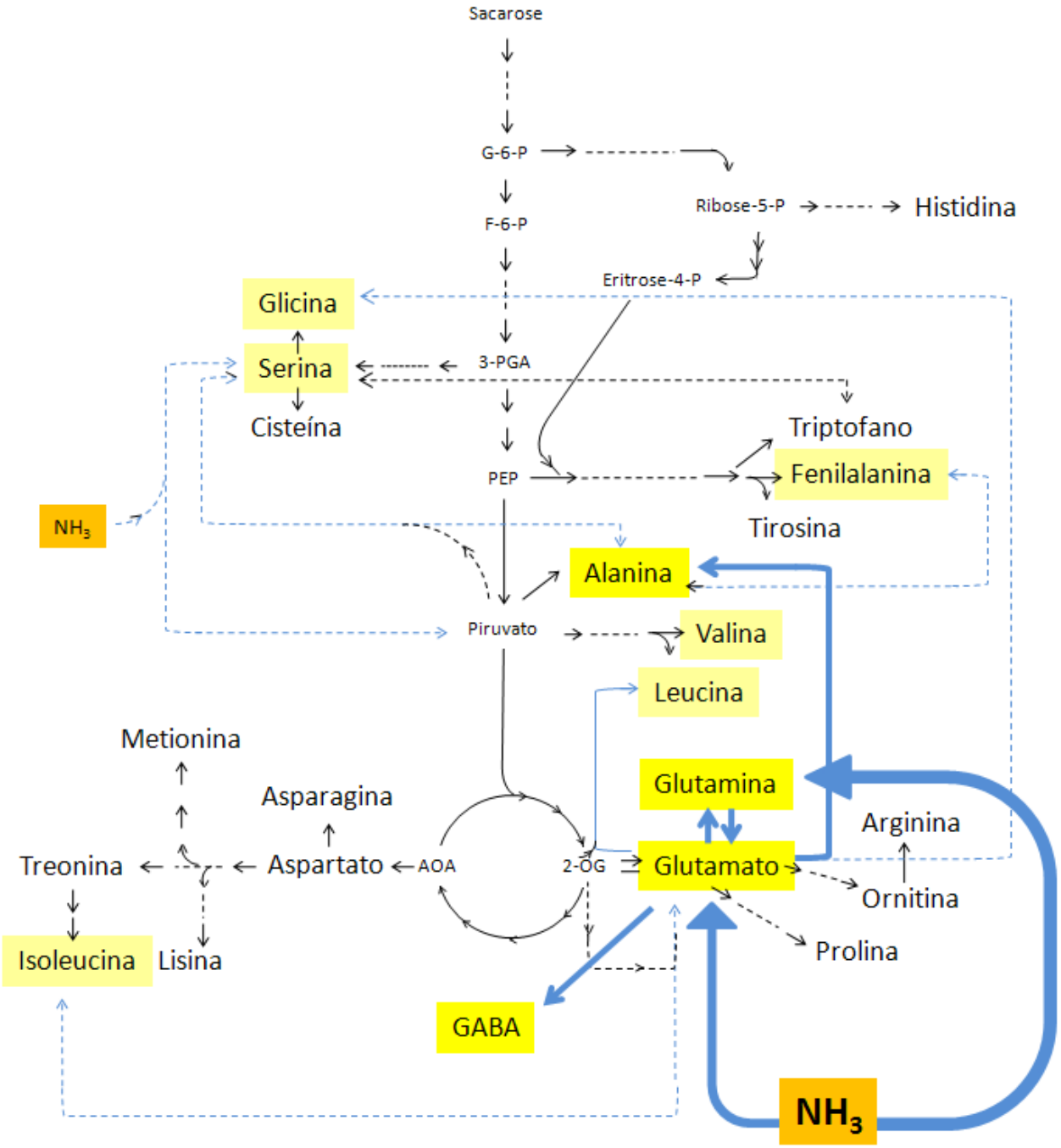


Figura 20: esquema simplificado das rotas de síntese de aminoácidos, ilustrando as mais prováveis vias de entrada e transferência do $^{15}NH_3$ gerado após hidrólise da ureia por *Vriesea gigantea*. A incorporação de isótopos estáveis foi detectada nos aminoácidos representados em tons de amarelo. Setas azuis, em diferentes espessuras, indicam rotas usadas com maior probabilidade para a geração desse padrão de marcação observado após 48 horas de cultivo em 5 mM de ureia. duplamente marcada (^{13}C e ^{15}N, com 98% de enriquecimento) Análises temporais para a determinação de aminoácidos marcados foram realizadas com a utilização de UPLC-MS.

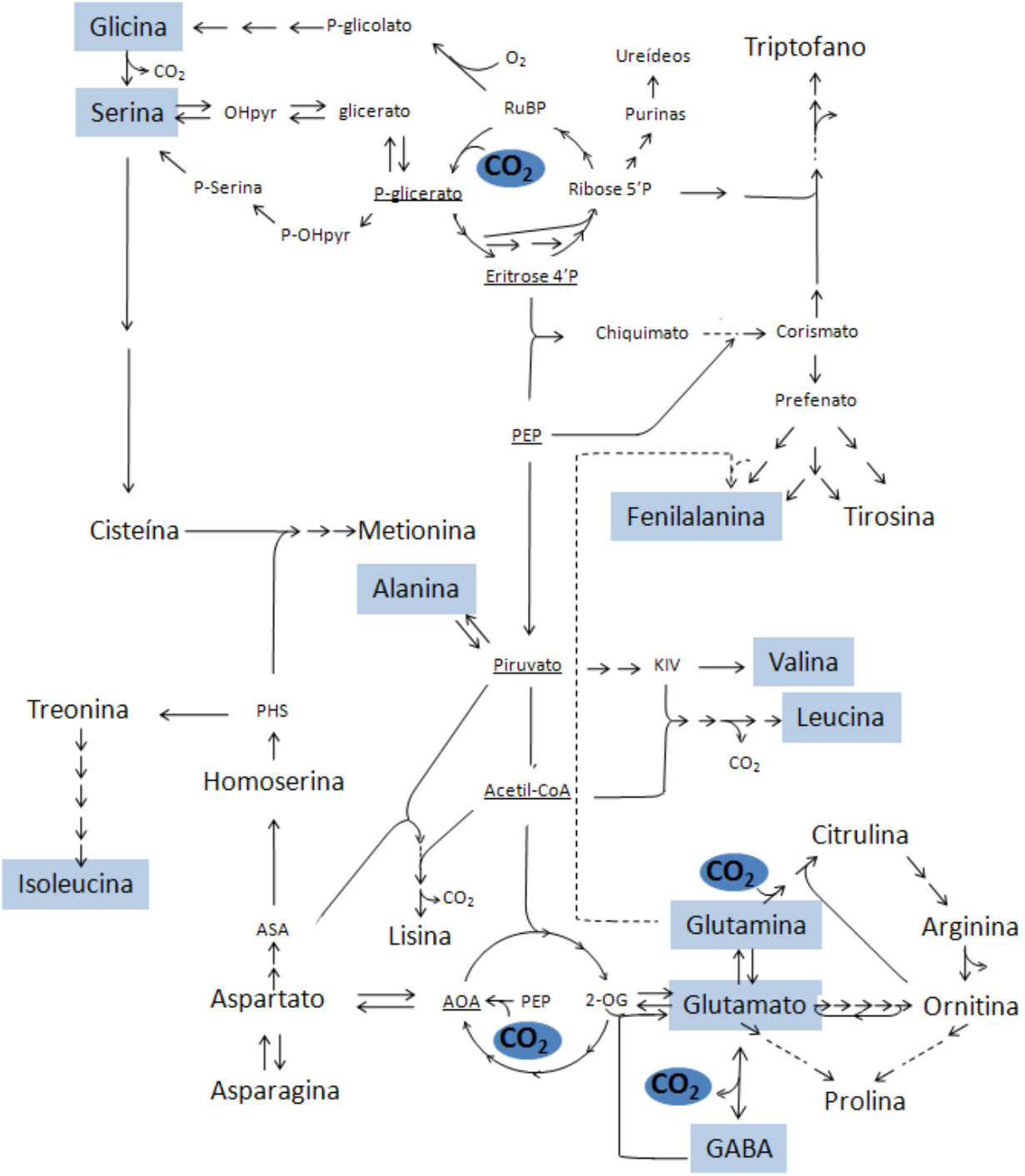


Figura 21: Assimilação de $^{15}CO_2$ (proveniente da ureia) em aminoácidos nos tecidos foliares de *Vriesea gigantea*. Plantas foram cultivadas em meio de cultura contendo 5 mM de urea duplamente marcada (^{13}C e ^{15}N, com 98% de enriquecimento) durante 48 horas. Análises temporais para a determinação de aminoácidos marcados foram realizadas com a utilização de UPLC-MS. Aminoácidos contendo isótopos estão grifados com cor azul.

Bibliografia

Abendroth A., 1971. Bromeliads and frogs. *Journal of Bromeliad Society* **21**: 83-84.

Abuzinadah R.A., Read D.J., 1986. The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants. *New Phytologist* **103**: 495-506.

Benzing D.H., 1980. The biology of bromeliads. Mad River Press. California.

Benzing D.H., 1990. Vascular epiphyts, general biology and related biota. Ashton, P.S. (ed.), Cambridge, Cambridge University Press.

Benzing D.H., 2000. Bromeliaceae: profile of an adaptative radiation. Cambridge, Cambridge University Press.

Cammaerts D, Jacobs M., 1985. A study of the role of glutamate-dehydrogenase in the nitrogen-metabolism of *Arabidopsis thaliana*. *PLANTA* **163** (4): 517-526.

Chapin F.S. III, Moilainen L., Kielland K., 1993. Preferential use of organic nitrogen by a non-mycorrhizal arctic sedge. *Nature* **361**: 150-153.

Dilley D.R., Walker D.R.., 1961. Assimilation of ^{14}C, ^{15}N labeled urea by excised apple and peach leaves. *Plant Physiology* **36** (6): 757-761.

Endres L., Mercier H., 2001. Influence of nitrogen forms on the growth and nitrogen metabolism of bromeliads. *Journal of Plant Nutrition* **24** (1): 29-42.

Endres L., Mercier H., 2001b. Ammonium and urea as nitrogen sources for bromeliads. *Journal of Plant Physiology* **158:** 205-212.

Eterovick P.C., 1999. Use and sharing of calling and retreat sites by *Phyllodytes luteolus* in a modified environment. *Journal of Herpetology* **33**: 17-22.

Gerendás J., Sattelmacher B. 1997. Significance of Ni supply for growth, urease activity and the concentrations of urea, amino acids and mineral nutrients of urea grow plants. *Plant and Soil* **190**: 153-162.

Hattori A., 1957. Studies on the metabolism of urea and other nitrogenous compounds in *chlorella ellipsoidea* .1. Assimilation of urea and other nitrogenous compounds by nitrogen-starved cells. *Journal of Biochemistry* **44** (5): 253-273.

Hattori A., 1958. Studies on the metabolism of urea and other nitrogenous compounds in *chlorella ellipsoidea* .2. Changes on levels of amino acids and amides during the

assimilation of ammonia and urea by nitrogen-starved cells. *Journal of Biochemistry* **45** (1): 57-64.

Inselsbacher E., Cambui C.A., Richter A., Stange C.F., Mercier H., Wanek W., 2007. Microbial activities and foliar uptake of nitrogen in the epiphytic bromeliad *Vriesea gigantea*. *New Phytologist* **175** (2): 311-320.

Kielland K., 1994. Amino acid absorption by arctic plants: implications for plant nutrition and nitrogen cycling. *Ecology* **75** (8): 2373-2383.

King J.E., Gifford D.J., 1997. Amino acid utilization in seeds of loblolly pine during germination and early seedling growth. 1. Arginine and arginase activity. *Plant Physiology* **113** (4): 1125-1135.

Knudson L., 1946. A new nutrient solution for germination for orchid seed. *American Orchid Society Bulletin* **15**: 214-217.

Kollöffel C., Van Dijke H.D., 1975. Mitochondrial arginase activity from cotyledons of developing and germinating seeds of *Vicia faba* L. *Plant Physiol.* **55**: 507-510.

Lam H.-M., Coschigano K.T., Oliveira, I.C.; Melo-Oliveira, R., Coruzzi, G.M., 1996. The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 569-593.

Lopez L.C.S., Rodrigues P.J.F.P., Rios R.I., 1999. Frogs and snakes as phoretic dispersal agents of bromeliad ostracods (*Limnocytheridae: Elpidium*) and annelids (*Naididae: Dero*). *Biotropica* **31**: 705-708.

Marschner, H., 1995. Mineral nutrition of higher plants. Second edition. Academic Press London.

McCullough H., 1967. Determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clinica Chimica Acta* **17** (2): 297-304.

Melin E., Nilsson H., 1953. Transfer of labeled nitrogen from glutamic acid to pine seedlings through the mycelium of *Boletus variegates* (SW) Fr. *Nature* **171**: 134.

Mercier H., Kerbauy G.B., Sotta B., Miginiac E., 1997. 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* **20** (3): 387-392.

Middelhoven W.J., 1964. Pathway of arginine breakdown in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **93**: 650-652.

Middelhoven W.J., 1968. The derepression of arginase and of ornithine transaminase in nitrogen-starved baker's yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **156**: 440-443.

Miflin B.J., Lea P.J. (1980) Ammonia assimilation. *In* Miflin B.J. (ed), The Biochemistry of Plants, Vol 5. Academic Press, New York, pp 169–202.

Mobley H.L.T., Island M.D., Hausinger R.P., 1995. Molecular-biology of microbial ureases. *Microbiological Reviews* **59** (3): 451-480.

Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497.

Näsholm T., Ekblad A., Nordin A., Giesler R., Högberg M., Högberg P., 1998. Boreal forest plants take up organic nitrogen. *Nature* **302**: 914-916.

Nordin A., Näsholm T., 1997. Nitrogen storage in nine boreal understorey plant species. *Oecologia* **110**: 487-492.

Persson J., Näsholm T., 2001. A GC-MS method for determination of amino acid uptake by plants. *Physiologia Plantarum* **113**: 352–358.

Polacco J.C., Holland M.A., 1993. Roles of urease in plant cells. *International Review of Cytology* **145**: 65-103.

Polacco J.C., 1976. Nitrogen-metabolism in soybean tissue-culture. 1. Assimilation of urea. *Plant Physiology* **58** (3): 350-357

Porembska Z, 1973. Different species of arginase in animal-tissues. *Enzyme* **15** (1-6): 198-209.

Raab T.K., Lipson D.A., Monson R.K., 1996. Non-mycorrhizal uptake of amino acids by roots of the alpine sedge *Kobresia myosuroides*: implications for the alpine nitrogen cycle. *Oecologia* **80**: 488-494.

Raab T.K., Lipson D.A., Monson R.K., 1999. Soil amino acid utilization among species of the Cyperaceae: Plant and soil processes. *Ecology* **80** (7): 2408-2419.

Reinbothe H., Mothes K., 1962. Urea, ureides and guanidines in plant. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **13**: 129-150.

Richardson B.A., Richardson M.J., Scatena F.N., McDowells W.H., 2000. Effects of nutrient availability and other elevational changes on bromeliad population and their invertebrate communities in a humid tropical forest in Puerto Rico. *Journal of Tropical Ecology* **16**: 167-188.

Salama A.M.S., Wareing D.A., 1979. Effects of mineral nutrition on endogenous cytokinins in plants of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Experimental Botany* **30**: 971-981.

Schimel J.P., Chapin F.S. III, 1996. Tundra plant uptake of amino acid and NH_4^+ nitrogen *in situ*: Plants compete well for amino acid N. *Ecology* **77**: 2142-2147.

Schimke, R.T., 1970. Arginase (rat liver). *Methods Enzymology* **17**: 313-317.

Schulze W., Frommer W.B., Ward J.M., 1999. Transporters for ammonium, amino acids and peptides are expressed in pitchers of the carnivorous plant Nepenthes. The Plant Journal 17 (6): 637-646.

Schulze W., Frommer W.B., Ward, J.M. 1999. Transporters for ammonium, amino acids and peptides are expressed in pitchers of the carnivorous plant Nepenthes. *Plant Journal*, **17** (6): 637-646.

Singh B.S., 1999. Plant Amino Acids. Biochemistry and Biotechnology. Marcel Dekker Inc. New York.

Smith S.D., Monson R.K., Anderson J.E. 1997, Physiological ecology of North American desert plants. Springer, New York.

Splittstoesser W.E., 1969. The appearance of arginine in pumpkin cotyledons. Characterization of arginase. *Phytochemistry* **8**: 753-758.

Stribley D.P., Read D.J., 1980. The biology of mycorrhizal infection and the capacity to utilize simple and complex nitrogen sources. *New Phytologist* **86**: 365-371.

Wake D.B., 1987. Adaptative radiation of salamanders in middle American cloud frogs. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **74**: 242-264.

Walker J.B., 1957. Arginosuccinic acid from Chlorella. *Biochemistry* **38**: 561-566.

Walters D.R, 2003. Polyamines and plant disease. *Phytochemistry* **64**: 97-107.

Weatherburn M.W., 1967. Phenol-Hypochlorite Reaction for Determination of ammonia. *Analytical Chemistry* **39**: 971-974.

Wiame J.M, 1971. The regulation of arginine metabolism in *Sarccharomyces cerevisiae*: exclusion mechanisms. *Curr. Top. Cell Regul.* **4**: 1-38.

CAPÍTULO IV

CONTRIBUIÇÃO DA UREASE NA UTILIZAÇÃO DA UREIA: UM POUCO ALÉM DE UMA SIMPLES HIDRÓLISE

Introdução

Marco dos estudos de enzimologia por ter sido a primeira enzima obtida no seu estado cristalino, confirmando a natureza protéica dos catalisadores biológicos (Sumner, 1926), bem como a primeira em que se demonstrou a presença de níquel na sua estrutura (Dixon *et al.*, 1975), a urease (EC 3.5.1.5) sempre foi alvo de muito interesse científico.

Essa enzima catalisa a hidrólise da ureia em amônio e dióxido de carbono. Presente em muitas plantas, bactérias, fungos e algas, a urease possui um papel de extrema importância no metabolismo do nitrogênio. De forma geral, ela permite que os organismos utilizem a ureia, tanto proveniente no meio externo quanto a gerada endogenamente, e a transforme em amônio, o qual é utilizado diretamente como fonte de nitrogênio para o crescimento (Mobley e Hausinger, 1989; Mobley *et al.*, 1995). Duas isoenzimas já foram identificadas em plantas: a urease embrio-específica, uma proteína abundante em sementes de muitas espécies de plantas (Bailey e Boulter, 1971; Polacco e Holland, 1993; Zonia *et al*., 1995) e a urease ubíqua, encontrada em pequenas quantidades em todos os tecidos vegetais (Hogan *et al*., 1983; Polacco e Holland, 1993).

Dentre os papéis desempenhados pela urease em plantas, propõe-se que ela funcione em sintonia com a arginase na utilização das reservas protéicas de sementes durante a germinação (Thompson, 1980). Aumentos na quantidade de ureia e na atividade da urease durante o desenvolvimento de plântulas de *Arabidopsis thaliana*, por exemplo, corroboram com o papel da urease na reciclagem da ureia proveniente do catabolismo das reservas nitrogenadas (Zonia *et al.*, 1995), indicando, assim, uma importante função no metabolismo nitrogenado de plântulas.

Um segundo papel proposto para essa enzima seria a assimilação da ureia derivada do metabolismo de ureídeos (Shelp e Ireland, 1985). Além disso, sendo comum em vegetais e bactérias, ela provavelmente auxilia na reciclagem da ureia derivada de fontes animais e vegetais, convertendo-a em amônio, o qual pode ser utilizado (Stebbins *et al.*, 1991).

Por fim, a urease tem ganhado um papel de destaque nos últimos anos devido ao aumento da utilização da ureia como fertilizante na agricultura mundial. Atualmente, a ureia é considerada o principal recurso nitrogenado utilizado nos campos de produção (http://www.fertilizer.org/ifa/Home-Page/STATISTICS), devido principalmente ao seu alto teor nitrogenado e baixo custo. Consequentemente, a dinâmica da atuação da urease tem sido cada vez mais alvo de interesse da comunidade científica.

Apesar de muitos estudos a respeito dessa enzima, alguns aspectos ainda não foram totalmente elucidados. Em plantas, por exemplo, a urease é usualmente considerada como sendo uma enzima citoplasmática. De fato, a atividade da urease é, em geral, quantificada pela

utilização da fração solúvel celular. Embora existam poucos dados na literatura sobre a citolocalização dessa enzima, a informação disponível é ainda controversa. Os primeiros autores a sugerir a localização da urease em plantas foram Murray e Knox (1977). Por meio da técnica de imunoflorescência, esses autores observaram que a urease estava associada tanto a pequenos grânulos no citoplasma quanto presente nos espaços intercelulares das células parenquimáticas de *Canavalia ensiformis*. Esses resultados, contudo, foram contraditórios aos verificados por Faye *et al*. (1986), que demonstraram, por meio de técnica de imunocitoquímica, que a urease extraída das sementes de *Canavalia ensiformis* era uma proteína citossólica.

Essa contradição é também encontrada em estudos com ureases de bactérias. Por exemplo, essa enzima foi associada com a membrana e periplasma em *Proteus mirabilis* e no gênero *Staphylococus* (McLean *et al*., 1985; McLean *et al*., 1986). Mais tarde, esses resultados foram contestados devido à técnica utilizada por McLean e colaboradores. Apesar de toda essa polêmica, parece haver um consenso geral de que, pelo menos em *Helicobacter pylori*, a urease está localizada na superfície celular (Dunn *et al*., 1990; Evans *et al*., 1991).

Também, foi demonstrada a habilidade de algumas espécies de liquens em secretar a urease quando na presença de ureia (Legaz *et al*., 1986; Pérez-Urria e Vicente, 1989; Pérez-Urria *et al*., 1989). Essa descoberta, inicialmente relatada em 1986, sugeriu a localização transitória da urease na parede celular da alga do líquen (Legaz e Vicente, 1989), sendo mais tarde confirmada tanto por meio de provas indiretas e diretas. Molina e colaboradores (1993), por exemplo, sugeriram a presença constante da urease na parede celular dessas algas usando uma lecitina marcada com ferritina, a qual é capaz de se ligar ao domínio poligalactosídico da urease. Millanes e colaboradores (2004) também demonstraram que a urease estava localizada na parede celular tanto por meio da detecção citoquímica dessa enzima quanto pela quantificação da sua atividade diretamente nas diferentes frações celulares.

Recentemente, a habilidade de secretar urease também foi demonstrada em uma espécie de planta vascular, a bromélia epífita com tanque *Vriesea gigantea*, quando cultivada na presença de ureia em condições assépticas de cultivo (Inselsbacher *et al*., 2007). Nessas condições, pode-se inferir a existência de, pelo menos, uma localização transitória dessa enzima na membrana plasmática e na parede celular. Embora, em condições naturais, a ureia não seja uma fonte de nitrogênio normalmente encontrada em abundância nos solos, ela parece ser de grande importância para algumas espécies de plantas epífitas, como as bromélias com tanque. Em experimentos conduzidos em condições de cultivo *in vitro*, essas plantas apresentaram um melhor crescimento quando cultivadas em meio de cultura contendo ureia, em detrimento de fontes inorgânicas de nitrogênio (Mercier *et al*., 1997; Endres e Mercier, 2001). Em seu habitat

natural, a ureia é derivada principalmente da excreta de anfíbios que visitam ou vivem dentro do tanque dessas bromélias, sendo sua assimilação dependente da atividade da urease. Levando em consideração a habilidade de *Vriesea gigantea* em utilizar a ureia, essa espécie constitui um bom material biológico para o estudo dos processos relacionados com a utilização da ureia, incluindo a atividade da urease e sua localização celular.

Objetivos

Considerando a capacidade de *Vriesea gigantea* secretar a urease para o meio externo e, consequentemente, a possibilidade dessa enzima estar localizada na parede celular e membrana plasmática, o objetivo desta etapa do trabalho foi elucidar a citolocalização da urease nessa espécie vegetal, comparando-a com espécies de diferentes hábitos de crescimento e preferência nitrogenada. Para tanto, foram analisadas duas espécies de bromélias: a epífita com tanque *Vriesea gigantea* e a terrestre *Ananas comosus*. Como controle, utilizou-se a espécie de leguminosa *Phaseolus vulgaris*. Espera-se que a presença da urease na parede celular e membranas seja maior nos tecidos de plantas que utilizam preferencialmente a ureia como fonte de nitrogênio, como as bromélias com tanque, em comparação com as espécies que utilizam fontes inorgânicas, como as bromélias terrestres. Para todas as espécies, a citolocalização da urease foi investigada por meio de ensaios enzimáticos e de imunoreação utilizando as frações de citoplasma, de parede celular e membranas. Além disso, a detecção citoquímica dessa enzima também foi investigada nos tecidos foliares de *Vriesea gigantea*.

Material e Métodos

I – Obtenção do material vegetal e delineamento experimental

1) Material vegetal

Três espécies foram comparadas quanto à distribuição da urease nas diferentes frações celulares: duas pertencentes à Família Bromeliaceae - a espécie terrestre *Ananas comosus* (L.) Merr e a epífita com tanque *Vriesea gigantea* (Gaudich.)- e uma espécie da Família Leguminosae - *Phaseolus vulgaris* (L.), a qual foi utilizada como controle devido à sua proximidade com *Canavalia ensiformis* (L.), única espécie vegetal estudada até o momento quanto à citolocalização da urease.

As plantas de *Vriesea gigantea* foram obtidas por meio da germinação *in vitro* das suas sementes. Para isso, essas foram desinfestadas em etanol 92% durante 5 minutos, seguido de imersão em uma solução de hipoclorito de sódio 2,5%, durante 2h, sob agitação constante. Após este procedimento, em câmara de fluxo de ar laminar, as sementes foram enxaguadas em água ultra-pura e estéril até que todo o hipoclorito fosse eliminado e, então, transferidas para o meio básico de crescimento composto pelos macronutrientes da solução Knudson (1946) e os micronutrientes do MS (Murashige e Skoog, 1962), adicionado de carbonato de cálcio, na concentração de 0.5 $g.L^{-1}$, como agente tamponante do meio de cultura (Salama e Wareing, 1979).

As plantas de *Ananas comosus* foram obtidas por multiplicação vegetativa *in vitro* utilizando o meio de Murashige e Skoog (1962) adicionado de 0,5 mg L^{-1} de piridoxina-HCl e ácido nitotínico, 4 mg L^{-1} de glicina, 100 mg L^{-1} de inositol, e 0,5 mg L^{-1} de ácido naftalenoacético e benzilaminopurina.

Já as plantas de *Phaseolus vulgaris* foram obtidas a partir de sementes germinadas em substrato de vermiculita.

O material vegetal foi mantido em sala climatizada com temperatura média de 25ºC ± 2ºC, fotoperíodo de 15h e intensidade luminosa de 50 μmol fótons m^{-2} s^{-1}, fornecida por lâmpadas fluorescentes.

2) Delineamento experimental

Plantas de *Vriesea gigantea,* com idade de 1 ano, e *Ananas comosus*, com idade de 3 meses, foram inicialmente submetidas à privação de nitrogênio por 2 semanas em meio básico de cultivo sem as fontes de N originais. Adicionaram-se a esse meio de cultura $CaSO_4$ (0,64 g L^{-1}), de modo a balancear os íons Ca^{2+} e SO_4^{2-} retirados juntamente com os sais nitrogenados, além de níquel na concentração de 10 μM, metal essencial para a atividade da urease. Após esse período, as plantas foram cultivadas por 48 horas em meio de cultura contendo 5 mM de ureia, como fonte exclusiva de nitrogênio, além de $CaSO_4$ e 10 μM de níquel. Já as plantas de *Phaseolus vulgaris*, com 3 semanas de idade, tiveram, dois dias antes da coleta, suas folhas pulverizadas com uma solução contendo 5 mM de ureia e 10 μM de níquel. Os tecidos foliares das três espécies foram coletados e utilizados para a quantificação da atividade enzimática bem como imunodetecção da urease nas frações de citoplasma, parede celular e membranas celulares. Além disso, a detecção citoquímica dessa enzima também foi investigada para a espécie *Vriesea gigantea*.

II) Quantificação da atividade *in vitro* da urease

1) Extração de proteínas solúveis, de parede celular e membranas

Para a extração de enzimas dos diferentes compartimentos celulares, o material vegetal foi coletado e congelado imediatamente em nitrogênio líquido. Os tecidos foram macerados e homogeneizados com 4 volumes de tampão de extração (fosfato de potássio 100 mM, pH 7.5, contendo 2 mM de DTT, 1% de PVP e 0,1% de albumina), sendo o extrato centrifugado em seguida a 11.000 rpm por 15 minutos a 4°C. A fase solúvel (sobrenadante) foi coletada e conservada em gelo. O precipitado foi lavado com 3 volumes do tampão de extração e centrifugado a 11.000 rpm por 15 minutos a 4ºC, procedimento esse repetido 2 vezes para assegurar a retirada de qualquer resquício de proteínas solúveis. Após a lavagem, foram adicionados ao precipitado 3 volumes do tampão de extração contendo 1 M de NaCl (para a extração das proteínas presentes na parede celular) ou 1% de Triton X-100 (para a extração das proteínas de membrana). O material foi mantido em gelo por 30 minutos, misturando-o a cada 5 minutos com um bastão de vidro e, em seguida, centrifugado novamente. A nova fase solúvel, contendo as proteínas de parede celular ou membranas, foi coletada e mantida em gelo, assim como o extrato referente à fase solúvel celular.

A fração de macromoléculas presente nos diferentes extratos (sobrenadante, membranas e parede celular) foi purificada por meio da utilização de colunas Sephadex G-25 e, em seguida, utilizada para a quantificação da atividade da urease.

2) Quantificação da atividade *in vitro* da urease

A atividade da urease foi analisada por meio da incubação de 500 μL do extrato dessalinizado em 500 μL tampão fosfato 100 mM (pH 7,5) contendo ureia na concentração final de 100 mM. Uma alíquota de 100 μL do ensaio foi retirada de imediato e congelada para a quantificação de NH_4^+ presente no início da reação enzimática. O restante foi incubado em banho-maria a 30°C por 40 minutos, sendo então uma segunda alíquota de 100 μL retirada para a quantificação do NH_4^+ produzido nesse intervalo de tempo. O amônio foi quantificado de acordo com o método descrito por McCullough (1967). Aos 100 μL das amostras, foram adicionados 500 μL do reagente A (solução aquosa constituída de 10 g L^{-1} de fenol e 50 mg L^{-1} de nitroprussiato de sódio) e 500 μL do reagente B (solução aquosa constituída de 5 g L^{-1} de hidróxido de sódio, 20 mL L^{-1} de hipoclorito de sódio a 5% e 150 mM de fosfato de sódio dibásico). As amostras foram então agitadas e incubadas a 37ºC por 35 minutos, sendo em seguida lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 625nm.

III) Dot Western Immunoblotting

1) Extração de proteínas solúveis, de parede celular e membranas

Para a extração de enzimas dos diferentes compartimentos celulares, o material vegetal foi coletado e congelado imediatamente em nitrogênio líquido. Os tecidos foram macerados e homogeneizados com 4 volumes de tampão de extração (fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5, contendo 2 mM de DTT e 1% de PVP), sendo o extrato centrifugado em seguida a 11.000 rpm por 15 minutos a 4°C. A fase solúvel (sobrenadante) foi coletada e conservada em gelo. O precipitado foi lavado com 3 volumes do tampão de extração e centrifugado a 11.000 rpm por 15 minutos a 4ºC, procedimento esse repetido 2 vezes para assegurar a retirada de qualquer resquício de proteínas solúveis. Após a lavagem, foram adicionados ao precipitado 3 volumes do tampão de extração contendo 1 M de NaCl (para a extração das proteínas presentes na parede

celular) ou 1% de Triton X-100 (para a extração das proteínas de membrana). O material foi mantido em gelo por 30 minutos, misturando-o a cada 5 minutos com um bastão de vidro e, em seguida, centrifugado novamente. A nova fase solúvel, contendo as proteínas de parede celular ou membranas, foi coletada e mantida em gelo, assim como feito para o extrato referente à fase solúvel celular.

As proteínas das amostras foram então precipitadas por meio da adição de 5 volumes de metanol 100% gelado e 0,1 M de acetato de amônio, sendo a mistura resultante mantida a 4ºC por 12 horas. O material foi centrifugado a 10.000 rpm a 4ºC por 10 minutos e a fase solúvel foi descartada. O precipitado foi lavado com 5 mL de metanol 100% gelado e centrifugado em seguida, procedimento esse repetido duas vezes. O precipitado foi então ressuspendido em 500 μL de água ultrafiltrada e o extrato protéico foi utilizado no ensaio de immunoblotting.

2) Dot Western Immunoblotting

Um volume de 20 μL de cada amostra (citoplasma, membranas e parede celular), assim como um controle positivo constituído de 1 μg de urease purificada extraída de *Canavalia ensiformis*, foram aplicados a uma membrana de nitrocelulose. Após estar completamente seca, a membrana foi incubada com 100 mM de ferrocianeto de potássio por 1 hora sob agitação suave e em temperatura ambiente, para a inativação das peroxidases presentes nos tecidos foliares (Tonini *et al.*, 2007). Em seguida, incubou-se a membrana com tampão de bloqueio (para evitar ligações inespecíficas dos anticorpos com a membrana) constituído de tampão fosfato salino 100 mM, pH 7.0, adicionado de 1% de albumina, 0.1% de gelatina e 0.1% de Tween 20, onde permaneceu por 3 horas sob agitação em temperatura ambiente. O tampão de bloqueio foi substituído e acrescentado de anticorpo monoclonal anti-urease (produzidos em camundongos a partir de urease purificada de *Canavalia ensiformis*) na proporção de 1:1000, sendo a membrana incubada por 12 horas sob agitação em temperatura ambiente.

A membrana foi lavada abundantemente com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7.4, sendo então incubada por 2 horas em tampão de bloqueio contendo o anticorpo secundário conjugado com peroxidase na proporção 1:1000. Lavou-se abundantemente a membrana com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7.4, adicionando-se em seguida uma solução de diaminobenzidina 0,05%, seguida de peróxido de hidrogênio 0,03%, substrato da peroxidase. Após o aparecimento da

coloração decorrente na atividade da peroxidase, a reação foi interrompida pela lavagem da membrana com água destilada. A membrana foi fotografada e a coloração obtida comparada entre as diferentes frações protéicas.

IV) Quantificação do grau de contaminação citoplasmática nas frações de parede celular e membranas

Com o intuito de estimar o grau de contaminação citoplasmática nas frações de parede celular e membranas, foi quantificada a atividade da enzima marcadora fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPCase, EC: 4.1.1.31) nas diferentes frações celulares das 3 espécies analisadas. A extração e ensaio da PEPCase foram baseados na metodologia descrita por Leport *et al.* (1996), com algumas modificações. Os tecidos foliares foram coletados e congelados imediatamente em nitrogênio líquido. Em seguida, o material foi macerado e homogeneizado com 4 volumes (m/v) de tampão de extração (tampão 200 mM de Tris-HCl pH 8.0 contendo 10 mM de $MgCl_2$, 5 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% glicerol e 0.5% albumina). As amostras foram centrifugadas a 11.000 rpm por 15 minutos a 4ºC, sendo a fase solúvel (sobrenadante) coletada e conservada em gelo. O precipitado foi lavado com 3 volumes do tampão de extração e centrifugado a 11.000 rpm por 15 minutos a 4ºC, procedimento esse repetido 2 vezes para assegurar a retirada de qualquer resquício de proteínas solúveis. Após a lavagem, foram adicionados ao precipitado 3 volumes do tampão de extração contendo 1 M de NaCl (para a extração das proteínas presentes na parede celular) ou 1% de Triton X-100 (para a extração das proteínas de membrana). O material foi mantido em gelo por 30 minutos, misturando-o a cada 5 minutos com um bastão de vidro e, em seguida, centrifugado novamente. A nova fase solúvel, contendo as proteínas de parede celular ou membranas, foi coletada e mantida em gelo, assim como o extrato referente à fase solúvel celular. As amostras foram dessalinizadas aplicando-as em colunas do tipo Sephadex G-25 e o extrato resultante foi utilizado para o ensaio da PEPCase. Alíquotas de 0,4 mL de extrato foram incubadas em um tampão de reação composto de 50 mM de Tris-HCl pH 8.0, 10 mM de $MgCl_2$, 1 mM de DTT, 2 mM de fosfoenolpiruvato, 10 unidades de malato desidrogenase, 0,2 mM de NADH e 10 mM de $NaHCO_3$. A atividade da PEPCase foi calculada de acordo com o consumo de NADH medido em espectrofotômetro no comprimento de onda de 340 nm.

V) Detecção citoquímica da urease

A citolocalização da urease foi baseada na metodologia descrita por Millanes *et al.* (2004). De forma geral, o dióxido de carbono produzido durante a hidrólise da ureia reage com o $CoCl_2$, formando carbonato de cobalto, o qual é insolúvel. Na presença de sulfeto de amônio, forma-se o sulfeto de cobalto, o qual se apresenta como um precipitado eletrodenso quando analisado em microscópio eletrônico de transmissão, permitindo a visualização do local de atuação dessa enzima.

Fragmentos foliares de aproximadamente 1 mm foram inicialmente infiltrados a vácuo com solução fixadora composta de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 2% de formaldeído e 2,5% de glutaraldeído. O material foi fixado durante 24 horas, sendo posteriormente lavado em tampão fosfato e submetido ao ensaio da urease: Esse ensaio enzimático consistiu na incubação dos fragmentos foliares fixados em tampão fosfato de potássio adicionado de 10 mM de $CoCl_2$ e 100 mM de ureia durante 60 minutos a 30º C. Como controle, tecidos foliares foram adicionados somente de $CoCl_2$ e submetidos às mesmas condições de ensaio. Terminada a reação, o material foi lavado abundantemente com água destilada e tratado em seguida com sulfeto de amônio durante 30 segundos, sendo então repetida a lavagem com água destilada. Uma segunda fixação dos fragmentos foliares foi conduzida utilizando-se de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 1% de tetróxido de ósmio durante 90 minutos. Em seguida, lavou-se o material com água destilada, com posterior incubação por 12 horas em solução aquosa contendo 0,5% de acetato de uranila. Após nova lavagem com água destilada, o material foi desidratado em série de acetona e emblocado em resina Spurr durante uma semana a 60ºC. Cortes ultrafinos do material foram então contrastados com acetato de uranila 2% e citrato de chumbo e visualizados em microscópio eletrônico de transmissão.

VI) Número amostral e análise estatística

Os ensaios enzimáticos e de imunodetecção da urease nas diferentes frações celulares foram realizados utilizando-se amostras compostas contendo 15 plantas para cada espécie analisada. O experimento de detecção citoquímica foi realizado com folhas provenientes de 5 plantas. Dados enzimático e de imunodetecção foram comparados por meio da análise de variância (ANOVA) seguido por teste de Tukey HSD post hoc, utilizando-se o programa

estatístico STATGRAPHICS PLUS 5.0 (Statistical Graphics Corp., Rockville, MD, USA). Foram consideradas diferenças significantes quando $P < 0,05$.

Resultados

A quantificação da atividade da urease extraída das diferentes frações celulares de tecidos foliares de *Vriesea gigantea* demonstrou que essa enzima estava presente tanto no citoplasma quanto nas membranas e parede celular (Fig. 22). O mesmo foi observado na espécie controle *Phaseolus vulgaris* e na bromélia terrestre *Ananas comosus*. Em *Vriesea gigantea*, aproximadamente 61% da atividade dessa enzima foi encontrada na fração citoplasmática; atividades consideráveis, 21 e 18%, foram detectadas nas frações de membranas e parede celular, respectivamente (Fig. 22A). Em *Ananas comosus*, em média 83% da atividade da urease foi encontrada na fração solúvel, enquanto 8,5% foi detectada tanto nas frações de membranas quanto na de parede celular (Fig. 22B). Já em *Phaseolus vulgaris*, a espécie controle, a atividade da urease foi em grande parte proveniente do citoplasma: uma faixa de 85 a 92% da atividade total da urease esteve presente na fração citoplasmática, enquanto nas frações de parede celular e membranas essa porcentagem variou de 4,5 a 5,5% e de 3,7 a 9,3%, respectivamente (Fig. 22C).

Ainda referente à atividade enzimática nas diferentes frações celulares, foi verificado um baixo grau de contaminação das frações de parede celular e membranas com proteínas originárias do citoplasma, resultado esse obtido por meio da quantificação da atividade da enzima citossólica marcadora PEPCase. A porcentagem de contaminação variou de 4,1 a 5,1% em *Vriesea gigantea*, de 3 a 5,4% em *Ananas comosus* e de 2,6 a 2,9% em *Phaseolus vulgaris* (Tabela 1).

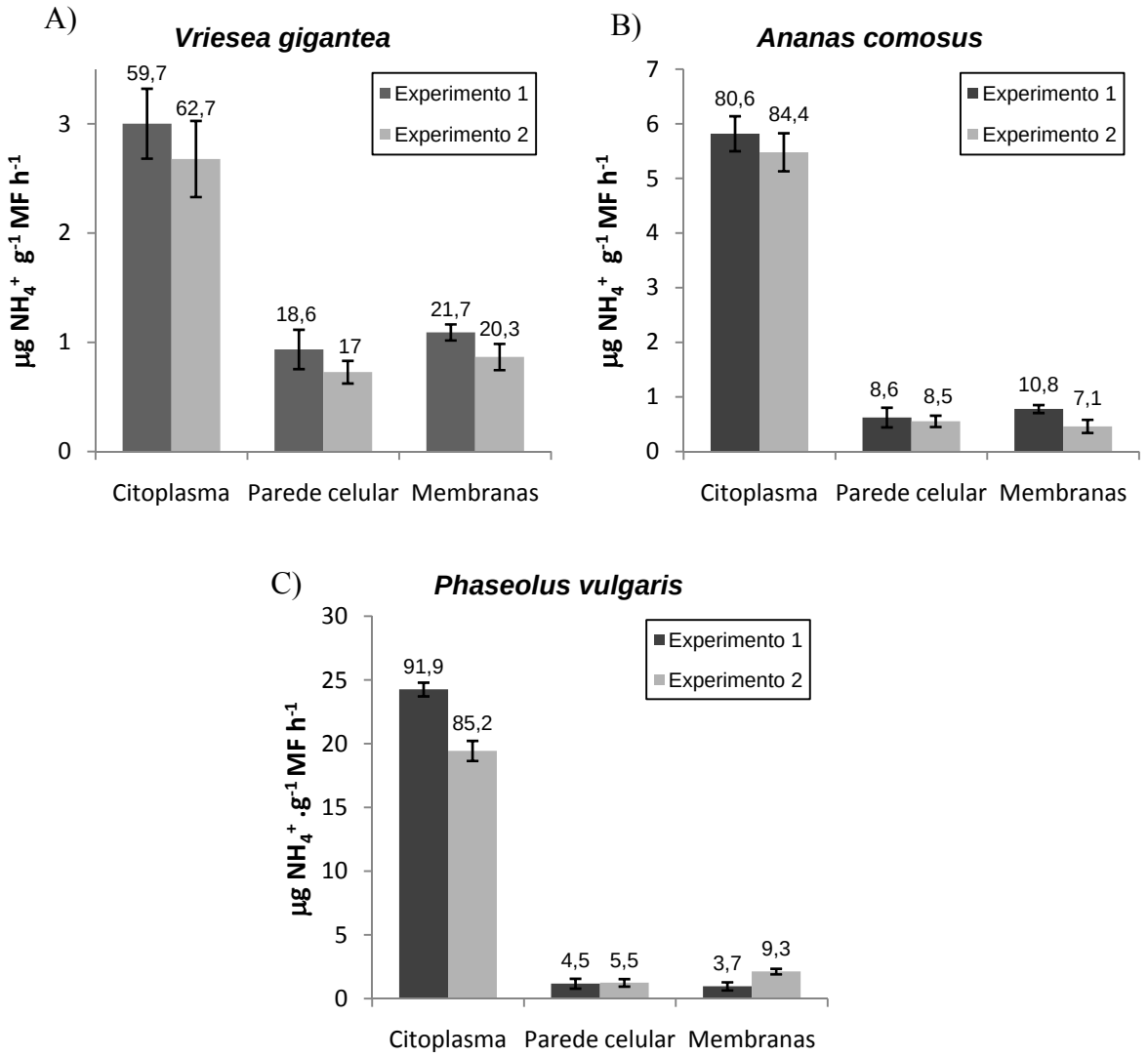


Figura 22: Distribuição da atividade da urease nas frações de citoplasma, parede celular e membranas em tecidos foliares de *Vriesea gigantea* (A), *Ananas comosus* (B) e *Phaseolus vulgaris* (C). As bromélias foram cultivadas *in vitro* por 2 dias na presença de 5 mM de ureia e 10 µM de níquel e então coletadas para o ensaio enzimático. Folhas de *P. vulgaris* foram pulverizadas com as mesmas concentrações de ureia e níquel utilizadas para as bromélias e coletadas após 48 h. Dois experimentos independentes foram realizados. Barras representam a média ± DP de 3 réplicas técnicas obtidas a partir de uma amostra composta de 15 plantas para cada espécie. Os resultados são expressos em µg NH_4^+ produzidos g^{-1} MF h^{-1}. A porcentagem da atividade da urease em cada fração celular em relação à atividade total é apresentada acima das barras.

Tabela 1: Determinação da contaminação citoplasmática nas frações de parede celular e membranas de extraídas de tecidos foliares de *Vriesea gigantea, Ananas comosus* e *Phaseolus vulgaris* utilizando a enzima marcadora de citoplasma PEPC

Atividade da PEPCase é expressa em nmol NADH consumido min $^{-1}$ g^{-1} MF. Valores representam a média ± DP de 3 réplicas técnicas obtidas a partir de uma amostra composta de 15 plantas para cada espécie. A porcentagem de contaminação citossólica nas frações de parede celular e membranas para cada espécie é apresentada entre parênteses.

	Citoplasma	Parede celular	Membranas
Vriesea gigantea	92,4 ± 5,0	3,8 ± 1,0 (4,1%)	4,7 ± 0,7 (5,1%)
Ananas comosus	715,8 ± 35,7	21,4 ± 1,9 (3,0%)	38,3 ± 10,8 (5,4%)
Phaseolus vulgaris	1059,4 ± 27,1	30,2 ± 1,7 (2,9%)	27,9 ± 5,7 (2,6%)

As proteínas extraídas das diferentes frações celulares das 3 espécies estudadas também foram também reagidas com anticorpo anti-urease e, subsequentemente, com um anticorpo secundário conjugado com peroxidase. A presença da urease foi observada em todas as frações celulares analisadas (citoplasma, parede celular e membranas), com uma aparente predominância no citoplasma e membranas (Fig. 23). Embora esse seja uma técnica de caráter qualitativo, demonstrou-se que a urease não é encontrada exclusivamente no citoplasma, confirmando os resultados obtidos por meio de ensaios enzimáticos nas diferentes frações celulares.

Por fim, as proporções consideráveis de urease encontradas na parede celular e membranas nos tecidos foliares de *Vriesea gigantea* foram também confirmadas por meio de detecção citoquímica dessa enzima. Grandes quantidades de corpúsculos eletrodensos foram verificadas tanto associadas à membrana plasmática e/ou parede celular, assim como no citoplasma (Fig. 24 A e B). Nos tecidos controles, não incubados com o substrato da urease, não foram observados quantidades significativas desses depósitos nas células (Fig. 24C).

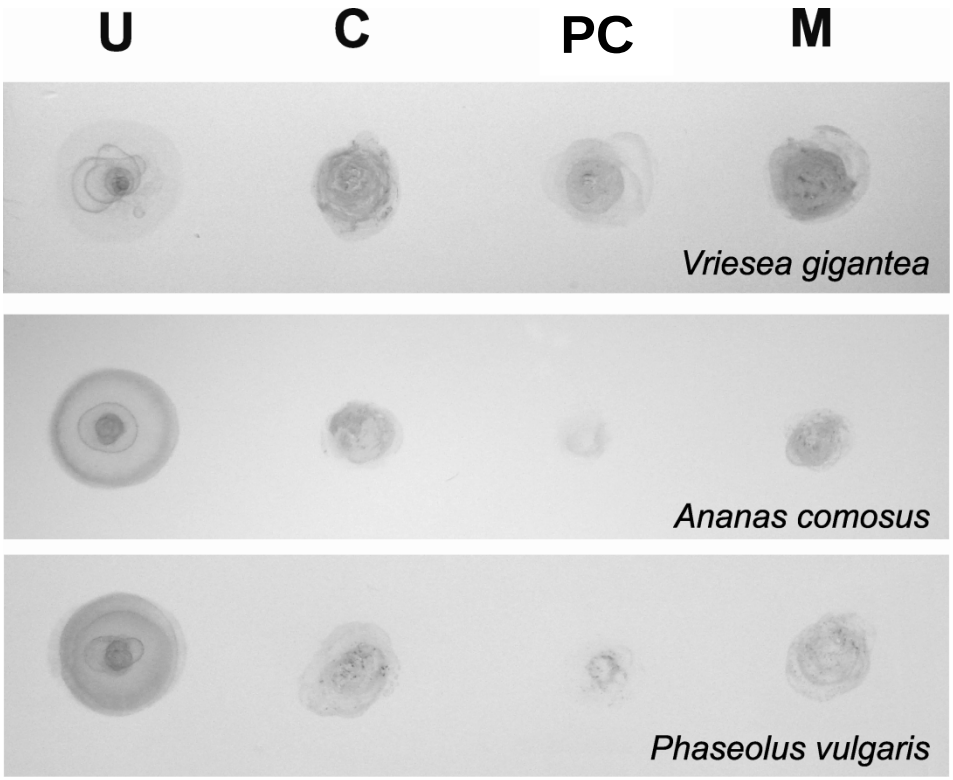


Figura 23: Dot Western immunoblotting das proteínas extraídas das fases solúvel, de parede celular e membranas de tecidos foliares de *Vriesea gigantea*, *Ananas comosus* e *Phaseolus vulgaris*. As bromélias sofreram privação de N por 2 semanas e foram então cultivadas durante 2 dias em meio de cultura contendo 5 mM de ureia e 10 µM de níquel. Folhas de *P. vulgaris* foram pulverizadas com 5 mM de ureia e 10 µM de níquel e coletadas após 48 h. As proteínas extraídas das diferentes frações foram reagidas com anticorpo anti-urease, seguido de reação com anticorpo secundário anti-IgG conjugado com peroxidase. U = controle positivo preparado com 1µg de urease purificada isolada de *Canavalia ensiformis*. S = proteínas solúveis. PC = proteínas de parede celular. M = proteínas de membranas.

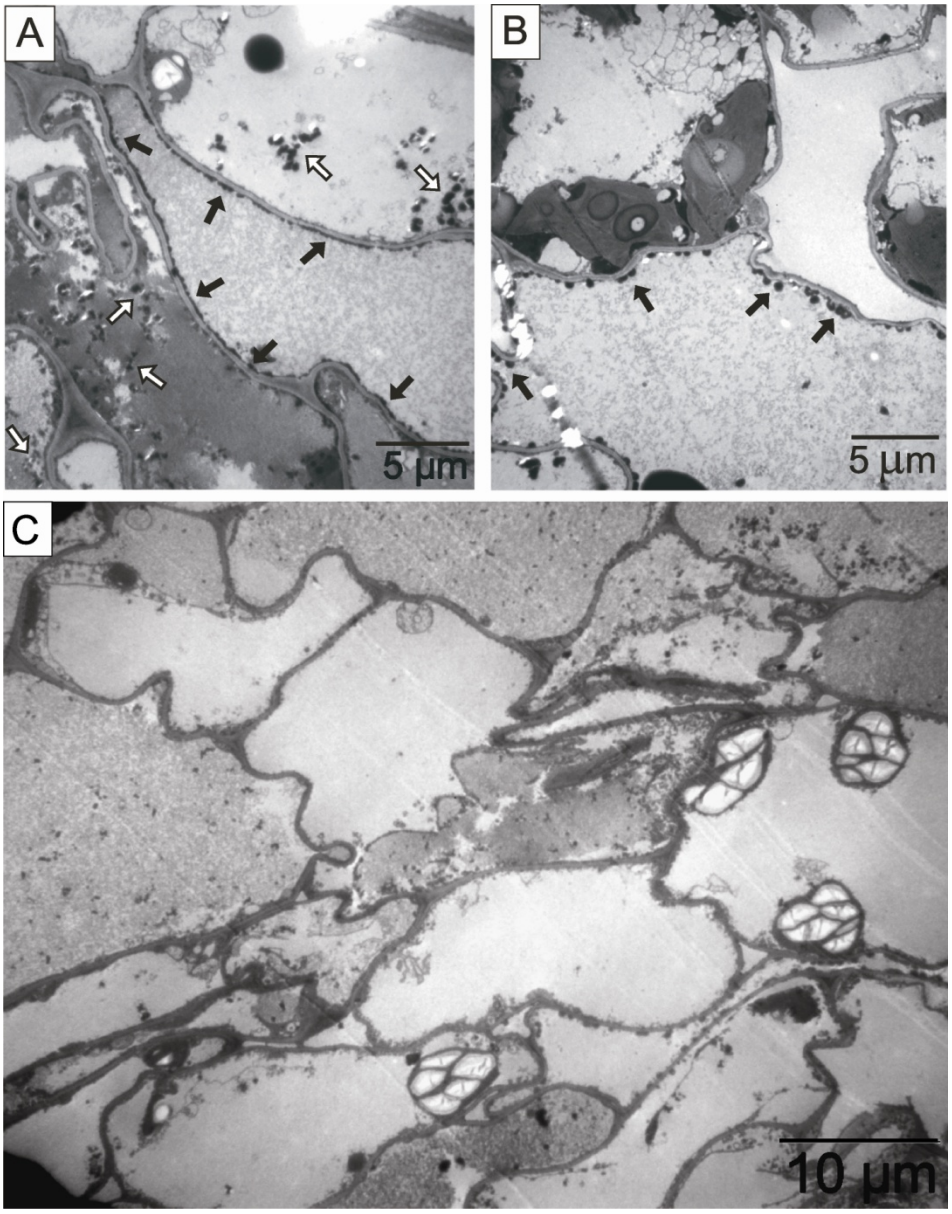


Figura 24: Detecção citoquímica da urease nos tecidos foliares de *Vriesea gigantea* por meio de análise por microscopia eletrônica de transmissão. A) e B) Tecidos foliares de *Vriesea gigantea* foram incubados a 30°C por 40 minutos em tampão fosfato contendo 100 mM de ureia e 10 mM de $CoCl_2$, e então tratados com sulfeto de amônio. Depósitos eletrodensos de CoS podem ser visualizados nas proximidades da membrana plasmática/parede celular (setas), indicando a presença de urease nessa região. Urease solúvel presente no citoplasma é indicada com setas brancas. C) Tecidos foliares controle de *V. gigantea* foram incubados a 30°C durante 40 minutos em tampão fosfato contendo 10 mM de $CoCl_2$ e ausência do substrato da urease, a ureia, sendo em seguida tratados com sulfeto de amônio.

Discussão

Apesar da importância da urease na história da enzimologia e a grande quantidade de publicações a seu respeito, pouco se sabe sobre sua localização celular. Em plantas superiores, por exemplo, a urease é considerada uma enzima citossólica, embora somente uma espécie (*Canavalia ensiformis*) tenha sido estudada a esse respeito até o momento (Murray e Knox, 1977; Faye *et al.*, 1986). Ainda assim, esses trabalhos apresentaram resultados contraditórios.

Recentemente, Inselsbacher *et al.* (2007) demonstraram que *Vriesea gigantea* secreta urease para o meio externo na presença de ureia, o que implica que essa enzima tem, pelo menos temporariamente, localização na membrana plasmática e parede celular. Essa mesma característica de secreção da urease foi verificada para algumas espécies de líquens (Legaz *et al.*, 1986; Pérez-Urria e Vicente, 1989; Pérez-Urria *et al.*, 1989) e sua citolocalização foi recentemente reportada por Millanes *et al.* (2004). Em *Evernia prunastri* e *Xanthoria parietina*, por exemplo, cerca de 80% da atividade total da urease estava associada com a fração de parede celular das células das algas, enquanto 20% dela foi verificada na fração solúvel (Millanes *et al.*, 2004). Esses resultados foram associados com a alta competição por nutrientes entre as algas e os fungos, componentes dessa associação. Contando com apenas 10% do volume do líquen, a chance de que as células das algas utilizem a ureia seria por meio da hidrólise desse composto nitrogenado na sua própria superfície celular, com a subsequente absorção do amônio.

Neste estudo, foi demonstrado que a urease não está restrita à fração solúvel das células vegetais. Em *Vriesea gigantea*, quantidades consideráveis dessa enzima também estão associadas às membranas e parede celular, o que foi demonstrado por meio da análise de atividade enzimática, imunoreação e detecção citoquímica. Outro resultado interessante foi a diferença observada entre as espécies: enquanto em *V. gigantea* aproximadamente 40% da atividade total da urease foi quantificada nas membranas e parede celular, somente 17 e 11% de atividade foram verificadas nas mesmas frações em *A. comosus* e *P. vulgaris*, respectivamente. Esses resultados poderiam ser explicados levando em consideração tanto o hábito de crescimento quanto a importância da ureia como recurso nitrogenado para as espécies estudadas. Diferentemente das espécies terrestres *A. comosus* e *P. vulgaris*, a bromélia epífita com tanque *V. gigantea* demonstra uma grande capacidade de utilizar a ureia, o que pode ser inferido pela maior taxa de crescimento quando são cultivadas *in vitro* na presença dessa fonte nitrogenada, em comparação com as fontes de N inorgânico amônio e nitrato (Endres and Mercier, 2001).

Além disso, é importante levar em consideração que o hábito epífito está geralmente associado com a limitação de nutrientes, principalmente devido à sazonalidade na

disponibilidade de água e nutrientes (Benzing, 2000). Também, a presença de uma extensa comunidade de macro e microbiontes no interior do tanque acarreta em taxas de transformação de nitrogênio bastante rápidas. A ureia, por exemplo, a fonte preferencial de N para *V. gigantea*, é transformada em amônio poucas horas após sua adição e pode ser imobilizada facilmente pelos microorganismos presentes no tanque (Inselsbacher *et al*, 2007). Dessa forma, a absorção de ureia pela bromélia deve ser rápida. Foi demonstrado para *V. gigantea* uma alta eficiência na captação de ureia por proteínas, provavelmente aquaporinas, quando em altas concentrações na água do tanque dessas bromélias (Inselsbacher *et al.*, 2007).

Em conclusão, foram observadas diferenças significativas na atividade da urease associada ao citoplasma, parede celular e membranas entre as espécies epífitas e terrestres. Para a bromélia epífita com tanque, uma maior proporção de urease foi detectada na parede celular e membranas em comparação com as espécies terrestres. A localização da urease, verificada por meio de ensaios enzimático, citoquímico e de imunoreação, sugere que *V. gigantea* possui essa enzima próxima à região de absorção de ureia, aumentando a eficiência da sua assimilação, ou a secretaria para o interior da água do tanque. Essa característica permitiria que as bromélias com tanque, encontradas naturalmente em ambientes com limitação de nitrogênio, utilizassem a ureia de forma rápida e eficiente, de forma a competir com sucesso por esse nutriente com os microorganismos que vivem na água do tanque.

Bibliografia

Bailey C.J., Boulter D., 1971. Urease, a typical seed protein of the Leguminosae. In: Harbone J.B., Boulter D., Turner B.L. (eds) Chemotaxonomy of the Leguminosae Academic Press, New York, pp. 485-502.

Benzing D.H., 2000. Bromeliaceae: profile of an adaptative radiation. Cambridge, Cambridge University Press.

Dixon N.E., Gazzola C., Blakeley R.L., Zerner B., 1975. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel? *Journal of American Chemistry Society* **97**: 4131–4133.

Dunn B.E., Campbell G.P., Perez-Perez G.I., Blaser M.J., 1990. Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. *Journal of Biological Chemistry* **265**: 9464–9469.

Endres L., Mercier H., 2001a. Influence of nitrogen forms on the growth and nitrogen metabolism of bromeliads. *Journal of Plant Nutrition* **24** (1): 29-42.

Evans D.J., Evans D.G. Jr., Kirkpatrick S.S., Graham D.S., 1991. Characterization of the *Helicobacter pylori* urease and purification of its subunits. *Microbial Pathogenesis* **10**: 15–26.

Faye L., Greenwood J.S., Chrispeels M.J., 1986. Urease in Jack bean (*Canavalia ensiformis* (L) DC) seeds is a cytosolic protein. *Planta* **168**: 579-585.

Hogan M.E., Swift I.E., Done J., 1983. Urease assay and ammonia release from leaf tissues. *Phytochemistry* **22**: 663-667.

Inselsbacher E., Cambui C.A., Richter A., Stange C.F., Mercier H., Wanek W., 2007. Microbial activities and foliar uptake of nitrogen in the epiphytic bromeliad *Vriesea gigantea*. *New Phytologist* **175** (2): 311-320.

Knudson L., 1946. A new nutrient solution for germination for orchid seed. *American Orchid Society Bulletin* **15:** 214-217.

Legaz M.E.., Díaz-Santos E., Vicente C., 1986. Lichen substrates and urease production and secretion: a physiological approach using four Antarctic species. *Biochemical Systematics and Ecology* **14**: 375-379.

Leport L., Kandlbinder A., Baur B., Kaiser W.M., 1996. Diurnal modulation of phosphoenolpyruvate carboxylation in pea leaves and roots as related to tissue malate concentrations and to the nitrogen source. *Planta* **198** (4): 495-501.

McCullough H., 1967. Determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clinica Chimica Acta* **17** (2): 297-304.

McLean R.J.C., Cheng K-J., Gould W.D., Costerton J.W., 1985. Cytochemical localization of urease in a rumen *Staphylococcus* sp. by electron microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* **49**: 253–255.

McLean RJC, Cheng K-J, Gould WD, Nickel JC, Costerton JW (1986) Histochemical and biochemical urease localization in the periplasm and outer membrane of two *Proteus mirabilis* strains. *Canadian Journal of Microbiology* **32**: 772–778.

Mercier H., Kerbauy G.B., Sotta B., Miginiac E., 1997. 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* **20** (3): 387-392.

Millanes A.M., Fontaniella B., García M.L., Solas M.T., Vicente C., Legaz M.E., 2004. Cytochemical location of urease in the cell wall of two different lichen phycobionts. *Tissue and Cell* **36:** 373-377.

Mobley H.L.T., Hausinger R.P., 1989. Microbial urease: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiological Reviews* **53**: 85–108.

Mobley H.L.T., Island M.D., Hausinger R.P., 1995. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiological Reviews* **59**: 451-480.

Molina M.C., Muñiz E., Vicente C., 1993. Enzymatic activities of algal-binding protein and its algal cell wall receptor in the lichen *Xanthoria parietina*. An approach to the parasitic basis of mutualism. *Plant Physiology and Biochemistry*. **31:** 131-142.

Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* **15:** 473-497.

Murray D.R, Knox R.B., 1977. Immunofluorescent localization of urease in the cotyledons of jack bean, *Canavalia ensiformis*. *Journal of Cell Science* **26**: 9-18.

Pérez-Urria E., Vicente C., 1989. Purification and some properties of a secreted urease from *Evernia prunastri*. *Journal of Plant Physiology.* **133:** 692–695.

Perez-Urria E., Vicente C., Filho L.X., 1989. Screening of urease production by seven species of Finnish lichens. *Biochemical Systematics and Ecology* **17** (5): 359-363.

Polacco J.C., Holland M.A., 1993. Roles of urease in plant cells. *International Review of Cytology* **145**: 65-103.

Salama A.M.S., Wareing D.A., 1979. Effects of mineral nutrition on endogenous cytokinins in plants of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Experimental Botany* **30:** 971-981.

Shelp B.J., Ireland R., 1985. Ureide metabolism in leaves of nitrogen fixing soybean plants. *Plant Physiology* **77**: 779-783.

Stebbins N., Holland M.A., Cianzio S.R., Polacco J.C., 1991. Genetic tests of the roles of the embryonic urease of soybean. *Plant Physiology* **97**: 1004-1010.

Sumner J.B., 1926. The isolation and crystallization of the enzyme urease. *Journal of Biological Chemistry* **69**: 435-441.

Thompson J.F., 1980. Arginine synthesis, proline synthesis and related processes. In Miflen B. J., ed., The Biochemistry of plants. Vol. 5. Academic Press, New York, pp. 375-402.

Tonini P.P., Lisboa C.G.S, Silva C.O., Mazzoni-Viveiros S.C., Buckeridge M.S., 2007. Testa is involved in the controlo f storage mobilisation in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers, a tropica legume tree from the Atlantic Forest. *Trees Structure and Function* **21** (1): 13-21.

Zonia L.E., Stebbins N.E., Polacco J.C., 1995. Essential role of urease in germination of nitrogen limited *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Physiology* **107**: 1097- 1103.

CAPÍTULO IV

A UREIA COMO FONTE PREFERENCIAL DE NITROGÊNIO PARA A BROMÉLIA *VRIESEA GIGANTEA*: VANTAGEM EVOLUTIVA?

Introdução

Embora estudos sobre a utilização de nitrogênio orgânico por plantas tenham se iniciado há mais de um século, somente nos últimos 10 a 15 anos esse assunto tem atraído considerável destaque. Por meio de inúmeros trabalhos laboratoriais e no campo, hoje já se conhece a capacidade das plantas em absorver e utilizar nitrogênio orgânico, nas suas mais variadas formas, desde aquelas mais simples, como aminoácidos e ureia (Chapin *et al.*, 1993; Kielland, 1994; Raab *et al.*, 1996, 1999; Mercier *et al.*, 1997; Näsholm *et al.*, 1998; Majerowicz *et al*., 2000; Endres e Mercier, 2001a; Nordin *et al.*, 2004, dentre muitos outros), até recursos mais complexos como proteínas (Paungfoo-Lonhienne *et al*., 2008). Contudo, o quão significativo seria a utilização de fontes nitrogenadas orgânicas em ambientes naturais é ainda um ponto de discussão.

Apesar da maioria das espécies vegetais demonstrar preferência pela utilização de fontes inorgânicas de nitrogênio (como o amônio e o nitrato), em várias espécies uma grande capacidade de uso de fontes orgânicas tem sido relatada. Altas taxas de absorção desses recursos, muitas vezes até superiores àquelas verificadas para fontes inorgânicas (Chapin *et al.*, 1993; Kielland *et al.*, 2006), bem como o crescimento diferencial de algumas espécies na presença de tais compostos (Chapin *et al.*, 1993; Mercier *et al.*, 1997; Majerowicz *et al*., 2000; Endres e Mercier, 2001a), são exemplos disso.

Na maioria dos casos, a preferência por fontes de nitrogênio orgânico tem sido associada à grande disponibilidade desses recursos no habitat natural de tais plantas. É o caso de muitas espécies nativas dos ecossistemas ártico (Kielland, 1994; Schimel e Chapin, 1996; Kielland, 1997; Henry e Jefferies, 2002; Nordin *et al.*, 2004), boreal (Näsholm *et al.*, 1998; Nordin *et al.*, 2001; Persson e Näsholm, 2001a; McFarland *et al.*, 2002; Bennett & Prescott, 2004), temperado (Falkengren-Grerup *et al.*, 2000; Finzi e Berthrong, 2005; Rains e Bledsoe, 2007), mediterrâneo (Hawkins *et al.*, 2005) e alpino (Raab *et al.*, 1996, 1999; Lipson *et al.*, 1999a; Miller e Bowman, 2002). Nesses ambientes, a maior disponibilidade de aminoácidos e a significativa limitação de nitrogênio inorgânico ocorrem principalmente devido às baixas temperaturas e/ou ao pH, que tornam o processo de mineralização menos expressivo (Chapin *et al.*, 1993; Näsholm *et al*., 1998; Raab *et al.*, 1999), ou, no caso de ambientes áridos, devido à escassez de chuvas, baixa produtividade primária e baixas taxas de decomposição de matéria orgânica (Smith *et al.*, 1997).

Para outras espécies, entretanto, essa parece não ser uma explicação válida. Bromélias epífitas com tanque, habitantes do dossels de florestas tropicais e subtropicais do Novo Mundo, têm seu crescimento favorecido por ureia (Mercier *et al*., 1997; Endres e Mercier, 2001a), que

em ambiente natural é fornecida pelos anfíbios que vivem ou visitam o reservatório de água formado pelo imbricamento das folhas dessas plantas. Apesar dessa preferência, a ureia é um recurso nitrogenado não encontrado com frequência no tanque. A análise da água das cisternas de bromélias da espécie *Vriesea gigantea* mostrou que, dentre as formas de nitrogênio dissolvidas normalmente, a maior parte era representada por proteínas (aproximadamente 66%), seguido de amônio (~20%) e nitrato (~7%). Aminoácidos e ureia totalizaram, cada uma, somente 3,6% do nitrogênio total acumulado na água do tanque (Inselsbacher *et al.*, 2007). A presença de quantidades mais abundantes de ureia ficaria restrita a situações ocasionais (após a excreção de anfíbios que por ali vivem ou visitam) e durante períodos de curta duração, uma vez que a ureia é rapidamente convertida a amônio ou imobilizada pelos microorganismos presentes na água do tanque (Inselsbacher *et al.*, 2007).

Essa preferência por esse nutriente orgânico também não pode ser associada à presença de sistemas de captação de ureia mais eficientes em relação aos das demais fontes nitrogenadas. Recentemente foi demonstrado, por meio do estudo da cinética de absorção foliar de diversas fontes de nitrogênio, incluindo formas inorgânicas e orgânicas, que os transportadores de amônio foram os que tiveram, de longe, a maior eficiência catalítica de absorção (Inselsbacher *et al.*, 2007). Apesar disso, não se deve desconsiderar o padrão incomum de captação de ureia observado em *Vriesea gigantea*: enquanto para todas as demais fontes nitrogenadas a absorção seguiu a cinética de Michaelis–Menten, para a ureia essa relação de captação foi linear, mesmo após o emprego de altas concentrações de nitrogênio (Inselsbacher *et al.*, 2007). Assim, a absorção de ureia pela bromélia *Vriesea gigantea* se tornaria cada vez mais expressiva em relação às demais fontes de nitrogênio com o aumento da concentração de ureia presente na água do tanque, de forma que, mesmo que essa seja uma situação esporádica, quando ela acontece a absorção de ureia se daria de maneira bastante rápida e eficiente.

Por fim, em ambiente natural, fontes orgânicas de nitrogênio como os aminoácidos e a ureia, mesmo quando presentes na água do tanque, são alvos de uma intensa competição interespecífica entre a planta e os microorganismos que ali habitam (Inselsbacher *et al.*, 2007). A preferência e consequente competição de microorganismos por nitrogênio orgânico já são bastante conhecidas e não estão restritas à água do tanque. Ocorrem em praticamente todos os ambientes, incluindo os aquáticos (Remsen *et al.*, 1974) e os terrestres (Bardgett *et al.*, 2003; Nordin *et al.*, 2004; Sorensen *et al.*, 2008), e estão relacionadas à condição de limitação tanto de nitrogênio quanto de carbono a que esses microorganismos estão expostos. Ao utilizar fontes orgânicas de nitrogênio, ambos os elementos são supridos de uma só vez, favorecendo assim o desenvolvimento desses seres vivos.

Levando em consideração todas essas particularidades relacionadas à obtenção e absorção de ureia pela bromélia epífita com tanque *Vriesea gigantea*, é surpreendente que essa seja a fonte de nitrogênio preferencial para o desenvolvimento dessa espécie. Por que se especializar na utilização de uma fonte de nitrogênio que só está disponível de forma ocasional, em detrimento de recursos presentes na água do tanque em maiores concentrações e de forma mais estável ao longo do tempo, como por exemplo o amônio? Por que ter preferência por uma fonte de nitrogênio que é também absorvida avidamente por diversos microorganismos presentes no tanque e que é rapidamente mineralizada e/ou imobilizada por eles? Estaria essa preferência associada, assim como para os microorganismos, à utilização de um recurso que disponibilizaria não somente o nitrogênio, mas também o carbono?

Objetivos

Com o objetivo de compreender o que levaria *Vriesea gigantea* a utilizar a ureia como fonte de nitrogênio preferencial para o seu crescimento, apesar de todas as particularidades associadas à sua obtenção, esse capítulo foi proposto. Foram verificadas a absorção preferencial de ureia, mesmo na presença simultânea de fontes nitrogenadas inorgânicas, bem como a possibilidade de *Vriesea gigantea* incorporar não somente o nitrogênio presente na molécula de ureia, mas também o seu carbono. Para a análise da absorção preferencial da ureia, foram quantificados o consumo de ureia e amônio do meio de cultura de plantas cultivadas na presença simultânea dessas fontes orgânica e inorgânica. Para verificar a possibilidade da incorporação do carbono proveniente da molécula de ureia por *Vriesea gigantea*, foram empregadas técnicas de citoquímica para localização do CO_2 liberado após a hidrólise da ureia pela urease, bem como o uso de ureia duplamente marcada (^{13}C e ^{15}N) e posterior determinação desses isótopos estáveis nos tecidos foliares dessas plantas.

Material e Métodos

I – Obtenção do material vegetal e delineamento experimental

1) Material vegetal

As plantas de *Vriesea gigantea* foram obtidas por meio da germinação *in vitro* das suas sementes. Para isso, essas foram desinfestadas em etanol 92% durante 5 minutos, seguido de imersão em uma solução de hipoclorito de sódio 2,5%, durante 2h, sob agitação constante. Após este procedimento, em câmara de fluxo de ar laminar, as sementes foram enxaguadas em água ultra-pura e estéril até que todo o hipoclorito fosse eliminado e, então, transferidas para o meio básico de crescimento composto pelos macronutrientes da solução Knudson (1946) e os micronutrientes do MS (Murashige & Skoog, 1962), adicionado de carbonato de cálcio, na concentração de 0.5 $g.L^{-1}$, como agente tamponante do meio de cultura (Salama & Wareing, 1979).

O material vegetal foi mantido em sala climatizada com temperatura média de 25ºC ± 2ºC, fotoperíodo de 15h e intensidade luminosa de 50 μmol fótons m^{-2} s^{-1}, fornecida por lâmpadas fluorescentes.

2) Delineamento experimental

Inicialmente, a preferência nitrogenada de *Vriesea gigantea* foi verificada por meio da absorção de diferentes fontes de nitrogênio presentes simultaneamente no meio de cultura. Para isso, plantas de 2 anos de idade foram inicialmente cultivadas em meio de cultura sem as fontes de N originais, onde permaneceram por 2 semanas com o objetivo de se esgotar, pelo menos em parte as reservas nitrogenadas vegetais. Esse meio de cultura foi adicionado de $CaSO_4$ (0,64 g L^{-1}), repondo os íons Ca^{2+} e SO_4^{2-} retirados juntamente com os sais nitrogenados, além de níquel na concentração de 10 μM, metal essencial para a atividade da urease, e $CaCO_3$ (0,5 g L^{-1}), como agente tamponante do meio de cultura. Após esse período de privação, as plantas foram transferidas individualmente para tubos de ensaio (de 2 cm diâmetro e 20 cm de altura, devidamente esterilizados e fechados com tampa de inox) contendo 3 mL de meio de cultura líquido (meio básico de cultivo, exceto pelos sais nitrogenados, contendo 10 μM de níquel e 0,5

g L-1 de $CaCO_3$) adicionado de 10 mM de N total, disponibilizado como fonte inorgânica exclusiva (amônio + nitrato) ou simultaneamente com a fonte orgânica ureia (5 mM de amônio + nitrato e 2,5 mM de ureia). Análises temporais foram realizadas após 0, 1, 3, 7, 15 e 30 dias de cultivo (ou até a completa exaustão das fontes nitrogenadas dos meios de cultura) para a quantificação do consumo de ureia e amônio dos meios de cultura.

Com a posse desses resultados, dois experimentos distintos foram conduzidos para tentar elucidar se a preferência de *Vriesea gigantea* por ureia seria decorrente da assimilação não somente do N gerado pela sua hidrólise (2 NH_3^+), mas também do carbono presente na sua molécula (CO_2). A primeira estratégia experimental utilizada teve como objetivo detectar e citolocalizar o CO_2 gerado pela atuação da urease; a segunda estratégia teve o intuito de verificar a possibilidade de o CO_2 proveniente da hidrólise da ureia ser incorporado, assim como o NH_4^+, pelas células vegetais.

Em ambos os experimentos, plantas de *Vriesea gigantea* com 2 anos de idade foram inicialmente cultivadas em meio de cultura básico sem as fontes de N originais, onde permaneceram por 2 semanas com o objetivo de se esgotar, pelo menos, parte das reservas nitrogenadas vegetais. Esse meio de cultura foi adicionado de $CaSO_4$ (0,64 g L^{-1}), repondo os íons Ca^{2+} e SO_4^{2-} retirados juntamente com os sais nitrogenados, além de níquel na concentração de 10 μM, metal essencial para a atividade da urease e $CaCO_3$ (0,5 g L^{-1}), como agente tamponante do meio de cultura.

Após esse período, duas condições experimentais distintas foram conduzidas. Para o primeiro experimento, as plantas foram transferidas para um meio de cultura experimental contendo 5 mM de ureia, onde permaneceram por 2 dias, seguido de coleta e utilização do material vegetal fresco para a detecção citoquímica do CO_2 gerado via atuação da urease. Para o segundo experimento, as plantas foram transferidas para um meio de cultura experimental contendo 5 mM de ureia duplamente marcada (^{13}C e ^{15}N, com 98% de enriquecimento), onde foram mantidas por períodos de 0, 1, 2, 15 ou 30 dias. As plantas foram coletadas, lavadas com água destilada, e os tecidos foliares separados e congelados imediatamente em N_2 líquido, sendo destinadas então para determinação isotópica de ^{13}C e ^{15}N.

II) Quantificação do consumo de ureia e amônio do meio de cultura

Alíquotas dos meios de cultura foram utilizadas para a determinação do conteúdo de amônio e ureia presentes. Esse volume foi variável e dependente da concentração desses compostos no dia da análise. O amônio foi quantificado de acordo com o método descrito por

Weatherburn (1967). Às amostras foram adicionados 500 μL do reagente A (solução aquosa constituída de 10 g L^{-1} de fenol e 50 mg L^{-1} de nitroprussiato de sódio) e 500 μL do reagente B (solução aquosa constituída de 5 g L^{-1} de hidróxido de sódio e 8,4 mL L^{-1} de hipoclorito de sódio a 5%). As amostras foram então agitadas e incubadas em temperatura ambiente por 30 minutos, sendo em seguida lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 625nm. A quantificação da ureia presente nos meios de cultura foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Gerendás e Sattelmacher (1997), em que a ureia é quantificada indiretamente por meio da determinação do amônio liberado após sua hidrólise pela urease. As amostras foram incubadas a 40ºC durante 40 minutos em 900 μL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 2,5 unidades de urease purificada. Em seguida, alíquotas de 100 μL dessa reação de hidrólise foram utilizadas para a determinação do amônio produzido nesse intervalo de tempo, segundo o procedimento descrito para a quantificação do amônio.

III) Detecção citoquímica do CO_2 gerado pela urease

A detecção citoquímica do CO_2 liberado após hidrólise da ureia pela urease foi baseada na metodologia descrita por Millanes *et al.* (2004). De uma forma geral, o dióxido de carbono produzido durante a hidrólise da ureia reage com o $CoCl_2$, formando carbonato de cobalto, o qual é insolúvel. Na presença de sulfeto de amônio, forma-se o sulfeto de cobalto, o qual se apresenta como um precipitado eletro-denso quando analisado em microscópio eletrônico de transmissão, permitindo a visualização do local de atuação dessa enzima. De forma a permitir que o CO_2 livre gerado pela urease tivesse livre movimentação no interior das células, possibilitando, consequentemente, a verificação do seu destino, a fixação dos tecidos foi realizada após o ensaio enzimático (técnica diferenciada em relação ao capítulo IV, em que o objetivo foi verificar a localização da urease e não de um dos seus produtos, o CO_2).

Os tecidos foliares recém-coletados de *Vriesea gigantea* foram cortados em fragmentos de aproximadamente 1 mm e incubados em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), contendo 100 mM de ureia e 10 mM de $CoCl_2$. Como controle, fez-se a incubação de tecidos foliares em tampão contendo somente $CoCl_2$. O material foi submetido à infiltração à vácuo (3 vezes de 1 minuto cada) e incubado durante 60 minutos a 30ºC. Após o ensaio enzimático, os fragmentos foliares foram lavados abundantemente com água destilada e tratados com $(NH_4)_2S$ durante 30 segundos, sendo lavados posteriormente com água destilada. O material foi então infiltrado a

vácuo com solução fixadora composta de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 2% de formaldeído e 2,5% de glutaraldeído. O material foi fixado durante 24 horas, sendo posteriormente lavado abundantemente com tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e submetido a uma segunda fixação com OsO_4 1% em tampão fosfato 100 mM (pH 7,5) durante 90 minutos. Em seguida, lavou-se o material com água destilada, com posterior incubação por 12 horas em solução aquosa contendo 0,5% de acetato de uranila. Após nova lavagem com água destilada, o material foi desidratado em série de acetona e emblocado em resina Spurr durante uma semana a 60ºC. Cortes ultrafinos do material foram então contrastados com acetato de uranila 2% e citrato de chumbo e visualizados em microscópio eletrônico de transmissão (IBUSP).

IV) Determinação isotópica de ^{13}C e ^{15}N nos tecidos foliares

As amostras dos tecidos foliares de *Vriesea gigantea* foram maceradas em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino, sendo esse transferido para microtubos e seco em liofilizador. As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Isótopos Estáveis do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP), em Piracicaba-SP, para a determinação isotópica de ^{13}C e ^{15}N nos tecidos. Sub-amostras de aproximadamente 1,5 mg de matéria seca foram pesadas em cápsulas de estanho e analisadas no espectrômetro de massas ANCA GSL 20/20 da Sercon, juntamente com padrões enriquecidos.

V) Cálculos empregados para a determinação da incorporação dos isótopos de ^{13}C e ^{15}N nos tecidos foliares de *Vriesea gigantea*

A incorporação de ^{13}C e ^{15}N em cada 100 mg de massa seca de *Vriesea gigantea* foi calculada de acordo com as seguintes equações:

$$\text{mmol } ^{13}C = (\%\text{ at } ^{13}C_{Texp} - \%\text{ at } ^{13}C_{Tzero}) \text{ x } \frac{\%\text{ Ctotal}}{100} \text{ x } \frac{1}{A}$$

Onde:

% at ^{13}C = porcentagem atômica $^{13}C/^{12}C$; % C total = porcentagem total de carbono (em massa); A = número de massa do ^{13}C (=13).

$$\text{mmol } ^{15}\text{N} = (\%\text{ at } ^{15}\text{N}_{\text{Texp}} - \%\text{ at } ^{15}\text{N}_{\text{Tzero}}) \text{ x } \frac{\%\text{ Ntotal}}{100} \text{ x } \frac{1}{\text{A}}$$

Onde:

% at ^{15}N = porcentagem atômica ^{15}N/^{14}N; % N total = porcentagem total de nitrogênio (em massa); A = número de massa do ^{15}N (=15).

Por fim, para averiguar se ambos ^{13}C e ^{15}N provenientes da ureia estão sendo assimilados na mesma proporção (na razão 1:2, lembrando-se que existem 2 átomos de N para cada átomo de C na molécula de ureia), aplicou-se a equação:

$$\text{C/N} = \frac{nmol\ 13C}{nmol\ 15N}$$

Se C/N = 0,5, 100% do carbono presente na molécula de ureia é assimilado pelas células vegetais; para razões menores que 0,5, a perda proporcional de $^{13}CO_2$ para o ambiente foi calculada.

VI) Número amostral e análise estatística

O experimento proposto para analisar a absorção preferencial de fontes nitrogenadas por *Vriesea gigantea* constou de 8 réplicas biológicas para cada tratamento e cada tempo de coleta. Já as análises de citolocalização do CO_2 gerado pela urease foram realizadas com folhas provenientes de 5 plantas. Para a determinação isotópica de ^{13}C e ^{15}N nos tecidos foliares dessas bromélias, utilizaram-se 4 réplicas biológicas para cada tempo de coleta. Os resultados obtidos foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) seguido por teste de Tukey HSD post hoc, utilizando-se o programa estatístico STATGRAPHICS PLUS 5.0 (Statistical Graphics Corp., Rockville, MD, USA). Foram consideradas diferenças significativas quando $p < 0,05$.

Resultados

1) Fonte de nitrogênio preferencial para absorção

Independentemente da fonte fornecida às plantas no meio de cultura, a absorção do nitrogênio foi bastante rápida. Uma grande proporção desse nutriente foi absorvida do meio já nas primeiras 24 horas de cultivo. Além disso, houve uma diferença muito grande na utilização do amônio por *Vriesea gigantea* quando comparada à disponibilidade de ureia no meio de cultura. Na presença exclusiva de fontes nitrogenadas inorgânicas (NH_4^+ e NO_3^-), cerca de 85% do amônio fornecido foi absorvido num período inferior a 24 horas. Os 15% restantes foram utilizados de forma mais gradual em até 7 dias (Fig. 25A). Já na presença de ureia, praticamente não houve consumo de amônio nas primeiras 24 horas de cultivo, embora ele tenha sido esgotado do meio de cultura no intervalo entre 1 e 3 dias (Fig. 25B). Quando verificados os resultados de absorção de ureia nesse meio, observou-se que nessas primeiras 24 horas de cultivo as plantas absorveram o equivalente a 40% da ureia presente (Fig. 26). Contudo, o consumo de ureia não foi linear ao longo do tempo. Praticamente não houve consumo no intervalo entre 1 e 3 dias de cultivo; já entre 3 e 7 dias e entre 7 e 15 dias a ureia voltou a ser consumida, embora em menor taxa se comparada àquela observada nas primeiras 24 horas de análise (Fig. 26).

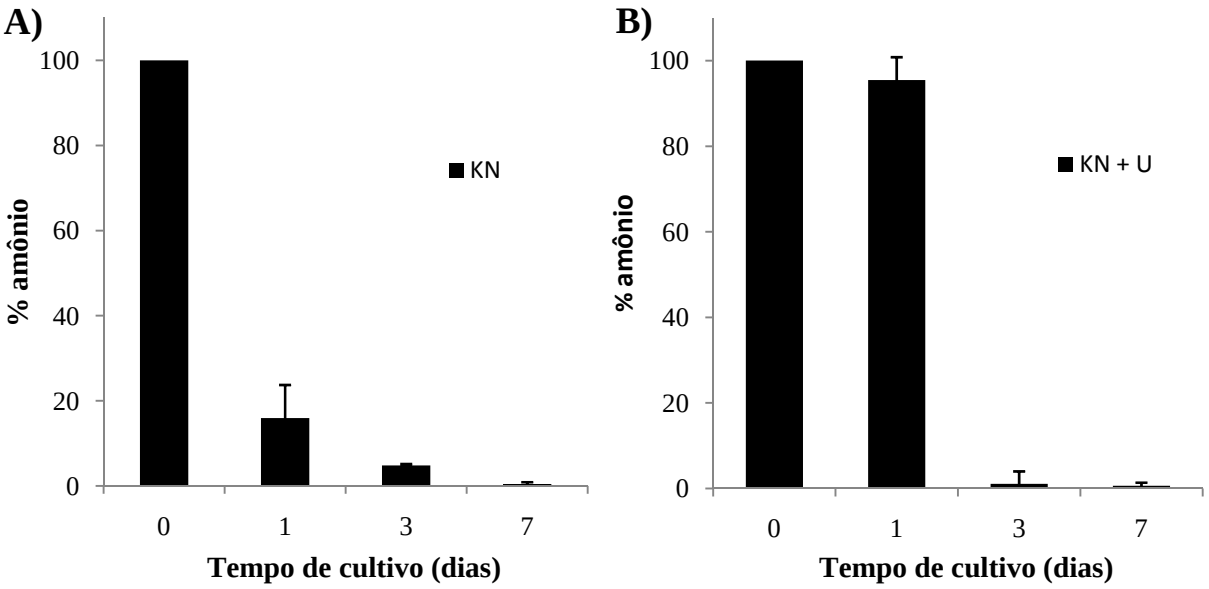


Figura 25: Consumo de amônio por *Vriesea gigantea*. As plantas foram inicialmente privadas de N por 2 semanas e em seguida transferidas para meio líquido contendo 10 mM de N. A) Plantas cultivadas exclusivamente na presença de fontes inorgânicas (NH_4^+ e NO_3^-). B) Plantas cultivadas na presença simultânea de ureia e fontes inorgânicas de nitrogênio. O conteúdo de

amônio presente no meio de cultura foi quantificado temporalmente para determinar o seu consumo pelas plantas. Barras representam porcentagem média de ureia ± DP em relação à quantidade inicial (n=8).

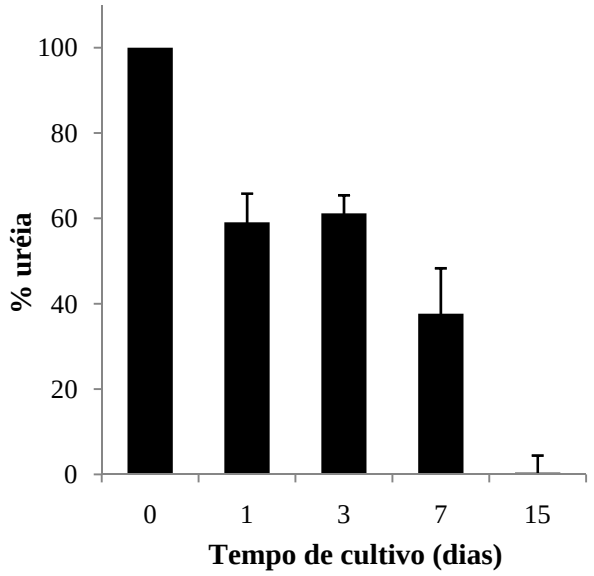


Figura 26: Consumo de ureia por plantas de *Vriesea gigantea* cultivadas na presença simultânea de ureia e fontes inorgânicas de nitrogênio (NH_4^+ e NO_3^-). As plantas foram inicialmente privadas de N por 2 semanas e em seguida transferidas para meio líquido contendo 10 mM de N. O conteúdo de ureia presente no meio de cultura foi quantificado temporalmente para determinar o seu consumo pelas plantas. Barras representam porcentagem média de ureia ± DP em relação à quantidade inicial (n=8).

2) Detecção citoquímica do CO_2 gerado pela urease

Quantidades consideráveis de material eletrodenso foram observadas de forma concentrada ao redor dos cloroplastos e, principalmente, entre esses e a membrana/parede celular. Também foi verificada, embora de forma não frequente, a presença desses precipitados associada somente à membrana e parede (Fig. 27B). Nos tecidos controle, não incubados com o substrato da urease, não foram observados quantidades significativas desses depósitos nas células (Fig. 27A).

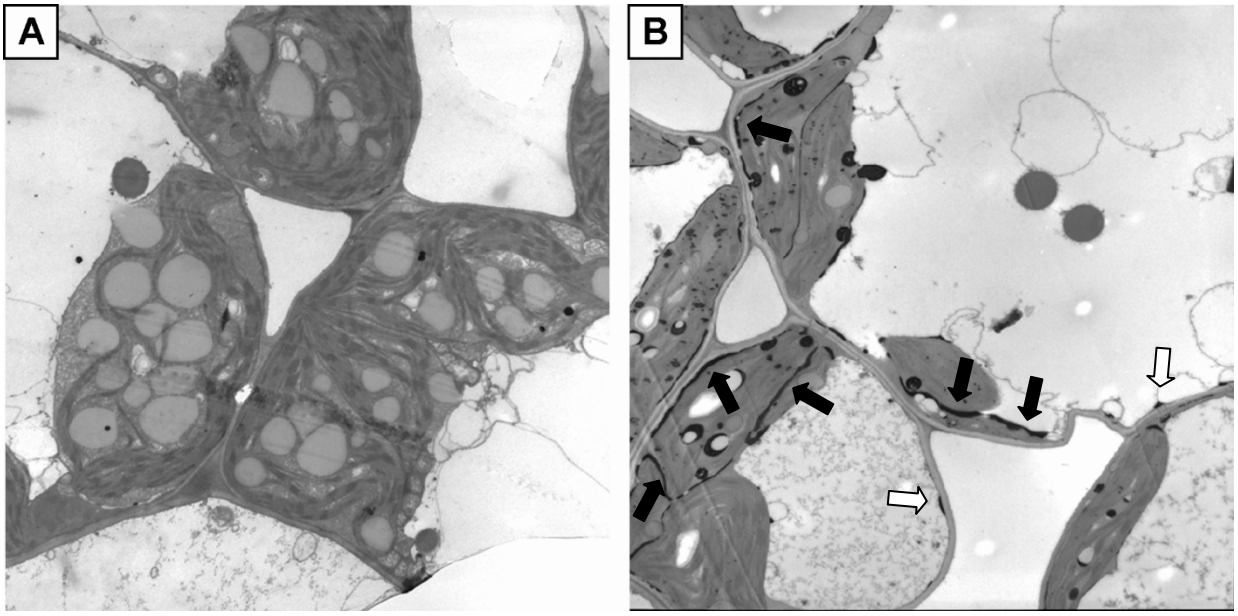


Figura 27: Detecção citoquímica do CO_2 liberado após hidrólise da ureia pela urease nos tecidos foliares de *Vriesea gigantea*. A) Tecidos foliares controle de *V. gigantea* foram incubados a 30°C durante 40 minutos em tampão fosfato de potássio (pH 7,5) contendo 10 mM de $CoCl_2$ na ausência do substrato da urease (a ureia), sendo, em seguida, tratados com sulfeto de amônio. B) Tecidos foliares de *Vriesea gigantea* foram incubados a 30°C por 40 minutos em tampão fosfato contendo 100 mM de ureia e 10 mM de $CoCl_2$, e então tratados com sulfeto de amônio. Depósitos eletrodensos de CoS podem ser visualizados ao redor dos cloroplastos (setas pretas), indicando que o CO_2 formado após hidrólise da ureia é direcionado para essa organela, evidenciando sua possível assimilação pela planta. Presença de alguns precipitados associados somente à membrana e/ou parede também podem ser observados em B (setas brancas).

3) Assimilação de ^{13}C e ^{15}N proveniente da ureia pelos tecidos foliares de *Vriesea gigantea*

Foram detectados incrementos de ambos os isótopos naturais provenientes da ureia (^{13}C e ^{15}N) nos tecidos foliares de *Vriesea gigantea* ao longo do tempo. Cinéticas de absorção e/ou incorporação bastante semelhantes foram observadas para ^{13}C e ^{15}N: um acúmulo pronunciado e praticamente linear nos primeiros 2 dias de cultivo, seguido de incrementos menores nos períodos posteriores (Figs. 28 A e B). As absorções máximas de ^{15}N e de ^{13}C obtidas após 30 dias de cultivo foram de aproximadamente 11,9 μmols (ou 178,6 μg) e 3,8 μmols (ou 49,8 μg) para cada 100 mg de tecidos foliares secos, respectivamente. Ao se analisar a razão $^{13}C/^{15}N$, uma maneira indicativa de se verificar a absorção e/ou incorporação simultânea do carbono em relação ao nitrogênio (independentemente de estar na mesma molécula ou na forma de $^{13}CO_2$,

após hidrólise da ureia), foi verificado um decréscimo progressivo de ^{13}C em relação ao ^{15}N até o 15º dia de cultivo, a partir do qual houve uma estabilização (Fig. 28 C). Esses resultados, expressos na forma de porcentagem de carbono agregado aos tecidos, mostraram que, apesar das perdas iniciais de ^{13}C (que diminui de ~ 94% nas primeiras 24 horas de cultivo para 85% após 48 horas e subsequentemente a 63% no 15º dia), aproximadamente 64% de todo o carbono proveniente da ureia utilizada por *Vriesea gigantea* foi definitivamente incorporado pelas plantas após a estabilização do sistema (período compreendido entre 15 e 30 dias de cultivo).

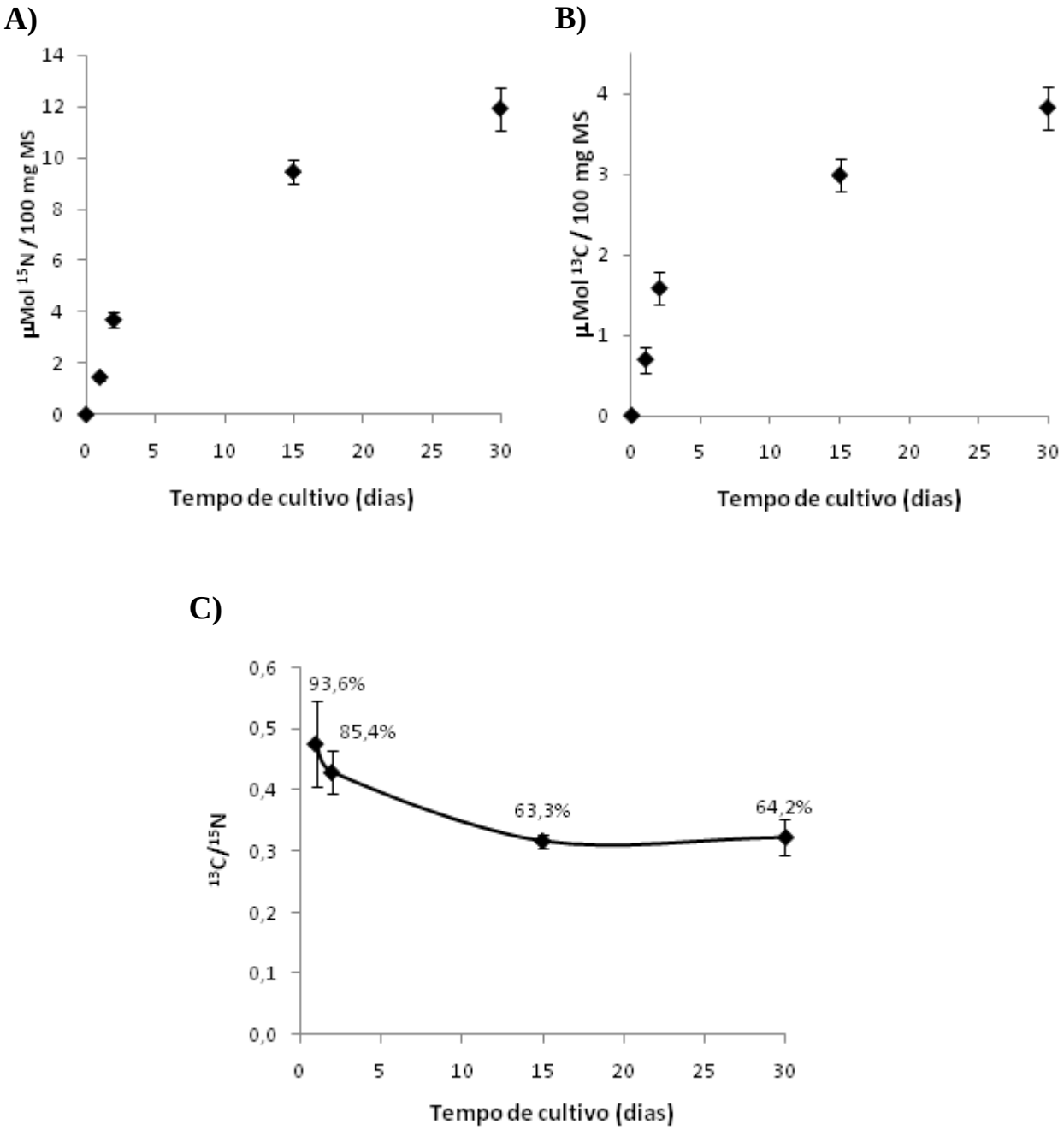


Figura 28: Determinação isotópica de ^{15}N e ^{13}C nos tecidos foliares de *Vriesea gigantea* cultivadas *in vitro* na presença de 5 mM de ureia duplamente marcada (2 ^{15}N, ^{13}C) após 1, 2, 15 e 30 dias de cultivo. A) conteúdo endógeno de ^{15}N, expresso em µmol/100 mg de matéria seca; B) conteúdo endógeno de ^{13}C, expresso em µmol/100 mg de matéria seca. C) Razão $^{13}C/^{15}N$ incorporado pelos tecidos foliares. Pontos representam a média ± DP (n=4). Os valores apresentados sobre as barras correspondem à porcentagem de ^{13}C proveniente da ureia incorporado em função do ^{15}N.

Discussão

São inúmeros os trabalhos que relatam a capacidade de uma variedade de espécies vegetais em utilizar fontes orgânicas de nitrogênio. Contudo, a preferência por tais recursos nitrogenados em detrimentos de fontes inorgânicas parece ser bem restrita. Um dos exemplos dessa preferência é a espécie *Vriesea gigantea*, uma bromélia epífita formadora de tanque que tem seu crescimento favorecido na presença de ureia (Endres e Mercier, 2001a). Estudos de cinética de absorção de diferentes fontes nitrogenadas, inorgânicas e orgânicas, também já foram realizados para essa bromélia e, embora tenha sido verificada uma maior eficiência catalítica para o transporte de amônio, foi também demonstrada a ocorrência de uma cinética incomum para o transporte transmembrana de ureia, característica de transportadores de baixa afinidade. Dessa forma, altas taxas de absorção são observadas quando a ureia está presente em elevadas concentrações no meio externo. Apesar dessas diferenças quanto à captação de amônio e ureia pelos tecidos foliares de *Vriesea gigantea*, não existe, até o momento, informações a respeito do comportamento dessa planta quando confrontada com ambas as fontes de nitrogênio simultaneamente, condição essa mais próxima à existente em ambientes naturais.

A rápida absorção de nitrogênio observada, independente se na forma inorgânica ou orgânica, já era esperada. Embora o experimento tenha sido conduzido com plantas cultivadas *in vitro*, a privação de nitrogênio a que elas foram submetidas simularia, de certa forma, o meio oligotrófico em que essas bromélias habitam. É bastante provável que essa captação rápida de nitrogênio seja uma adaptação da espécie à disponibilidade temporária de água e nutrientes, condição muito frequente que lhe é imposta na natureza. Levando em consideração que a água é o veículo natural para a absorção de nutrientes e que, em seu habitat, as plantas epífitas são expostas a períodos intermitentes de chuvas, sugere-se que essas plantas precisem absorver os nutrientes presentes no tanque de uma maneira bastante rápida. Benzing e Renfrow (1974), por exemplo, observaram que durante o período chuvoso houve um acúmulo de nutrientes nos tecidos das bromélias atmosféricas *Tillandsia circinata* e *Tillandsia usneoides*, os quais seriam utilizados posteriormente nos períodos de escassez. Essa estratégia, importante na aquisição de nutrientes em ambientes oligotróficos, também foi sugerida por Endres e Mercier (2001a,b), os quais observaram que *Vriesea gigantea* foi mais rápida em absorver os nutrientes do meio quando comparada à espécie terrestre *Ananas comosus*, espécie cujo ambiente natural está sujeito a menores variações na disponibilidade de água e nutrientes.

Ao se verificar a influência da ureia na absorção de amônio por *V. gigantea*, pôde ser visualizada uma nítida preferência pelo consumo inicial da fonte orgânica. Enquanto cerca de

40% da ureia disponibilizada foi absorvida do meio de cultura nas primeiras 24 horas de cultivo, praticamente não houve consumo de amônio. Já na ausência de ureia, 85% do amônio foi absorvido no mesmo intervalo de tempo. Já tinha sido visto que a ureia era captada com grande eficiência quando presente em concentrações elevadas (Inselsbacher *et al.*, 2007), mas ocasionar uma inibição inicial na absorção de amônio foi um resultado bastante surpreendente, ainda mais se for levado em consideração a alta eficiência catalítica dos transportadores de amônio nos tecidos foliares dessa bromélia (Inselsbacher *et al.*, 2007). Esses resultados indicam a ocorrência de mecanismos de captação de nitrogênio finamente regulados nessa espécie.

A absorção inicial de ureia poderia estar relacionada à sua natureza efêmera em condições naturais, se comparada com as fontes inorgânicas de nitrogênio. Por ser de origem exclusivamente biológica, sua disponibilidade é ocasional, pois requer a presença e/ou a visita de animais que a excretem. Além disso, esse recurso orgânico é rapidamente mineralizado e/ou imobilizado por microorganismos que vivem em associação no tanque de bromélias, possuindo uma meia-vida de poucas horas (Inselsbacher *et al.*, 2007). Já o amônio presente na água do tanque é uma fonte nitrogenada de natureza muito mais estável (Inselsbacher *et al.*, 2007), além de ser proveniente de diversas vias independentes, desde precipitações atmosféricas até como produto final de diversas reações biológicas, incluindo a decomposição do material foliar que se acumula no tanque e a hidrólise da ureia (Benzing, 1990). Dessa forma, por ser o conteúdo amoniacal no interior do tanque muito mais constante, é provável que *Vriesea gigantea* esteja adaptada a absorver primeiramente a ureia, mobilizando todo o seu aparato metabólico para tal processo (uma vez que inibiu grandemente a absorção do amônio).

A aparente contradição existente quanto à preferência de *V. gigantea* por ureia como fonte de nitrogênio preferencial para seu crescimento, mesmo se tratando de um recurso de presença ocasional e efêmera na natureza (em detrimento do amônio, que é encontrado em abundância muito maior e de forma muito mais constante), pode ser esclarecida por meio da análise mais minuciosa da utilização dessa fonte de nitrogênio orgânico. Com o uso de ureia duplamente marcada com isótopos de carbono e nitrogênio, foi verificada a incorporação não somente do nitrogênio presente nessa molécula, mas também do seu carbono. Esse resultado pode ser inferido por meio da análise referente à citolocalização do CO_2 liberado após hidrólise da ureia no interior dos tecidos foliares, a qual demonstrou haver uma concentração de CO_2 expressiva ao redor dos cloroplastos dessa planta. Embora tenha ocorrido uma perda de carbono em relação ao nitrogênio incorporado no período inicial de cultivo, após 15 dias foi verificada sua estabilização, totalizando um balanço de 64% de aproveitamento do carbono proveniente da molécula de ureia. Esse é um resultado bastante interessante, pois poderia explicar a plausível do

por quê da preferência de *V. gigantea* por esse recurso orgânico. Ao utilizar a ureia, a planta estaria assimilando, de uma só vez, dois dos substratos mais importantes para a construção e manutenção da sua estrutura celular, poupando-a de gastos adicionais caso a obtenção de tais compostos ocorresse de forma independente. O uso preferencial de fontes orgânicas de nitrogênio também é frequentemente documentado em microorganismos, tanto os aquáticos como os terrestres, os quais suprem suas limitações de carbono e nitrogênio por meio da captação e incorporação de recursos nitrogenados orgânicos (Remsen *et al*., 1974, Bardgett *et al.*, 2003; Nordin *et al.*, 2004; Sorensen *et al.*, 2008).

Mais uma vez, *Vriesea gigantea* demonstrou possuir estratégias ecológicas e fisiológicas bastante eficientes e que a capacitam a ocupar com sucesso o ambiente epifítico. A rápida absorção de nutrientes, aliada à regulação fina dos transportadores envolvidos nesse processo, bem como a capacidade de incorporar o carbono presente em fontes de nitrogênio orgânico são algumas das adaptações desenvolvidas por essas bromélias para lidar com a disponibilidade temporária de água e nutrientes a que estão geralmente expostas em seu ambiente natural.

Bibliografia

Bardgett R.D., Streeter T.C., Bol R., 2003. Soil microbes compete effectively with plants for organic-nitrogen inputs to temperate grasslands. *Ecology* **84** (5): 1277-1287.

Bennett J.N., Prescott C.E., 2004. Organic and inorganic nitrogen nutrition of western red cedar, western hemlock and salal in mineral N-limited cedar–hemlock forests. *Oecologia* **141**: 468–476.

Benzing D.H., 1990. Vascular epiphyts, general biology and related biota. Ashton, P.S. (ed.), Cambridge, Cambridge University Press.

Benzing D.H., Renfrow A.,1974. The Mineral Nutrition of Bromeliaceae. *Botanical Gazette* **135** (4): 281-288.

Chapin F.S. III, Moilainen L., Kielland K., 1993. Preferential use of organic nitrogen by a non-mycorrhizal arctic sedge. *Nature* **361**: 150-153.

Endres L., Mercier H., 2001. Influence of nitrogen forms on the growth and nitrogen metabolism of bromeliads. *Journal of Plant Nutrition* **24** (1): 29-42.

Endres L., Mercier H., 2001b. Ammonium and urea as nitrogen sources for bromeliads. *Journal of Plant Physiology* **158:** 205-212.

Falkengren-Grerup U., Månsson K.F., Olsson M.O., 2000. Uptake capacity of amino acids by then grasses and forbs in relation to soil acidity and nitrogen availability. *Environmental and Experimental Botany* **44**: 207–219.

Finzi A.C., Berthrong S.T., 2005. The uptake of amino acids by microbes and trees in three cold-temperate forests. *Ecology* **86**: 3345–3353.

Gerendás J., Sattelmacher B. 1997. Significance of Ni supply for growth, urease activity and the concentrations of urea, amino acids and mineral nutrients of urea grow plants. *Plant and Soil* **190**: 153-162.

Hawkins H.-J., Wolf G., Stock W.D., 2005. Cluster roots of *Leucadendron laureolum* (Proteaceae) and *Lupinus albus* (Fabaceae) take up glycine intact: An adaptive strategy to low mineral nitrogen in soils? *Annals of Botany* **96**: 1275–1282.

Henry H.A.L., Jefferies R.L., 2002. Free amino acid, ammonium and nitrate concentrations in soil solution of a grazed coastal marsh in relation to plant growth. *Plant, Cell & Environment* **25**: 665–675.

Inselsbacher E., Cambui C.A., Richter A., Stange C.F., Mercier H., Wanek W., 2007. Microbial activities and foliar uptake of nitrogen in the epiphytic bromeliad *Vriesea gigantea*. *New Phytologist* **175** (2): 311-320.

Kielland K., McFarland J., Olson K., 2006. Amino acid uptake in deciduous and coniferous taiga ecosystems. *Plant and Soil* **288**: 297–307.

Kielland K., 1997. Role of free amino acids in the nitrogen economy of arctic cryptogams. *Ecoscience* **4**: 75–79.

Kielland K., 1994. Amino acid absorption by arctic plants: implications for plant nutrition and nitrogen cycling. *Ecology* **75** (8): 2373-2383.

Knudson L., 1946. A new nutrient solution for germination for orchid seed. *American Orchid Society Bulletin* **15:** 214-217.

Lipson D.A., Raab T.K., Schmidt S.K., Monson R.K., 1999a. Variation in competitive abilities of plants and microbes for specific amino acids. *Biology and Fertility of Soils* **29**: 257–261.

Majerowicz, N., Kerbauy G.B., Nievola, C., Suzuki, R.M., 2000. Growth and nitrogen metabolism of *Catasetum fimbriatum* (orchidaceae) grown with different nitrogen sources. *Environ. Exp. Bot.* **44**: 195-206.

McFarland J.W., Ruess R.W., Kielland K., Doyle A.P., 2002. Cycling dynamics of NH_4^+ and amino acid nitrogen in soils of a deciduous boreal forest ecosystem. *Ecosystems* **5**: 775–788.

Mercier H., Kerbauy G.B., Sotta B., Miginiac E., 1997. 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* **20** (3): 387-392.

Millanes A.M., Fontaniella B., García M.L., Solas M.T., Vicente C., Legaz M.E., 2004. Cytochemical location of urease in the cell wall of two different lichen phycobionts. *Tissue and Cell* **36:** 373-377.

Miller A.E., Bowman W.D., 2002. Variation in nitrogen-15 natural abundance and nitrogen uptake traits among co-occuring alpine species: do species partition by nitrogen form? *Oecologia* **130**: 609–616.

Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* **15:** 473-497.

Näsholm T., Ekblad A., Nordin A., Giesler R., Högberg M., Högberg P., 1998. Boreal forest plants take up organic nitrogen. *Nature* **302**: 914-916.

Nordin A., Högberg P., Näsholm T.. 2001. Soil nitrogen form and plant nitrogen uptake along a boreal forest productivity gradient. *Oecologia* **129**: 125–132.

Nordin A., Schmidt I.K., Shaver G.R., 2004. Nitrogen uptake by arctic soil microbes and plants in relation to soil nitrogen supply. *Ecology* **85** (4): 955-962.

Paungfoo-Lonhienne C., Lonhienne T.G.A., Rentsch D., Robinson N., Christie M., Webb R.I., Gamage H.K., Carroll B.J., Schenk P.M., Schmidt S., 2008. Plants can use protein as a nitrogen source without assistance from other organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **105**: 4524–4529.

Persson J., Näsholm T., 2001a. Amino acid uptake: a widespread ability among boreal forest plants. *Ecology Letters* **4**: 434–438.

Persson J., Näsholm T., 2001b. A GC-MS method for determination of amino acid uptake by plants. *Physiologia Plantarum* **113**: 352–358.

Raab T.K., Lipson D.A., Monson R.K., 1996. Non-mycorrhizal uptake of amino acids by roots of the alpine sedge *Kobresia myosuroides*: implications for the alpine nitrogen cycle. *Oecologia* **80:** 488-494.

Raab T.K., Lipson D.A., Monson R.K., 1999. Soil amino acid utilization among species of the Cyperaceae: Plant and soil processes. *Ecology* **80** (7): 2408-2419.

Rains K.C., Bledsoe C.S., 2007. Rapid uptake of ^{15}N-ammonium and glycine-^{13}C, ^{15}N by arbuscular and ericoid mycorrhizal plants native to a Northern California coastal pygmy forest. *Soil Biology & Biochemistry* **39**: 1078-1086.

Salama A.M.S., Wareing D.A., 1979. Effects of mineral nutrition on endogenous cytokinins in plants of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Experimental Botany* **30:** 971-981.

Schimel J.P., Chapin F.S. III, 1996. Tundra plant uptake of amino acid and NH_4^+ nitrogen *in situ*: Plants compete well for amino acid N. *Ecology* **77:** 2142-2147.

Smith S.D., Monson R.K., Anderson, J.E., 1997, Physiological ecology of North American desert plants. Springer, New York.

Sorensen P.L., Clemmensen K.E., Michelsen A., Jonasson S., Ström L., 2008. Plant and microbial uptake and allocation of organic and inorganic nitrogen related to plant growth forms and soil conditions at two subarctic tundra sites in Sweden. *Arctic Antarctic and Alpine Research* **40** (1): 171-180

Weatherburn M.W., 1967. Phenol-Hypochlorite Reaction for Determination of ammonia. *Analytical Chemistry* **39:** 971-974.

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES

Conclusões

A família Bromeliaceae tem atraído a atenção de vários pesquisadores devido ao seu pronunciado epifitismo e importância ecológica em muitas comunidades tropicais e subtropicais do Novo Mundo. Habitantes do dossel de florestas tropicais e subtropicais das Américas, as bromélias estão sujeitas a condições ambientais extremas. Nesse ambiente, variações temporais e espaciais de luz, disponibilidade de água e de nutrientes são constantes, tornando essenciais para a vida dessas plantas o desenvolvimento de uma série de adaptações morfológicas, anatômicas e fisiológicas que as capacitem a utilizar com grande eficiência os recursos ambientais disponíveis.

Uma das peculiaridades observadas em espécies de bromélias epífitas com tanque é a preferência inusitada por fontes orgânicas de nitrogênio. Enquanto para a maioria das plantas terrestres as fontes de nitrogênio inorgânicas são as mais importantes para o desenvolvimento, as bromélias com tanque possuem preferência por fontes orgânicas, tais como a ureia e aminoácidos. Exemplo disso são os estudos realizados com *Vriesea phillipocoburgii e Vriesea gigantea*, que em condições de cultivo *in vitro*, apresentaram melhor crescimento na presença de ureia, comparativamente a outras fontes.

Em ambiente natural, a ureia é fornecida às bromélias pelos anfíbios que vivem ou visitam o reservatório de água formado pelo tanque. Entretanto, esse não é um recurso nutricional muito frequente A análise da água das cisternas de bromélias da espécie *Vriesea gigantea* mostrou que, dentre as formas de nitrogênio dissolvidas, grande parte era constituída por proteínas, seguido de amônio e nitrato. A disponibilidade de ureia fica restrita a situações ocasionais (após a excreção de anfíbios, por exemplo) e durante períodos de curta duração, uma vez que a ureia é rapidamente convertida a amônio ou imobilizada pelos microorganismos presentes na água do tanque.

Levando-se em consideração a intensa competição por ureia no tanque, é muito provável que o sucesso na utilização desse recurso por *Vriesea gigantea* estaria intrinsecamente associado à adoção de estratégias rápidas e eficientes de captação e assimilação de ureia. Com o intuito de compreender quais seriam os mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares envolvidos com a preferência nutricional de *Vriesea gigantea* por ureia, esse trabalho foi proposto. Foram estudados o possível envolvimento das aquaporinas na absorção de ureia pelos tecidos foliares, as prováveis vias utilizadas para a assimilação do nitrogênio proveniente dessa fonte orgânica, bem a citolocalização.da urease.

Possivelmente, *Vriesea gigantea* recorre a várias estratégias simultâneas para absorver a ureia de forma competitiva com os microorganismos presentes no tanque. Uma vez que a disponibilidade de ureia na cisterna não é constante, foi verificado que todo um aparato fisiológico/bioquímico está permanentemente mobilizado para absorver e processar esse composto orgânico, principalmente nas regiões basais foliares. VgPIP1,5 e VgTIP2, por exemplo, aquaporinas potencialmente envolvidas no transporte de ureia, são expressas continuamente nas bases foliares, característica bastante peculiar para as proteínas pertencentes a essa família multigênica. Além disso, levando-se em consideração a cinética de absorção de diferentes fontes de N, há indícios de que todo o mecanismo de captação de nutrientes seja regulado de forma bastante fina, possibilitando que, na presença de ureia, sua absorção seja priorizada em relação às demais fontes de nitrogênio.

Também, levando-se em consideração a cinética de absorção de diferentes fontes de N, há indícios de que todo o mecanismo de captação de nutrientes seja regulado de forma bastante fina, possibilitando que, na presença de ureia, sua absorção seja priorizada em relação às demais fontes de nitrogênio.

Além absorver a ureia rapidamente por meio das aquaporinas, *V. gigantea* parece indisponibilizar esse recurso para os microorganismos, o que seria feito por meio da sua rápida hidrólise. Ao secretar a urease para a água do tanque, a ureia é transformada em amônio, que é captada rapidamente por transportadores de alta eficiência, também presentes na base das folhas. Dessa forma, dois mecanismos de transporte distintos e independentes estariam envolvidos, um atuando na absorção da molécula de ureia e o outro na absorção de seu subproduto, o amônio.

Uma vez dentro dos tecidos, a ureia pode tanto ser armazenada nos vacúolos ou ser prontamente assimilada. O aumento da expressão do gene *VgTIP2*, que codifica uma aquaporina presente na membrana do tonoplasto, sugere que pelo menos uma parte desse composto orgânico é estocado pelas células. Contudo, levando-se em consideração as baixas concentrações de ureia livre presentes nos tecidos foliares, sugere-se que a maior parte dela seja realmente assimilada. Essa assimilação, em grande parte, foi dependente da hidrólise prévia da ureia em NH_4^+ e CO_2, reação essa catalisada pela urease. Em poucas horas após o fornecimento da ureia às plantas, a síntese de vários aminoácidos foi observada. Surpreendentemente, foi demonstrado que ambos os produtos da hidrólise da ureia são incorporados rapidamente, formando aminoácidos (principalmente via GDH, GS/GOGAT e subsequentes ações de transaminases) e esqueletos carbônicos. É provável que a assimilação do carbono presente na molécula de ureia seja um dos motivos que levou essa espécie a utilizar preferencialmente essa fonte de nitrogênio, com a

vantagem de se obter, simultaneamente, tanto o C quanto o N, ambos presentes em quantidades limitantes no seu habitat natural.

Ficou evidente, com os resultados obtidos nesse estudo aliados ao conhecimento pré-existentes sobre a nutrição de *Vriesea gigantea*, que a combinação estratégica de uma série de especializações funcionais é o ponto-chave para a utilização eficiente da ureia (Fig. 29). Mecanismos bastante rápidos de absorção e assimilação de nitrogênio foram observados para essa espécie. Embora os experimentos aqui apresentados tenham sido conduzidos com plantas cultivadas *in vitro*, a extrapolação dos resultados obtidos para situações de crescimento em ambiente natural é bastante plausível, ainda mais se considerarmos que a aquisição e a seleção de estratégias fisiológicas se fazem ao longo do processo evolutivo da espécie.

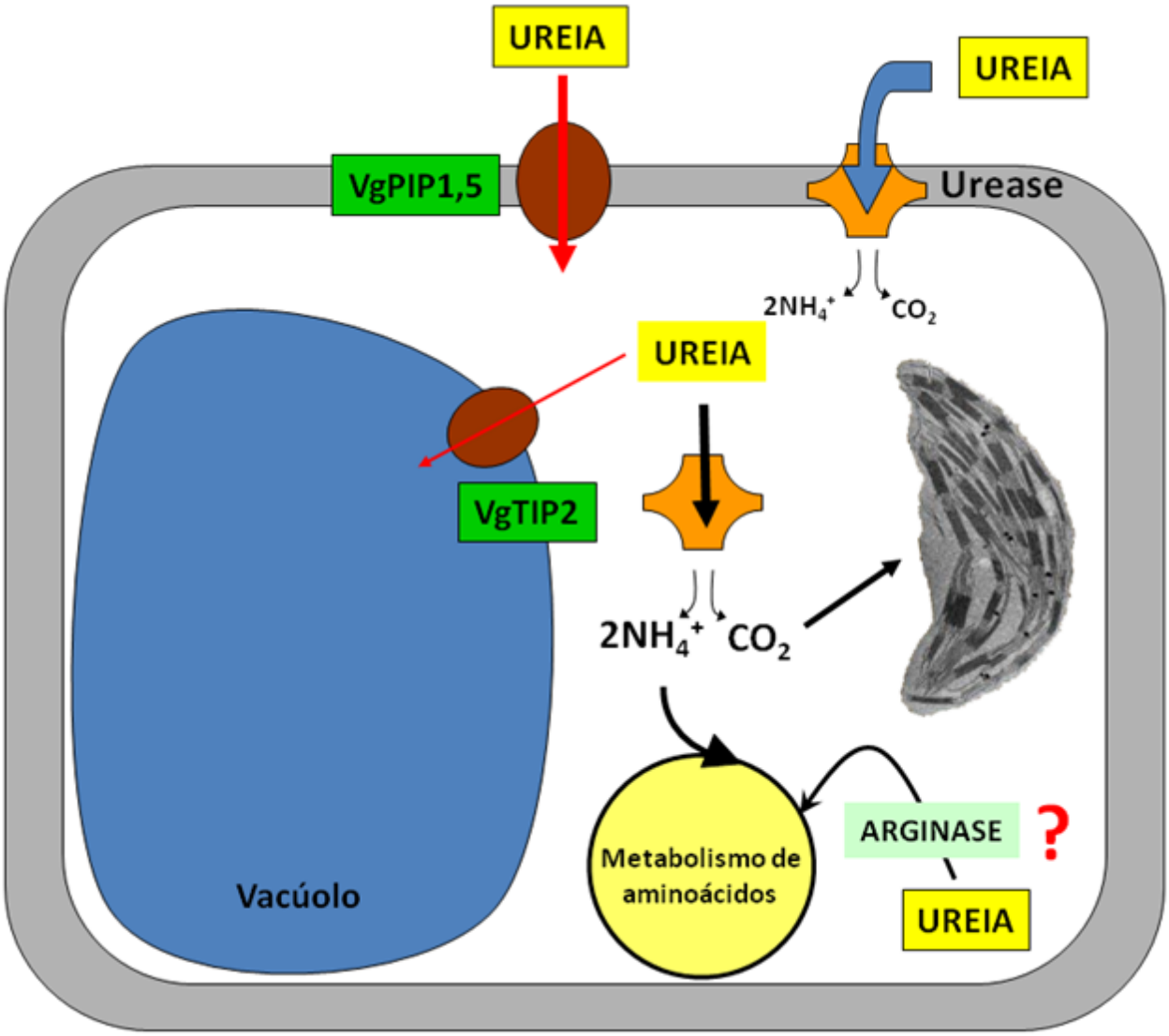


Figura 29: Esquema representativo dos mecanismos fisiológicos relacionados com a absorção e assimilação de ureia pela bromélia epífita com tanque *Vriesea gigantea*.

Resumo

Apesar do ambiente epifítico ser caracterizado como bastante desfavorável para o desenvolvimento de vegetais devido à falta intermitente de água e escassez de nutrientes, uma grande diversidade de bromélias o ocupam com sucesso. Uma série de características adaptativas, tanto morfológicas, anatômicas e fisiológicas, está presente nessas plantas e as capacitam a utilizar com grande eficiência os recursos disponíveis de maneira escassa e temporária. O enfoque deste trabalho foi direcionado à compreensão das estratégias adotadas pela bromélia epífita com tanque *Vriesea gigantea* para a utilização da ureia, uma fonte de nitrogênio não usual para a maioria das plantas terrestres. Em decorrência da frequente associação com anfíbios em ambiente natural, a ureia é um recurso disponibilizado ocasionalmente e durante um curto período na água do tanque.

Foram isolados 2 cDNAs completos de aquaporinas potencialmente envolvidos no transporte de ureia: *VgPIP1,5* e *VgTIP2*, que codificam proteínas de membranas plasmática e de tonoplasto, respectivamente. Ambos os genes tiveram expressão mais acentuada nas bases foliares e foram pouco afetados pelo regime de luz. Além disso, a expressão desses genes foi estimulada na presença de ureia, o que não foi observado para em relação às fontes inorgânicas amônio e nitrato.

A assimilação de ureia pareceu ser, em grande parte, dependente de hidrólise prévia em NH_4^+ e CO_2, reação essa catalisada pela urease. Foi demonstrado que ambos os produtos dessa reação são incorporados rapidamente, formando aminoácidos (principalmente via GDH, GS/GOGAT e subseqüentes transaminases) e esqueletos carbônicos Infelizmente, a incorporação direta de ureia via reação inversa da arginase não foi confirmada, embora esse resultado possa estar relacionado a limitações metodológicas para a análise de arginina. Ainda assim, evidências sugerem que, se não pela arginase, outras vias alternativas de assimilação direta de ureia possam estar envolvidas.

Além da sua importância da urease na hidrólise citossólica de ureia, foi demonstrada, de forma inédita em plantas, a presença dessa enzima nas frações de membranas e parede celular de *V. gigantea*. É muito provável que, além da capacidade de secreção da urease para a região do tanque, a presença dessa enzima em regiões próximas à superfície celular torne mais rápido e eficiente o processo de assimilação de ureia pelas células.

Embora seja caracterizada como um recurso de disponibilidade ocasional e de curta duração e por ser alvo de intensa competição interespecífica, a ureia ainda assim é a fonte de N preferencial para *Vriesea gigantea*. É provável que um dos motivos que levou essa espécie a utilizar preferencialmente a ureia seja a vantagem de se obter, simultaneamente, tanto carbono quanto nitrogênio, ambos presentes em quantidades limitantes no seu habitat natural.

Abstract

Although the growth conditions in epiphytic habitats are unfavourable for plant growth due to water and nutrient limitations, a great diversity of bromeliads successfully occupy this environment. These plants have evolved a variety of morphological, anatomical and physiological adaptations allowing them a highly efficient use of available resources. The main objective of the present work was to elucidate the strategies of the epiphytic tank bromeliad *Vriesea gigantea* to utilize urea, a nitrogen source generally considered to be uncommon for most terrestrial plants. Although in natural environments urea is frequently excreted by amphibians that are associated with the tank of these plants, the availability of this nitrogen source is nevertheless short-lived and unpredictable.

Two complete cDNA sequences encoding plasma membrane and tonoplast aquaporin proteins, which are potentially involved in urea transport, were isolated from leaf tissues of *Vriesea gigantea*: *VgPIP1,5* and *VgTIP2*, respectively. Both genes were mainly expressed in the leaf bases and were not affected by light conditions. Moreover, the expression of these aquaporins was stimulated in the presence of urea in the culture medium, while no effect was observed with ammonium and nitrate as nitrogen source.

Urea assimilation is thought to be strongly dependent on precedent hydrolysis of urea to NH_4^+ and CO_2 mediated by urease. Both products of this reaction were quickly assimilated and incorporated into amino acids (mainly via GDH, GS/GOGAT and subsequent transaminases) and carbon skeletons. On the contrary, the direct incorporation of urea via a reverse reaction of arginase could not be confirmed due to the methodological limitation of analyzing double-labelled (^{13}C-,^{15}N-) arginine. However, there is strong evidence suggesting that arginase or other alternative assimilation pathways may be involved in urea assimilation.

Despite the importance of urease in the cytosolic hydrolysis of urea, the present work demonstrates for the first time that this enzyme is present in both, membrane and cell wall fractions of *V. gigantea*. Consequently, besides the capacity of this plant to excrete urease into the tank water, the close association of this enzyme to urea uptake regions could further increase the rate and efficiency of urea assimilation by plant cells.

Although urea is characterized as an occasional and only short-lived nutrient source, which is furthermore subject to intense interspecific competition, urea can be considered to be a preferential nitrogen source for *Vriesea gigantea*. One reason for the preferential use of urea could be the advantage of simultaneously gaining carbon and nitrogen, two limiting resources in the natural habitat of epiphytic bromeliads.

VII –ANEXOS I

I-A - Verificação da presença de microorganismos endofíticos nos tecidos foliares de *Vriesea gigantea*

I-B - Padronização do ensaio *in vitro* da urease

I-C - Padronização do ensaio *in vitro* da arginase

I-D - Composição dos meios de cultura

I-D – Apêndices do Capítulo II

ANEXO A

Verificação da presença de microorganismos endofíticos nos tecidos foliares de *Vriesea gigantea*

O primeiro procedimento adotado no início deste trabalho de Doutorado foi verificar se haveria microorganismos endofíticos (fungos e/ou bactérias) vivendo em associação no interior dos tecidos foliares de *Vriesea gigantea* cultivadas *in vitro*. Levando em consideração que grande parte do trabalho estaria relacionada ao estudo da assimilação de uréia, essa foi uma etapa importante para se ter certeza de que não haveria uma possível influência de microorganismos na assimilação da uréia nos tecidos de *Vriesea*. Particularmente em relação à urease, Polacco e Holland (1993) sugeriram que a indução dessa enzima em espécies vegetais, observada em inúmeros trabalhos, seria na verdade decorrente da indução da urease de bactérias comensais presentes nos tecidos dessas plantas ou da proliferação de bactérias que contém uma alta atividade dessa enzima.

Embora as plantas utilizadas neste trabalho fossem provenientes de sementes germinadas e cultivadas em condições de assepsia, isto não seria garantia de que elas não contivessem microorganismos endofíticos associados, uma vez que muitas espécies são transmitidas, de geração a geração, através das sementes (Philipson & Christey 1986; Siegel *et al.*, 1984).

Para a realização dessa análise, contou-se com a supervisão da Profª Drª Heloiza Ramos Barbosa, pertencente ao Laboratório de Fisiologia de Microorganismos, do Instituto de Ciência Biomédicas da USP. Cinco indivíduos de *Vriesea gigantea* cultivados *in vitro* e dois cultivados em estufa do jardim do Departamento de Botânica do IBUSP foram analisados com o intuito de se verificar se a presença ou ausência de microorganismos endofíticos é de ocorrência generalizada ou pontual.

Inicialmente as plantas foram submetidas à desinfestação da sua superfície externa (inclusive aquelas cultivadas *in vitro*), procedimento esse realizado em condições de assepsia. Para isso, elas foram imersas em etanol 92% durante 2 minutos, sob agitação, e em seguida enxaguadas com água destilada estéril. As plantas foram então incubadas por 5 minutos sob agitação em solução contendo 2% de hipoclorito de sódio e enxaguadas novamente. Os tecidos foliares de cada planta foram macerados com 3 mL de água destilada esterilizada e o extrato

resultante distribuído em placas de Petri contendo meios de cultura sólidos específicos para o crescimento de bactérias (LB, Pye, Vermelho Congo e o MacConkey,) ou em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), que permite o crescimento de fungos. Utilizou-se um volume de 25 μL de extrato para cada placa de Petri. Os meios de cultura foram mantidos a 25ºC no escuro e a contagem de bactérias e fungos foi feita no período de 24 horas a 2 semanas. A verificação da presença de microorganismos endofíticos foi meramente qualitativa, pois uma análise mais precisa da densidade e possíveis espécies encontradas não faziam parte dos objetivos desse experimento.

Composição dos meios de cultura utilizados

- LB: meio de cultura (pH 7,0) composto de 10 g L^{-1} de triptona, 5 g L^{-1} de extrato de levedura, 10 g L^{-1} de NaCl e 15 g L^{-1} de ágar.
- Pye: meio de cultura (pH 7,0) composto de 2 g L^{-1} de peptona, 1 g L^{-1} de extrato de levedura, 200 mg L^{-1} de $MgSO_4$ e 15 g L^{-1} de ágar.
- Vermelho Congo: meio de cultura (pH 7,0) composto de 500 mg L^{-1} de extrato de levedura, 5 g L^{-1} de ácido málico, 500 mg L^{-1} de K_2HPO_4, 200 mg L^{-1} de $MgSO_4.7H_2O$, 100 mg L^{-1} de NaCl, 15 mg L^{-1} de $FeCl_3.6H_2O$, 4,8 g L^{-1} de KOH e 20 g L^{-1} de ágar. O corante Vermelho Congo foi autoclavado separadamente do meio de cultura e misturado posteriormente, na proporção de 15 mL L^{-1}.
- MacConkey: diluição de 20 g L^{-1} do produto em água destilada.
- MS (Murashige & Skoog, 1962): veja anexo IV-tabela 2.

Como resultado, observou-se que os todos os indivíduos amostrados cultivados *in vitro* não continham bactérias e fungos endofíticos, quaisquer que fossem os meios de cultura utilizados para tal procedimento. Contudo, nas plantas coletadas da estufa detectou-se, embora em baixa densidade, a presença tanto de bactérias quanto de fungos no interior dos tecidos foliares (Figura 30).

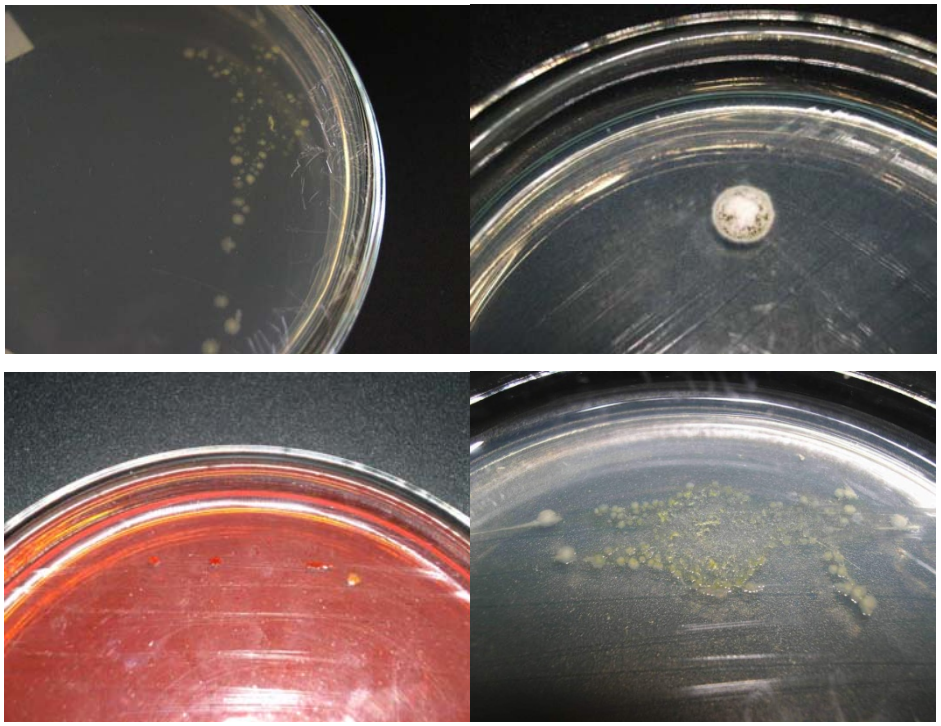


Figura 30: Bactérias e fungos endofíticos detectados nos tecidos foliares de plantas de *Vriesea gigantea* cultivados em casa de vegetação. As plantas tiveram sua superfície externa esterilizada e o extrato resultante das suas folhas foi aplicado em meios de cultura específicos para o crescimento de bactérias ou fungos.

A presença de microorganismos endofíticos nos tecidos das plantas cultivadas em ambiente externo não foi surpreendente, se for considerado o fato de tratar-se de uma espécie epífita periodicamente sujeita à escassez de nutrientes. Essa associação já foi documentada para algumas espécies de gramíneas cujo ambiente natural é pobre em nitrogênio. Neste caso específico, a presença de bactérias fixadoras de N contribui para que essas plantas sejam bem sucedidas nesse tipo de ambiente (Dalton *et al.*, 2004). Para diversas outras espécies, inclusive algumas de importância econômica como milho, cevada, arroz, aveia, cana-de-acúcar e abacaxizeiro, há relatos sobre a presença de bactérias endofíticas fixadoras de N, embora não seja claro se quantidades significativas de N são fixadas nesses sistemas (Vose, 1983, Baldani *et al.*, 1986; Olivares *et al.*, 1996; Triplett, 1996; Clemence *et al.*, 2000; Engelhard *et al.*, 2000; Cruz *et al.*, 2001; Riggs *et al.*, 2001; Dazzo *et al.*, 2003;).

Contudo, a não detecção de microorganismos endofíticos nos tecidos de plantas cultivadas *in vitro* sugere que eles não seriam transmitidos via sementes, e, nesse caso, o estudo

da utilização da uréia por *Vriesea gigantea* não seria comprometido devido à interferência de outros organismos.

ANEXO B

Padronização do ensaio *in vitro* da urease

Embora o protocolo do ensaio *in vivo* da urease já estivesse estabelecido (etapa realizada durante a iniciação científica), a necessidade da análise da atividade dessa enzima em diferentes frações celulares tornou obrigatória a padronização do seu ensaio *in vitro*.

A primeira etapa da padronização foi adequar a forma de se interromper a reação enzimática da urease. Embora normalmente se utilize de adição de ácido ou fervura do material, esses procedimentos não puderam ser aplicados nesse caso. Isso devido tanto ao fato da uréia, substrato da enzima, ser uma molécula orgânica termosensível (e, neste caso, a fervura resultaria na sua hidrólise) quanto à natureza do método colorimétrico empregado para a detecção do amônio produzido ser uma reação dependente de pH (e, nesse caso, a adição de ácido para a precipitação protéica resultaria numa perda de sensibilidade do método). Uma possibilidade foi a adição de etanol. Contudo, para que a maioria das proteínas fosse precipitada, era necessário que um grande volume de etanol fosse empregado (concentração final de etanol ~70%), tornando as amostras extremamente diluídas. Na tentativa de solucionar esse problema, optou-se então por interromper a reação por meio de congelamento rápido do material, procedimento esse que se mostrou eficaz.

Em seguida, passou-se à padronização de demais parâmetros importantes para a otimização do ensaio *in vitro* da urease. Foram testados diferentes tampões de extração, presença do inibidor de protease leuptina, concentração de substrato e tempo de reação. Para otimizar o procedimento, a urease foi induzida cultivando-se as plantas (previamente submetidas à privação de N por 2 semanas) em meio de cultura contendo 5 mM de uréia como fonte exclusiva de nitrogênio.

Para a definição do tampão de extração mais adequado, foram testados tampões inorgânico (fosfato de potássio 100 mM) e orgânico (hepes 50 mM), contendo protetores enzimáticos em diferentes concentrações. A adição do antioxidante DTT (nas concentrações de 2 e 5 mM), de fontes protéicas (albumina e caseína) e de protetor contra compostos fenólicos

(PVP) foram analisados quanto à sua eficácia durante a extração enzimática. Em todos os tampões testados, o pH utilizado foi o de 7,5, sendo este o mais amplamente empregado para o ensaio da urease (Frankenberger e Tabatabai, 1982; Hogan *et al.*, 1983; Gerendás *et al.*, 1998; Gerendás & Sattelmacher, 1999).

Para a extração da urease, 1 g de tecidos foliares de *Vriesea gigantea*, coletados e congelados imediatamente em nitrogênio líquido, foram homogeneizados utilizando-se 4 mL dos tampões especificados abaixo:

1) tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5)
2) tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 2 mM de DTT, 1% de PVP e 0,1% de albumina
3) tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 5 mM de DTT, 1% de PVP, 0,1% de albumina e 0,05% de caseína
4) tampão hepes 50 mM (pH 7,5) contendo 2 mM de DTT, 1% de PVP e 0,1% de albumina
5) tampão hepes 50 mM (pH 7,5) contendo 5 mM de DTT, 1% de PVP, 0,1% de albumina e 0,05% de caseína

O material foi centrifugado a 11.000 rpm por 15 minutos a 4ºC e 500 μL do extrato resultante foram utilizados para o ensaio da urease. Esse consistiu inicialmente da incubação em tampão contendo 200 mM de uréia durante 60 minutos a 30ºC com 500 μL do extrato vegetal. Como resultado, verificou-se que o tampão fosfato de potássio contendo 2 mM de DTT, 1% de PVP e 0,1% de albumina foi o que resultou em maiores atividades enzimáticas. Sua utilização resultou em atividades aproximadamente 20% superiores em relação aos demais tampões inorgânicos testados e cerca de 30% maior em relação aos tampões orgânicos (Fig. 31).

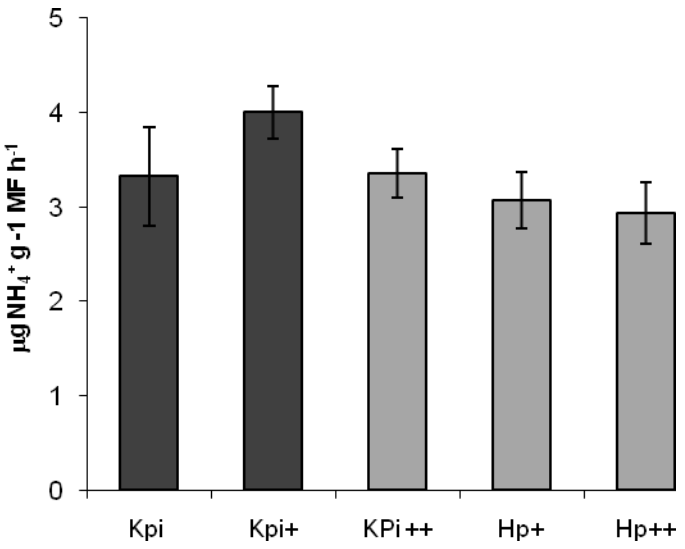


Figura 31: Influência do tampão de extração na atividade da urease extraída de tecidos foliares de *Vriesea gigantea*. O extrato foi incubado com 200 mM de uréia durante 60 minutos a 30ºC e a produção de amônio por essa enzima quantificada. Barras representam a média ± DP referente a 3 réplicas técnicas obtidas a partir de uma amostras composta de 5 plantas. KPi: tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5); KPi+: tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) acrescido de 2 mM de DTT, 1% PVP e 0,1% de albumina; KPi++: tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 5 mM de DTT, 1% PVP, 0,1% de albumina e 0,05% de caseína; Hp+: tampão Hepes 50 mM (pH 7,5) contendo 2 mM de DTT, 1% PVP e 0,1% de albumina; Hp++: tampão Hepes 50 mM (pH 7,5) acrescido de 5 mM de DTT, 1% PVP, 0,1% de albumina e 0,05% de caseína.

Após a determinação do tampão de extração mais apropriado para o ensaio da urease, verificou-se a influência da leupeptina, um inibidor de proteases, no ensaio dessa enzima. Para tanto, comparou-se a atividade da urease na ausência e na presença de 10 µM de leupeptina, a qual foi adicionada ao tampão de extração. Contudo, não foram observadas diferenças quanto à sua presença no ensaio enzimático (Fig. 32).

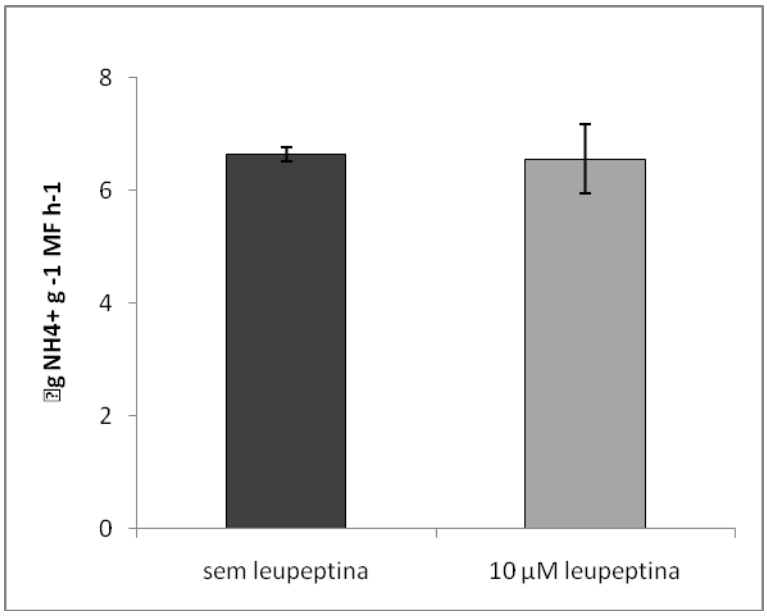


Figura 32: Influência do inibidor de proteases leupeptina na atividade da urease extraída dos tecidos foliares de *Vriesea gigantea*. Barras representam a média ± DP referente a 3 réplicas técnicas obtidas a partir de uma amostra composta de 5 plantas.

Em seqüência, analisou-se o perfil de saturação enzimática com o intuito de se determinar a concentração ideal de substrato para que a urease atuasse com sua atividade máxima. Foram testadas as concentrações de 10, 25, 50, 100, 200 e 300 mM de uréia durante o ensaio enzimático e a produção do amônio pela enzima foi quantificada. Obteve-se uma curva de cinética enzimática próxima à de Michaelis-Menten, com velocidade máxima da enzima estimada ao redor da concentração de 200mM de uréia (Fig. 33).

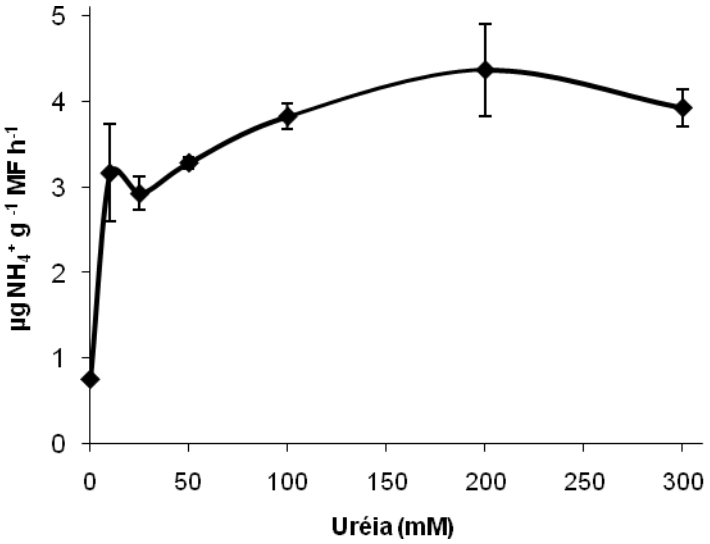


Figura 33: Atividade da urease extraída dos tecidos foliares de *Vriesea gigantea* em função da concentração do seu substrato, a uréia, no tampão de incubação. Pontos representam a média ± DP referente a 3 réplicas técnicas obtidas a partir de uma amostra composta de 5 plantas.

Como última etapa do processo de padronização, foi determinada a linearidade da atividade da urease ao longo do tempo de ensaio. A atividade da enzima foi analisada em intervalos de 15 minutos e a produção de amônio quantificada. Foi observado que a atividade da enzima manteve-se linear até os 45 minutos iniciais de ensaio, decaindo em seguida (Fig. 34). Dessa forma, estabeleceu-se que tempo de ensaio para essa enzima seria de 40 minutos.

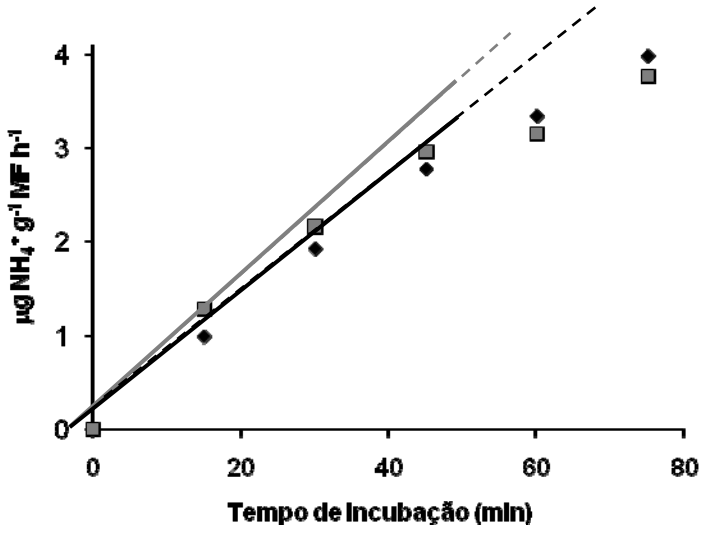


Figura 34: Atividade da urease extraída dos tecidos foliares de *Vriesea gigantea* em função do tempo de ensaio enzimático. Cada ponto representa a média ± DP referente a 3 réplicas técnicas obtidas a partir de uma amostra composta de 5 plantas.

Concluindo, as melhores condições estabelecidas para o ensaio da urease foram:

- extração da enzima com tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 2 mM de DTT, 1% PVP e 0,1% de albumina;
- incubação de 500 µL do extrato com 200 mM de uréia a 30ºC
- reação com duração de 40 minutos

ANEXO C

Padronização do ensaio *in vitro* da arginase

Com o objetivo de se estudar a possibilidade de incorporação direta da uréia em aminoácidos, foi necessária a padronização do ensaio enzimático da arginase. Para isso, foram verificados diversos parâmetros importantes para a otimização do ensaio, como o tampão de extração, volume de extrato utilizado, concentração do substrato, pH da reação, tempo de incubação e temperatura de incubação.

De forma geral, o material vegetal foi coletado e congelado imediatamente em nitrogênio líquido, sendo em seguida macerado e homogeneizado. Para cada grama de matéria fresca, foram adicionados 4 mL de tampão de extração, sendo a mistura centrifugada a 12.000 rpm durante 20 minutos a 4ºC. O sobrenadante resultante foi incubado com 5 mM de $MnCl_2$ a 40ºC durante 10 minutos para a ativação da arginase. Em seguida, foi adicionado ao extrato 1 mL de tampão Tris-HCl adicionado de arginina e 1 mM de $MnCl_2$. Alíquotas foram retiradas no início e final do período de incubação para quantificação da uréia produzida pela arginase.

A primeira etapa da padronização do ensaio da arginase consistiu na determinação do tampão de extração mais adequado para essa enzima, bem como do volume de extrato a ser utilizado (400, 600, 800 e 1000 μL) no ensaio. Foram testados 3 tampões de extração, todos eles tendo como base o Tris-HCl 100 mM pH 9,8. Abaixo encontram-se listados os tampões utilizados:

1) Tampão Tris-HCl 100 mM (pH 9,8)
2) Tampão Tris-HCl 100 mM (pH 9,8) contendo 5 mM de DTT e 5% (v/v) de glicerol
3) Tampão Tris-HCl 100 mM (pH 9,8) contendo 5 mM de DTT, 5% (v/v) de glicerol e 2,5% de albumina

Como condição inicial de ensaio, foi estabelecida a utilização da concentração de 300 mM de arginina e incubação a 30ºC durante 60 minutos. Na etapa de ativação da arginase, o extrato foi incubado com concentrações de $MnCl_2$ proporcionais ao volume de extrato utilizado.

Foi observada uma notável diferença na atividade da arginase em função do tampão utilizado. Levando-se em consideração os resultados obtidos com a utilização de 400 μL de extrato (melhor razão entre volume de extrato e atividade enzimática), a extração da arginase com tampão contendo 5 mM de DTT, 5% de glicerol e 2,5% de albumina resultou em atividade 18 vezes superior àquela obtida com o tampão Tris-HCl ausente de protetores enzimáticos e 6 vezes maior em relação à utilização do tampão Tris-HCl contendo somente DTT e glicerol, (Fig. 35).

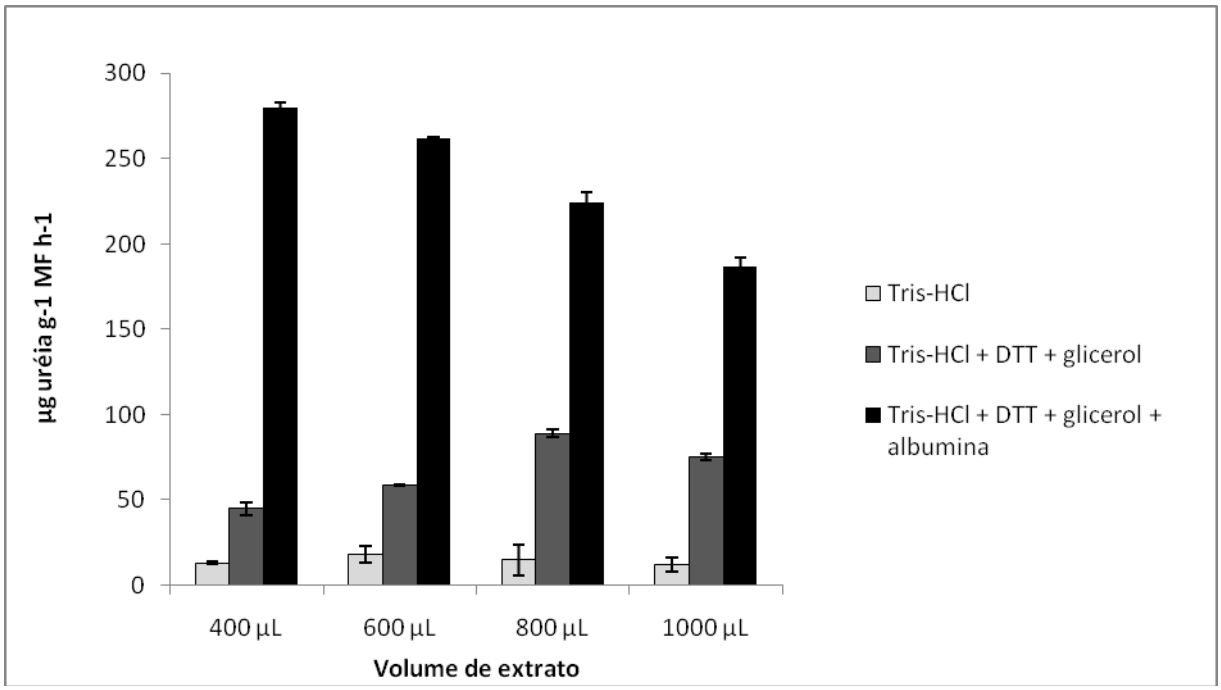


Figura 35: Atividade da arginase em função do tampão de extração e volume de extrato utilizado para o ensaio. Foram testados tampões contendo diferentes concentrações de protetores enzimáticos (DTT, glicerol e albumina). Alíquotas de 400, 600, 800 e 1000 μL de extrato foram analisadas em relação à eficiência do ensaio. As demais condições utilizadas no procedimento (300 mM de arginina, pH 9,8, incubação a 30ºC e reação de 60 minutos) foram estabelecidas levando em consideração as informações disponibilizadas na literatura. Barras representam a média ± DP de 3 réplicas técnicas obtidas a partir de uma amostra composta de 10 plantas.

Uma vez determinados o tampão de extração e volume de extrato a ser utilizados, determinou-se em seguida a concentração de substrato mais apropriada para o ensaio da

arginase. Verificou-se a atividade dessa enzima quando incubada na presença de 0, 25, 50, 100, 150, 200 e 300 mM de arginina. Os demais parâmetros do ensaio (pH, temperatura e tempo de reação) foram escolhidos de acordo com as informações disponíveis em literatura específica sobre o assunto. Foi obtido como resultado uma curva de cinética enzimática próxima à de Michaelis-Menten. A saturação enzimática (condição em que a enzima atinge sua velocidade máxima) foi alcançada quando utilizadas concentrações iguais ou superiores a 100 mM de arginina (Fig. 36). De forma a assegurar que a arginase atuasse sempre em condição de excesso de substrato durante o ensaio enzimático, optou-se por utilizar a concentração de 200 mM de arginina nos ensaios seguintes.

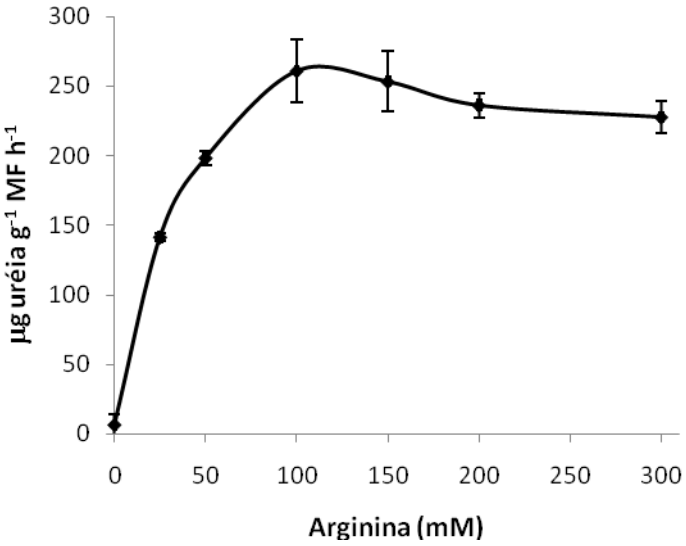


Figura 36: Atividade da arginase em função da concentração de arginina utilizada como substrato. A enzima foi extraída com tampão Tris-HCl 100 mM (pH 9,8) contendo 5 mM de DTT, 5% (v/v) de glicerol e 2,5% de albumina. Alíquotas de 400 µL de extrato foram utilizadas durante o ensaio. Foram testadas concentrações de 0, 25, 50, 100, 150, 200 e 300 mM de arginina. Pontos representam a média ± DP de 3 réplicas técnicas obtidas a partir de uma amostra composta de 10 plantas.

A próxima etapa do processo de padronização foi a determinação do pH ideal para a máxima atividade da arginase. Foram testados, tanto durante o processo de extração quanto durante o ensaio enzimáticos, os pHs de 6.5, 7.5, 8.5, 9.5, 9.8, 10.5 e 11.5, valores esses

escolhidos com base num levantamento prévio da literatura. A composição do tampão de extração, volume de extrato e concentração de substrato utilizados durante esse procedimento foram pré-estabelecidos nas etapas anteriores. O ensaio enzimático foi conduzido em temperatura de 30ºC, durante 60 minutos. Como resultado, verificou-se que a arginase possui uma faixa de pH ótimo para funcionamento muito restrita (entre 8.5 e 9.5, aproximadamente), sendo que pHs inferiores ou superiores a esse intervalo resultaram num decréscimo muito acentuado na sua atividade (Fig. 37).

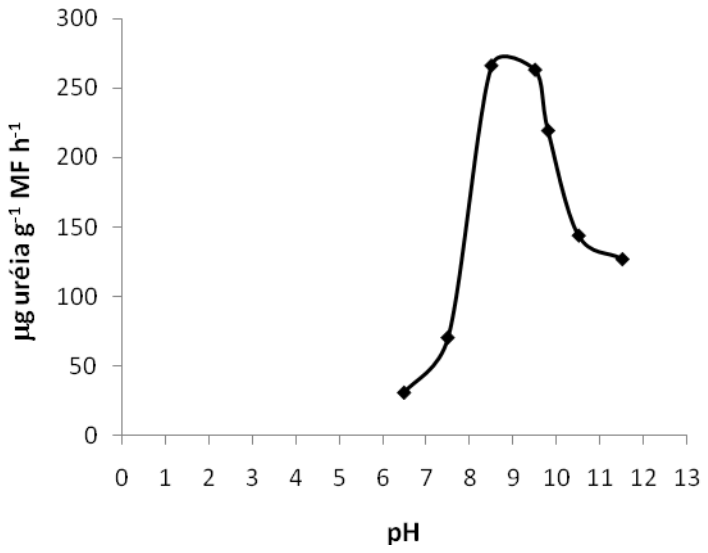
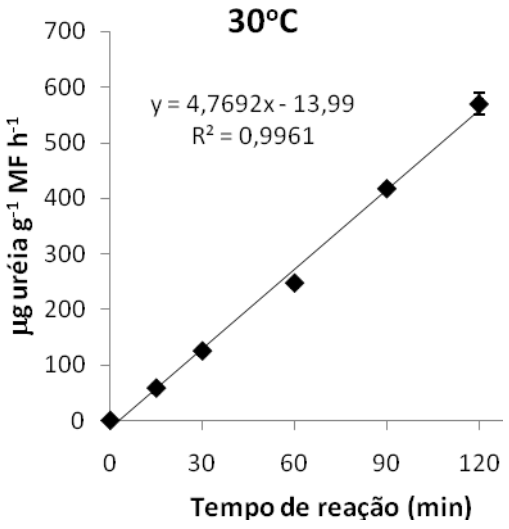
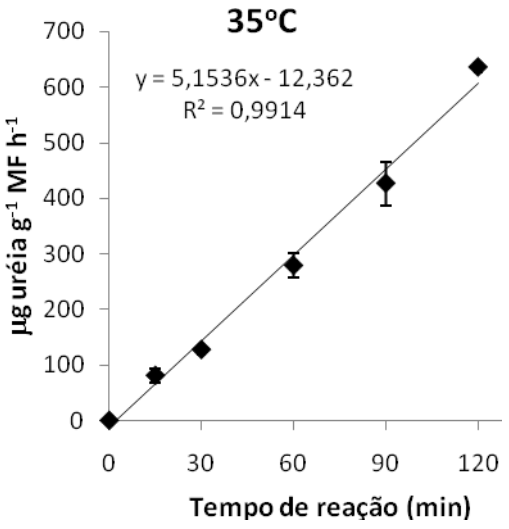


Figura 37: Atividade da arginase em função do pH. Todas as soluções utilizadas durante a extração e ensaio enzimáticos tiveram seus pHs ajustados de acordo com o valor de interesse. A enzima foi extraída com tampão Tris-HCl 100 mM contendo 5 mM de DTT, 5% (v/v) de glicerol e 2,5% de albumina. Alíquotas de 400 µL de extrato e uma concentração de 200 mM de arginina foram utilizadas durante o ensaio, conduzido a 30ºC durante 60 minutos. Pontos representam a média ± DP de 3 réplicas técnicas obtidas a partir de uma amostra composta de 10 plantas.

Os últimos parâmetros analisados durante o processo de estabelecimento do protocolo em questão foram o tempo de reação e a temperatura de incubação durante o ensaio enzimático. Foram determinadas as atividades da arginase submetidas à incubação de 30, 35 e 40ºC durante 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. Foi verificado que, independentemente da temperatura de

incubação utilizada, houve uma relação linear entre a produção de uréia (produto da ação da arginase) e o tempo de reação. Em relação à temperatura de incubação, praticamente não foram observadas diferenças significativas em relação à atividade da arginase (Fig. 38). Uma vez que não houve diferenças significativas quanto às temperaturas testadas, optou-se por adotar como padrão a incubação do ensaio a 30°C, obtendo-se dessa forma valores para a atividade enzimática mais próximos àqueles encontrados nas condições de cultivo das plantas. Quanto ao tempo de reação, foi escolhido como padrão o período de 60 minutos de ensaio, otimizando-se assim o tempo despendido durante o processo e a obtenção de valores de densidade óptica compreendidos numa faixa de leitura confiável (entre 0,1 e 1).





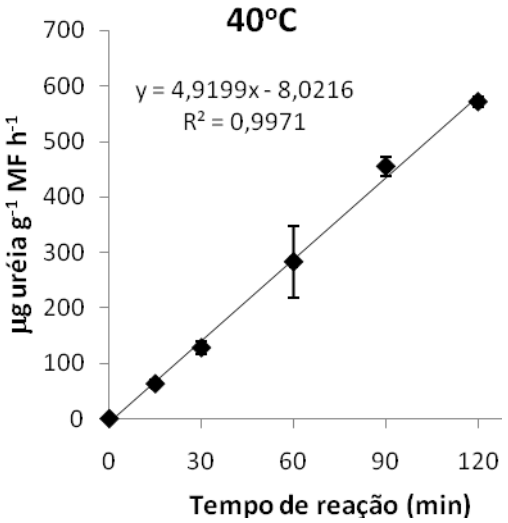


Figura 38: Atividade da arginase em função do tempo de reação e temperatura de incubação. A enzima foi extraída com tampão Tris-HCl 100 mM (pH 9,5) contendo 5 mM de DTT, 5% (v/v) de glicerol e 2,5% de albumina. Alíquotas de 400 μL de extrato e uma concentração de 200 mM de arginina foram utilizadas durante o ensaio. Foram testadas as temperaturas de 30, 35 e 40ºC, sendo a atividade da arginase determinada após 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos de reação. Pontos representam a média ± DP de 3 réplicas técnicas obtidas a partir de uma amostra composta de 10 plantas.

Com o protocolo de ensaio estabelecido, verificou-se, de forma complementar, a atividade diuturna da arginase em *Vriesea gigantea*. Extrações enzimáticas foram realizadas em intervalos de 3 horas durante 24 horas e a atividade da arginase quantificada. Foi verificada uma clara correlação entre a presença de luz e a atividade da enzima: houve uma tendência de aumento de atividade ao longo de todo o período luminoso, com o máximo de atividade observado às 20 horas, seguido de uma queda acentuada coincidente com o início do período de escuro. Durante as 9 horas em que as luzes da sala de cultivo se mantiveram apagadas, a atividade da arginase permaneceu em níveis relativamente baixos, correspondente a 10-60% dos valores observados durante o período de luz (Fig. 39).

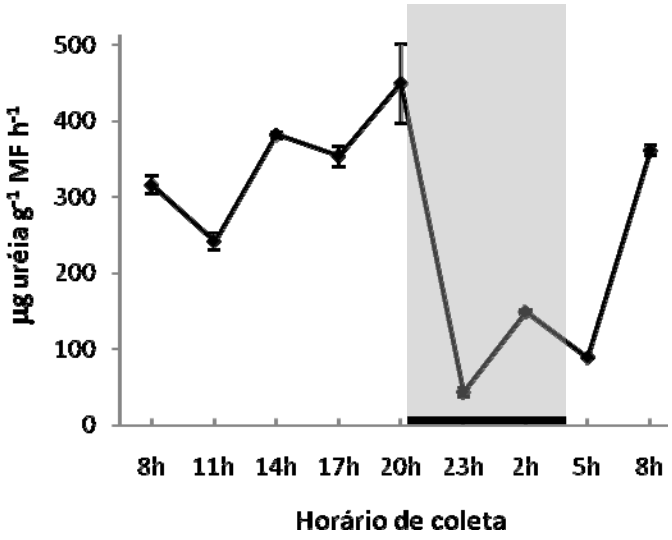


Figura 39: Ciclo diuturno da arginase em tecidos foliares de *Vriesea gigantea*. As plantas foram cultivadas em meio básico Knudson com fotoperíodo de 15 horas e temperatura de 25 ± 2ºC. As

coletas foram realizadas a cada 3 horas durante 24 horas. A enzima foi extraída com tampão Tris-HCl 100 mM (pH 9,5) contendo 5 mM de DTT, 5% (v/v) de glicerol e 2,5% de albumina. Alíquotas de 400 μL de extrato e uma concentração de 200 mM de arginina foram utilizadas durante o ensaio, o qual foi conduzido a 30ºC durante 60 minutos. Pontos representam a média ± DP de 3 réplicas técnicas obtidas a partir de uma amostra composta de 10 plantas. Período de escuro está representado por faixa cinza no gráfico (entre 21 e 5 h).

ANEXO D

Composição dos meios de cultura

Tabela 1 – Formulações dos meios de cultura baseados na composição de Knudson (1946) utilizados no decorrer do trabalho.

Composição	**Concentração**			
	Knudson *	**Knudson sem N** *	**Knudson sem N + 5 mM de ureia** *	**Knudson (1/2 N) + 2,5 mM de ureia**
$(NH_4)_2SO_4$	250 mg L^{-1}	___	___	125 mg L^{-1}
$Ca(NO_3)_2$	500 mg L^{-1}	___	___	250 mg L^{-1}
KH_2PO_4	250 mg L^{-1}	250 mg L^{-1}	250 mg L^{-1}	250 mg L^{-1}
$MgSO_4$	250 mg L^{-1}	250 mg L^{-1}	250 mg L^{-1}	250 mg L^{-1}
Fe-EDTA *I	10 mL L^{-1}	10 mL L^{-1}	10 mL L^{-1}	10 mL L^{-1}
Micro MS *II	5 mL L^{-1}	5 mL L^{-1}	5 mL L^{-1}	5 mL L^{-1}
$NiCl_2$	___	10 μM	10 μM	10 μM
Sacarose	20 g L^{-1}	20 g L^{-1}	20 g L^{-1}	20 g L^{-1}
Ágar	5,5 g L^{-1}	5,5 g L^{-1}	5,5 g L^{-1}	5,5 g L^{-1}
$CaCO_3$	0,5 g L^{-1}	0,5 g L^{-1}	0,5 g L^{-1}	0,5 g L^{-1}
CaSO4	___	0,64 g L^{-1}	0,64 g L^{-1}	___
Uréia *III	___	___	5 mM	2,5 mM

(*) pH 5,8

(* I) Vide tabela 3 do Anexo IV

(*II) Vide tabela 4 do Anexo IV

(* III) Solução esterilizada com filtro Millex (malha de 0,22 μm) e adicionada ao meio de cultura previamente autoclavado e na temperatura de aproximadamente 40ºC. O meio contendo uréia foi distribuído em frascos esterilizados, sendo todo o procedimento realizado em câmara de fluxo laminar.

Tabela 2 – Formulação do meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962)

Composição MS *	**Concentração**
KNO_3	1,9 L^{-1}
NH_4NO_3	1,65 L^{-1}
$CaCl_2.2H_2O$	440 mg L^{-1}
$MgSO_4.7H_2O$	370 mg L^{-1}
KH_2PO_4	170 mg L^{-1}
Fe-EDTA *I	10 mL L^{-1}
Micro MS *II	5 mL L^{-1}
Sacarose	30 g L^{-1}
Mio-inositol	100 mg L^{-1}
Tiamina-HCl	0,1 mg L^{-1}
Phytagel	2 g L^{-1}

(*) pH 5,8

(* I) Vide tabela 3 do Anexo IV

(*II) Vide tabela 4 do Anexo IV

Tabela 3 – Formulação da solução de Fe-EDTA utilizada na elaboração dos meios de cultura deste trabalho

Composição	Concentração
$FeSO_4.7H_2O$	2,78g L^{-1}
Na_2EDTA	3,72 g L^{-1}

O Na_2EDTA, dissolvido em 100 mL de água ultrapurificada e aquecido a 60º C, foi adicionado à solução de $FeSO_{4.7}H_2O$. A mistura foi homogeneizada e o volume completado para 1L com água ultrapurificada.

Tabela 4 – Formulação da solução estoque de micronutrientes de Murashige e Skoog (1962) utilizada na elaboração dos meios de cultura deste trabalho.

Composição	Concentração da solução estoque
$MnCl_2.4H_2O$	4,46 g L^{-1}
$ZnSO_4.7H_2O$	1,72 g L^{-1}
H_3BO_3	1,24 g L^{-1}
KI	166 mg L^{-1}
$NaMoO_4.2H_2O$	50 mg L^{-1}
$CoCl_2.6H_2O$	5 mg L^{-1}
$CuSO_4.5H_2O$	5 mg L^{-1}

A)

```
GAGAGAGAGAGAGAGAGGAAATGGAGGGGAAGGAGGAGGATGTGAGCTTGGGGGCCAA
CAAGTTCTCAGAGAGGCAGCCCATAGGGACTGCTGCACAGAGCCAAGATAACAAGGACTA
CAAGGAGCCACCCCCAGCTCCTCTGTTTGAGCCAGGGGAGCTCAAGTCATGGTCATTCTA
CAGGGCGGGGATAGCCGAGTTCATGGCCACTTTCCTCTTCCTCTACATCACCATCCTCAC
TGTCATGGGTGTCTCCAAATCCCCCAGCAAATGCTCCACTGTGGGTATCCAGGGGATTGC
CTGGGCCTTTGGGGGCATGATCTTCGCCCTTGTCTACTGCACTGCTGGGATCTCCGGTGG
GCACATCAACCCAGCTGTGACCTTTGGGCTGCTGCTGGCAAGGAAGCTGTCCTTGACCAG
GGCCATCTTCTACATGGTGATGCAGTGTTTGGGAGCCATTTGTGGAGCTGGTGTGGTGAA
GGGGTTCCAAAAGGGGCTCTACATGAGCAATGGAGGTGGGGCCAATGTTGTGGCCCCTGG
TTACACCAAGGGTGATGGCCTTGGTGCTGAGATCATTGGCACCTTTATTCTGGTCTACAC
TGTCTTCTCTGCCACTGATGCCAAGAGGAATGCCAGAGACTCTCATGTCCCTCTCCTTGC
ACCTCTGCCCATTGGCTTTGCTGTCTTCCTTGTCCACCTGGCCACCATCCCCATCACTGG
TACTGGCATTAACCCAGCTAGGAGCCTTGGAGCTGCCATCATCTTCAACAGGGCCCATGC
TTGGGATGACCATTGGATCTTCTGGGTGGGGCCCTTCATTGGAGCAGCATTAGCTGCCAT
CTACCACCAGGTAGTGATCAGAGCCATCCCATTTGAGAGCAGGGCTTGAGATTAAGATGT
CTCTTTATGAGATTCCCCTTCAGCAGAAACTTTGTGGCTTGCTTCCATTCCTCATCTGTC
TTGTAGTGAACCCTCCTCCTCTCCTTAGTCTATTATTGTTGCTCCATTTAATACTCTCCT
TTGTTCTTCTGTTCTGTCCAGGGCTCTTGTTGTTATTTGCTATGTGTGTAAATTAAGTAC
TCCTGTACTAGATTATATTTTTGCTGCTGCTTCATGAGGATGCCTTTTTTTTAAAAAAAA
```

B)

```
          *        *             *      *                  *
MEGKEEDVSLGANKFSERQPIGTAAQSQDNKDYKEPPPAPLFEPGELKSWSFYRAGIAEF

            *    * * *
MATFLFLYITILTVMGVSKSPSKCSTVGIQGIAWAFGGMIFALVYCTAGISGGHINPAVT

          *                                *             *
FGLLLARKLSLTRAIFYMVMQCLGAICGAGVVKGFQKGLYMSNGGGANVVAPGYTKGDGL

                  *            *
GAEIIGTFILVYTVFSATDAKRNARDSHVPLLAPLPIGFAVFLVHLATIPITGTGINPAR

*
SLGAAIIFNRAHAWDDHWIFWVGPFIGAALAAIYHQVVIRAIPFKSRA
```

Figura 1: PIP1,5 de *Vriesea gigantea*. A) cDNA completo. Delimitados por caixa de texto, iniciadores utilizados para clonagem do cDNA completo. Em verde, códon de início de transcrição; em amarelo, região NPA; em vermelho, códon STOP e cauda poli-A; em cinza, região escolhida como sonda para análise de expressão B) Sequência protéica deduzida, evidenciando a região NPA (em amarelo) e os sítios putativos de fosforilação (simbolizados com *).

A)

```
TCAGCTCGAGCTCGAACTCGAACTAGAACTCGAAGTAGAACCTAGCCATGGCGGGGATCG
CATTCGGCCGTTTCGACGACTCGTTCAGCGTCGGCTCCCTCAAGGCCTACGTGGCCGAGT
TCATCTCTACTCTACTGTTCGTCTTCGCCGGCGTCGGATCCGCCATTGCCTACAACAAGT
TGACGGGCGGCGCGGCGCTCGATCCGACCGGGCTAGTGGCAGTGGCCATCTGCCACGGGT
TCGCGCTGTTCGTGGCGGTGTCGATCGCGGCCAACATCTCTGGCGGGCACGTCAACCCGG
CCGTCACCTTTGGCTTGGCCCTTGGGGGTCAGATCACCATCCTTACTGGAATCTTCTATT
GGGTCGCGCAGCTCGTCGGCGCCATCGTCGGAGCTTACCTCCTCAAGTTTGCCACTGGAT
TTGACACACCCACCCACGGCGTGGCCGCTGGAATGGGCGCGGCGGAGGGGGTGGTGATGG
AGATCATCATCACCTTCGCCCTCGTCTACACCGTCTACGCGACCGCAGCCGACCCGAAGA
GGGGCTCCCTCGGCACCATCGCCCCGATCGCCATCGGCCTCATCGTCGGCGCCAACATCC
TCGCGGCCGGGCCCTTCTCCGGGGGCTCCATGAACCCGGCCCGATCCTTCGGCCCTGCCG
TCGCCAGCGGCAACTTCGCAGACAACTGGATCTACTGGGTCGGGCCCCTAGTCGGCGGCG
GGCTCGCGGGGATCGTCTACACCTACGTGTTCATGTTCTCCGACCATGCACCCGTGTCAG
CTAGTGATTATCCTTGAACCTCATAAATGTTTGTGTTCGGGAACTAAATTTGGAATATTA
TTTGTTGCTTTGGTCTGAAAAAAAAAAAAAA
```

B)

```
            * *  *
MAGIAFGRFDDSFSVGSLKAYVAEFISTLLFVFAGVGSAIAYNKLTGGAALDPTGLVAVA

ICHGFALFVAVSIAANISGGHVNPAVTFGLALGGQITILTGIFYWVAQLVGAIVGAYLLK

       *                                          *
FATGFDTPTHGVAAGMGAAEGVVMEIIITFALVYTVYATAADPKRGSLGTIAPIAIGLIV

                        *                 *
GANILAAGPFSGGSMNPARSFGPAVASGNFADNWIYWVGPLVGGGLAGIVYTYVFMFSDH

    *    *
APVSASDYP
```

Figura 2: TIP2 de *Vriesea gigantea*. A) cDNA completo. Delimitados por caixa de texto, iniciadores utilizados para clonagem do cDNA completo. Em verde, códon de início de transcrição; em amarelo, região NPA; em vermelho, códon STOP e cauda poli-A B) Sequência protéica deduzida, evidenciando a região NPA (em amarelo) e os sítios putativos de fosforilação (simbolizados com *).

VIII – ANEXO 2

Publicações

Organic nitrogen nutrition in plants

Camila Aguetoni Cambuí and Helenice Mercier*

Current Topics in Plant Biology, Vol.7: 13-17 (2006)

Current Topics in
Plant Biology

Mini-Review

Organic nitrogen nutrition in plants

Camila Aguetoni Cambuí and Helenice Mercier*

Department of Botany, University of São Paulo. Rua do Matão, 277, C.P. 11461,
CEP 05422-970 São Paulo, SP, Brazil

ABSTRACT

Since nitrogen is the most limiting nutrient for plant growth and development, plants living in low inorganic nitrogen environments needed to develop a special ability to take up organic nitrogen sources. Until now, alpine, boreal, arctic tundra plants, carnivorous plants, bromeliads, orchids and some agricultural plants have been shown to take up organic N under field and laboratory conditions. This adaptation can be exemplified by the high rates of organic N uptake and better growth of these plants when cultivated in the presence of organic N. Currently, transporters for amino acids have been found in many plant species, some of which related to the organs involved in the absorption of N, like roots, leaves and capturing organs of carnivorous plants. However, the ability to take up organic nitrogen sources might be widespread in the plant kingdom, which would allow for its economical use as fertilizers.

KEYWORDS: urea, amino acids, peptides, nitrogen uptake and mineralization rate

INTRODUCTION

For a long time it was believed that inorganic nitrogen sources, such as nitrate and ammonium, were not only the most abundant forms found in soils but also the only possible forms to be taken up by plants. In this way, organic N sources, when present in soils, had to be decomposed by microorganisms into inorganic N forms before being used by plants. However, laboratory and natural systems studies have supplied evidence of the importance of organic N forms in plant nutrition [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12].

It is known that the supply of soil inorganic nitrogen is limiting for plant growth in many environments, especially in areas where low temperature and/or pH makes mineralization processes slow, such as in arctic and alpine areas, or the boreal forest ecosystem [5, 13, 14]. Moreover, in arid land systems there is limited nutrient availability due to low rainfall, low primary productivity and slow rates of organic matter breakdown [15]. It has also been found that epiphytic [16] and carnivorous [17] plants are generally exposed to low inorganic nitrogen levels in their natural habitats.

In the environments mentioned above, organic compounds constitute a great resource of nitrogen [18, 7, 19, 20, 14, 21, 22, 23]. For instance, numerous studies have focused on the importance of amino acids and urea in plant nutrition. Once the ability to take up organic N can be found in plants of different taxons, we can divide them didactically into major groups according to the environment or the habitat they live in:

1. Alpine, boreal and arctic tundra plants

Recently, much attention has been given to the study of nitrogen nutrition in plants of alpine, boreal or arctic ecosystems. Most of the earlier studies related to the plant-nitrogen relationship and nitrogen cycling in these environments focused on the dynamics of inorganic N [24]. However,

*Corresponding author
hmercier@usp.br

currently it is known that inorganic N supplied to plants by mineralization is impaired by the nutrient necessity of these plants [25]. Furthermore, relatively high concentrations of free amino acids are found in soils of these ecosystems, making them the major source of available N to the roots [5, 7, 19, 14, 22]. For this reason, many efforts have been made to evaluate the importance of organic N for these plants.

Experiments of amino acid uptake from incubation solutions [26, 27] and soils [28, 27], using many plant species representing a wide variety of plant types, have shown that rates of organic N uptake can be high compared with that of inorganic N in these ecosystems. This conclusion took into account free amino acid concentration in soils and root uptake kinetics [6, 19, 14]. Moreover, researches have demonstrated that both mycorrhizal and non-mycorrhizal plants are able to take up organic N [26, 10, 14].

It was also shown that amino acids can be absorbed as an intact molecule from soils, despite competition with microorganisms [28]. This is in agreement with the large number of amino acid transporters that have been identified in many plant species, some of them related to root carrier systems [29, 30]. Thus, the large amount of amino acids found in soils, the presence of amino acid transporters in root systems and the high ability of these plants to take up amino acids make organic N sources of great importance for the plant nutrition in alpine, boreal and arctic ecosystems.

2. Carnivorous plants

Most carnivorous plants are found to grow in nutrient-poor habitats, especially those deficient in nitrogen and phosphorus [31]. They are characterized as having modified leaf-derived structures that are specialized in arthropod capture, digestion and uptake of nutrients [32]. These carnivory trap forms have arisen independently in different lineages of angiosperms [33], and have allowed these plants to grow and survive in such environments.

The contribution of nutrients from arthropods to the carnivorous plants can be partial or almost complete [34, 35, 36, 37, 38]. However, the nitrogen content of prey is available only after the action of digestive enzymes. These enzymes are secreted by specialized glands in most carnivorous plants [17], they also being important for the perception of chemical stimuli [35].

It has been shown that carnivorous plants are able to take up nitrogen in the form of amino acids as well as ammonium or peptides [39, 40, 41, 17]. As in other plants, nutrient uptake and distribution in carnivorous plants depend on the expression or regulation of specific transporters. Three classes of transporters for nitrogen (ammonium, amino acid and peptide transporters) have been identified in their capturing organs, providing clues about the mechanisms used by these plants to uptake nitrogen [17].

3. Bromeliads and orchids

Bromeliads and orchids are good model plants for investigating N nutrition since they have different habits in nature. Most of them are epiphytes and are found in low-nutrient environments. In the case of bromeliads, many of them have a very special structure formed by closely imbricated leaves, the tank, which creates a reservoir of water and organic debris. Moreover, these tanks can be visited by many animal species searching for water, food, shelter or a place to reproduce. Since the availability of organic matter can be high due to the accumulation of litter and animal excrements [23], the ability of bromeliads to take up organic N sources has been suggested.

Since the early 1970s, it is has been demonstrated that bromeliads can take up organic N. The foliar absorption of amino acids has been shown both in tank and tankless bromeliads [42, 43]. For example, Nyman *et al.* [43] observed the simultaneous net uptake of 17 amino acids by *Tillandsia paucifolia*, a tankless species. It was also observed that foliar trichomes are of great importance for nutrient uptake, since absorption occurred exclusively through them [42, 43]. Moreover, the use of antibiotics in the tank water showed that amino acid absorption occurred independently of the presence of microorganisms inside the tank water [42].

Developmental analyses have also provided evidence on the importance of organic N for bromeliad growth. Both amino acids and urea have resulted in efficient growth responses in plants cultivated under *in vitro* conditions [42, 44, 45].

Vriesea philippocoburgii, a tank forming epiphyte, and *Tillandsia pohliana*, a tankless one, reached the highest fresh and dry weights when cultivated in urea compared with inorganic N sources [46], indicating the capacity of these plants to metabolize organic nitrogen.

Recently, it has been shown that guanine (excretion from spiders) can also contribute significantly to the nitrogen necessity of bromeliads. *Bromelia balansae*, a terrestrial tankless bromeliad, is inhabited to a high degree by a host-specific spider (*Psecas chapoda* – Salticidae). It was demonstrated that an average of 38% of total nitrogen content of *B. balansae* was derived from spider debris (e.g. guanine) after 2.5 year of analyses. Furthermore, experiments under field conditions showed that younger leaves of this bromeliad grow 15% more when the plants are inhabited by spiders [47].

As in bromeliads, organic N sources also seem to be important for orchids. *Catasetum fimbriatum*, an epiphytic orchid, showed the highest plant biomass accumulation when cultivated in an aseptic culture medium containing the amino acid glutamine in comparison to inorganic N sources [48, 49]. Therefore, both uptake and growth analyses have demonstrated that bromeliads and orchids are able to take up large amounts of organic N. Moreover, a possible preference for these N sources is probable, since these plants grow better when cultivated in the presence of organic N.

4. Agricultural plants

The importance of organic nitrogen sources for agricultural plants has received more attention during the last decade. One of the reasons is the recent awareness of human impacts on global N cycling and the negative effects of excessively high N additions [50]. Moreover, it has being shown that the pool size of organic N sources can be large even in agricultural soils [20]. One of the widest spread studies related to the presence of organic N in soils was made by Christou *et al.* [51], who analyzed the soil of 94 sites, representing seven contrasting agricultural land use types. They found that dissolved organic nitrogen represented a significant N pool in all agroecosystems, and its concentration is more constant than inorganic N in response to the land use system.

Since organic N might be important for plant N acquisition in agricultural soils, a lot of researches have focused on the ability of crops to take up organic nitrogen. Many transporters of organic N sources have been found in plants, many of them in root tissues [29, 30], so there is a physical precondition for its utilization. In fact, some agricultural plant species have been shown to absorb organic nitrogen. The N uptake of *Oryza sativa* increased depending on the organic N supply rather than on nitrate application [52]. Moreover, Näsholm *et al.* [53] showed the ability of five important crop species (*Phleum pretense*, *Ranunculus acris*, *Trifolium hybridum*, *Trifolium pretense* and *Triticum aestivum*) to take up the amino acid glycine [53, 54]. Even proteins can be used by some plant species (*Sorghum bicolor* and *Oryza sativa)*, as demonstrated by Okamoto and Okada [55]. They found that these two species possess high capabilities for taking up protein, which could be important when they are cultivated in low inorganic N concentrations. In experiments conducted under sterile conditions, Matsumoto *et al.* [56] have also shown the ability of *Daucus carota* and *Brassica campestris* to absorb protein-like N compounds, giving evidence that organic nitrogen sources can be taken up without prior mineralization.

The fertilizers currently used include a diverse collection of compounds including organic sources of N. The utilization of urea as a nitrogenous fertilizer has been increasing since the 1960s, and nowadays it is the most used fertilizer in the world (International Fertilizer Industry Association, www.fertiliser.org/ifa/statistics.asp). Foliar application of urea has been used in many plant cultures, enabling smaller losses of N by mineralization than when applied in soils [57]. On the leaf surface, the uptake of urea occurs very fast due to the high permeability of pores in the cuticle to small and uncharged molecules [58].

Although organic nitrogen sources can be used by agricultural plants, soil turnover rates, rates of mass flow and diffusion of different organic N compounds must be taken into account [54]. Usually, a rapid turnover of organic N is found in crop fields so its relevance to the plants might be

less important for agricultural plants compared with species in some natural habitats [53], as mentioned before. However, it is still evident that a fraction of the total N uptake could, theoretically, be met by organic N sources in agricultural settings [53].

CONCLUSION

Although much attention has been given to plants from N limiting environments, the ability to use organic N sources might be widespread in the plant kingdom. The presence of organic N transporters in roots has been found in a variety of plants, most of them from non-nutrient limiting ecosystems. However, the importance of organic N for plants would depend on the characteristics of the plant environment or habitat, mainly the availability of N organic sources, competition with microorganisms, rates of mass flow and diffusion of different organic N compounds in soils. Nevertheless, the direct uptake of organic N sources by plants might have important consequences for N cycling in ecosystems, since it allows for short-circuiting the conventional N cycle, and decouples primary production from rates of N mineralization.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank FAPESP (06/50549-5) for the financial support.

REFERENCES

1. Melin, E., and Nilsson, H. 1953, Nature, 171: 134.
2. Stribley, D. P., and Read, D. J. 1980, New Phytol., 86: 365-371.
3. Abuzinadah, R. A., and Read, D. J. 1986. New Phytol., 103: 495-506.
4. Finlay, R. D., Frostegard, A., and Sonnerfeldt, A. M. 1992, New Phytol., 120: 105-111.
5. Chapin, F. S. III, Moilainen, L., and Kielland, K. 1993, Nature, 361: 150-153.
6. Kielland, K. 1994, Ecology, 75 (8): 2373-2383.
7. Kielland, K. 1995, Biogeochemistry, 31: 85-98.
8. Turnbull, M., Goodall, R., Stewart, G. R. 1995, Plant Cell Environ., 18: 1386-1394.
9. Raab, T. K., Lipson, D. A., and Monson, R. K. 1996, Oecologia, 80: 488-494.
10. Schimel, J. P., and Chapin, III. F. S. 1996, Ecology, 77: 2142-2147.
11. Schmidt, S., and Stewart, G. R. 1997, Aust. J. Plant Physiol., 26: 253-264.
12. Lipson, D. A., and Monson, R. K. 1998, Oecologia, 113: 406-414.
13. Näsholm, T., Ekblad, A., Nordin, A., Giesler, R., Högberg, M., and Högberg, P. 1998, Nature, 392: 914-916.
14. Raab, T. K., Lipson, D. A., and Monson, R. K. 1999, Ecology, 80: 2408-2419.
15. Smith, S. D., Monson, R. K., and Anderson, J. E. 1997, Physiological ecology of North American desert plants. Springer, New York.
16. Benzing, D. H., 1990, Vascular epiphyts, general biology and related biota. Ashton, P. S. (ed.), Cambridge, Cambridge University Press.
17. Schulze, W., Frommer, W. B., and Ward, J. M. 1999, Plant J., 17 [6]: 637-646.
18. Ivarson, K. C., and Sowden, F. J. 1969, Can. J. Soil Sci., 49: 121-127.
19. Atkin, O. K. 1996, Plant Cell. Environ., 19: 695-704.
20. Mengel, K. 1996, Plant Soil, 181: 83-93.
21. Schulten, H. R., and Schnitzer, M. 1998, Biol. Fert. Soils, 26: 1-15.
22. Murphy, D. V., Macdonald, A. J., Stockdale, E. A., Goulding, K. W. T., Fortune, S., Gaunt, J. L., Poulton, P. R., Wakefield, J. A., Webster, C. P., and Wilmer, W. S. 2000, Biol. Fert. Soils, 30 (5-6): 374-387.
23. Richardson, B. A., Richardson, M. J., Scatena, F. N., and McDowells, W. H. 2000, J. Trop. Ecol., 16: 167-188.
24. Nadelhoffer, K. J., Giblin, A. E., Shaver, G. R., and Laundre, J. L. 1991, Ecology, 72: 242-253.
25. Shaver, G. R., and Chapin, III. F. S. 1991, Ecol. Monogr., 61: 1-31.
26. Persson, J., and Näsholm, T. 2001, Ecol. Lett., 4: 434-438.
27. Persson, J., and Näsholm, T. 2002, Planta, 215: 639-644.
28. Henry, H. A. L., and Jefferies, R. L. 2003, J. Ecol., 91: 627-636.
29. Jones, D. L., and Darrah, P. R. 1994, Plant Soil, 163: 1-12.

30. Fischer, W-N., André, B., Rentsch, D., Krolkiewicz, S., Tegeder, M., Breitkreuz, K., and Frommer, W. B. 1998, Trends Plant Sci., 3: 188-195.
31. Gorb, E., Haas, K., Henrich, A., Enders, S., Barbakadze, N., and Gorb, S. 2005, J. Exp. Biol., 208: 4651-4662.
32. Benzing, D. H. 1987, Trends Ecol. Evol., 2: 364–369.
33. Albert, V. A., Williams, S. E., and Chase, M. W. 1992, Science, 257: 1491-1495.
34. Thum, M. 1988, Oecologia, 75: 427-480.
35. Juniper, B. E., Robins, R. J., and Joel, D. M. 1989, The Carnivorous Plants, London, Academic Press.
36. Schulze, W., and Schulze, E. D. 1990, Oecologia, 82: 427-429.
37. Schulze, W., Schulze, E. D., Pate, J. S., and Gillison, A. N. 1997, Oecologia, 112: 464-471.
38. Ellison, A. M., and Gotelli, N. J. 2001, Trends Ecol. Evol., 16**:** 623-629.
39. Hepburn, J. S., Jones, F. M., and St. John, E. Q. 1920, J. Franklin Inst., 189: 147-184.
40. Lütge, U. 1965, Planta, 1965: 331-344.
41. Plummer, G. L., and Kethley, J. B. 1964, Bot. Gaz., 125: 245-260.
42. Benzing, D. H., 1970, Bull. Torry Bot. Club, 97: 154-159.
43. Nyman, L. P., Davis J. P., O'Dell, S. J., Arditti, J., Stephens, G. C., and Benzing, D. H. 1987, Plant Physiol., 83: 681-684.
44. Mercier, H., Kerbauy G. B., Carvalho, M. T. V., Derbyshire, E. 1997, Selbyana 18 (1): 89-94.
45. Endres, L., and Mercier, H. 2001, J. Plant Nutr., 24 (1): 29-42.
46. Mercier, H., Kerbauy, G. B., Sotta, B., and Miginiac, E. 1997, Plant Cell Environ., 20: 387-392.
47. Romero, G. Q., Mazzafera, P., Vasconcelos-Neto, J., and Trivelin, P. C. O. 2006, Ecology, 87 (4): 803-808.
48. Majerowicz, N., Kerbauy G. B., Nievola, C., and Suzuki, R. M. 2000, Environ. Exp. Bot., 44: 195-206.
49. Majerowicz, N., and Kerbauy, G. B. 2002, Environ. Exp. Bot., 47: 249-258.
50. Matson, P. A., Parrow, W. J., Power, A. G., and Swifr, M. J. 1997, Science, 277: 504-509.
51. Christou, M., Avramides, E. J., Roberts, J. P., and Jones, D. L. 2005, Soil Biol. Biochem., 37: 1560-1563.
52. Yamagata, M., and Ae, N. 1996, Soil Sci. Plant Nutr., 42: 389-394.
53. Näsholm, T., Huss-Danell, K., and Högberg, P. 2000, Ecology, 81 (4): 1155-1161.
54. Näsholm, T., Huss-Daniel, K., and Högberg, P. 2001, New Phytol., 150: 59-63.
55. Okamoto, M., and Okada, K. 2004, J. Exp. Bot., 55 (402): 1577-1585.
56. Matsumoto, S., Ae, N., and Yamagata, M. 2000, Soil Biol. Biochem., 32: 1302-1310.
57. Smith, C. J., Freney, J. R., Sherlock, R. R., and Galbally, I. E. 1991, Fer. Res., 28: 89-94.
58. Marschner, H. 1995, Mineral nutrition of higher plants, Second edition, Academic Press, London.

Microbial activities and foliar uptake of nitrogen in the epiphytic bromeliad *Vriesea gigantea*

Erich Inselsbacher[1], Camila Aguetoni Cambui[2], Andreas Richter[1], Claus Florian Stange[3], Helenice Mercier[2] and Wolfgang Wanek[1]

[1]Department of Chemical Ecology and Ecosystem Research, University of Vienna, Althanstraße 14, 1090 Vienna, Austria; [2]Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, C.P. 11461, São Paulo, SP 05422-970, Brazil; [3]Institute of Soil Science and Plant Nutrition, UFZ Centre for Environmental Research, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Weidenplan 14, 06120 Halle/Saale, Germany

Author for correspondence:
Andreas Richter
Tel: +43 14277 54252
Fax: +43 14277 9542
Email: andreas.richter@univie.ac.at

Received: *17 January 2007*
Accepted: *21 March 2007*

Summary

- In contrast to terrestrial plants, epiphytic tank bromeliads take up nutrients mainly over their tank leaf surface. The form in which nutrients are available in the tanks is determined by the source and the complex interplay between tank microbes, which transform them and the epiphytes that take them up.
- To elucidate the importance of different nitrogenous compounds for the nitrogen (N) nutrition of *Vriesea gigantea* from the Atlantic Rainforest, Brazil, N transformation processes in tank water as well as foliar uptake rates were estimated by ^{15}N labelling techniques.
- Microorganisms actively transformed N compounds in the tank. Specifically, organic N compounds were rapidly mineralized to NH_4^+, while nitrification was negligible.
- Plants took up both organic and inorganic N forms, with a clear preference for NH_4^+. NH_4^+ comprised the largest and, because of fast mineralization rates, the most constant dissolved N pool in the tank water. Excretion of ureases by the plants together with an unusual uptake kinetic for urea also suggests that urea may be potentially important as an N source.

Key words: ^{15}N uptake, nitrogen nutrition, nitrogen transformation, tank bromeliad, vascular epiphyte, *Vriesea gigantea*.

New Phytologist (2007) **175**: 311–320

© The Authors (2007). Journal compilation © *New Phytologist* (2007)
doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02098.x

Introduction

In recent decades, the significance of vascular epiphytes for the functioning of tropical ecosystems has been increasingly recognized. Epiphytes play a major role in nutrient and water cycling (Coxson & Nadkarni, 1995; Bruijnzeel, 2001), are an important component of the biodiversity of tropical rainforests (Gentry & Dodson, 1987) and are habitat for a diverse canopy fauna (Yanoviak *et al.*, 2003).

Epiphytic bromeliads are highly abundant and a species-rich part of neotropical rainforest canopies (Sugden & Robins, 1979; Gentry & Dodson, 1987; Coxson & Nadkarni, 1995; Richardson, 1999), which occupy habitats that are characterized by low nutrient and irregular water supply (Nadkarni & Primack, 1989; Benzing, 2000; Reich *et al.*, 2003). Several physiological, anatomical and morphological adaptations have therefore evolved in epiphytic bromeliads to cope with nutrient and water deficiency (Benzing, 2000; Laube & Zotz, 2003). Tank bromeliads, for example, have evolved a rosette growth habit, which effectively impounds water and organic debris (Benzing, 1998). As the root system of epiphytic tank bromeliads is reduced, they absorb water and nutrients almost exclusively via specialized trichomes from the tank (Benzing & Renfrow, 1974). It was suggested that the ability to take up and assimilate organic nitrogen (N), in forms such as amino acids and urea (Endres & Mercier, 2003), may be

enhanced in tank bromeliads compared with terrestrial plants (Benzing, 1970).

In general, epiphytes may obtain their N from a variety of different sources such as from precipitation and throughfall, decomposing litter, associated fauna and symbiotic N_2 fixation (Brighigna *et al.*, 1992; Stewart *et al.*, 1995). Both inorganic and organic N forms may be significant constituents of rainfall and throughfall (Timberley *et al.*, 1985; Mopper & Zika, 1987). Organic N derived from trapped litter and from inputs by animals (e.g. excretion of insects, spiders or frogs) may, however, constitute the most important N source for these epiphytes (Benzing, 1986, 1998; Richardson, 1999). Because of these diverse N inputs, N in the phytotelmata occurs as an array of different compounds: easily available inorganic forms such as NH_4^+ and NO_3^-, as well as low-molecular-weight organic compounds such as urea and amino acids, and high-molecular-weight compounds such as proteins. These different N compounds are continuously transformed by microorganisms and by extracellular enzymes, which are released into the tanks, both by microorganisms and by plants (Benzing, 2000). To date, no comparative data are available to enable assessment of the proportions and concentrations of each N fraction within the tanks of bromeliads.

Several studies demonstrated that organic N forms enhanced biomass production of bromeliads compared with inorganic N forms (Benzing, 1970; Mercier *et al.*, 1997). The highest biomass production of the tank bromeliad *Vriesea gigantea* was found when it was supplied with urea (Nievola *et al.*, 2001b), while plant growth on NO_3^- was significantly lower (Nievola *et al.*, 2001a). This may be ecologically important, as urea or uric acid may be excreted by amphibians or other small animals that inhabit the tanks. However, it has not been shown whether urea or amino acids are taken up in an intact form or whether these organic N forms were utilized only after being mineralized to NH_4^+. Furthermore, neither the nutrient transformation processes within the tank (which control the availability of different N forms), nor the mechanisms of N uptake and assimilation by the plants have been comprehensively studied.

The aim of the present study was therefore to elucidate the importance of different N sources for the N nutrition of *V. gigantea*, a native tank bromeliad of the Atlantic rainforest of Brazil. Studies were performed both on plants from their natural habitat (Serra do Itapety Natural Park, Brazil) and on plants grown in *in vitro* culture under sterile conditions. We hypothesized that organic N compounds are significant sources of N nutrition for *V. gigantea*. We estimated the net uptake and uptake kinetics of these substances compared with inorganic N forms by ^{15}N-labelling experiments. In order to understand N transformation processes in the tank, and thus the availability and supply of different N compounds, we determined N pools, gross N transformation rates and microbial N consumption.

Materials and Methods

Study area and plant material

The field part of this study was conducted in the Atlantic Forest, in the Serra do Itapety Natural Park, near Mogi das Cruzes, São Paulo state, Brazil (23°28′S, 46°03′W). The forest is classified as mountain dense tropical rain forest (Veloso *et al.*, 1991) and is situated between 807 m and 1141 m above sea level. Mean annual precipitation in this area is 1500 mm and mean annual temperature is 20.6°C.

All experiments were performed on the epiphytic tank Bromeliad *Vriesea gigantea* (Gaudich.), which belongs to the subfamily Tillandsioideae. Plants of *V. gigantea* growing at a height between 1 and 3 m above ground were chosen for the experiments. These plants were between 100 and 160 cm in diameter and had between 15 and 27 leaves.

From these plants, single leaves were taken for ^{15}N-uptake experiments. Tank water (suspension) as well as debris was collected from the central and lateral tanks of the rosettes for chemical analysis and for an equilibrium experiment (see the section 'Equilibrium experiment' below). Samples were collected twice during the end of the dry season in February and March 2004, the first time after five rain-free days (dry conditions) and the second time immediately after a rainfall event (wet conditions).

In addition to field-grown plants, we made use of *V. gigantea* plants that were grown under sterile conditions in *in vitro* culture as described previously (Endres & Mercier, 2001). Plants were grown in a modified Knudson medium with additional micronutrients (Knudson, 1946). The N concentration in this solution was 12.1 mmol N l^{-1}, with N being provided as a mixture of NH_4^+ and NO_3^- (40 and 60%, respectively). Sterile plants were used for N uptake experiments, and to analyse the localization of urease. The plants used for the experiments were 1.5 cm high after cultivation for 1.5 yr. Before the experiments, plants were kept in a 1 : 10 diluted Knudson medium free of N for 28 d to induce N starvation.

Uptake experiments

To test the N uptake capacities of the plants, whole *in vitro* grown plants or basal leaf parts from field-grown plants, which were in contact with tank water, were incubated with ^{15}N-labelled substrates (^{15}N-urea, ^{15}N-KNO_3, ^{15}N-NH_4Cl, ^{15}N-glutamic acid, ^{15}N-glutamine and ^{15}N-glycine; 98 at% labelled) at concentrations of 0.25, 2.5 and 25 μM. For urea treatments the following concentrations were additionally applied: 250 μM, 2.5 mM and 10 mM. Furthermore, different uptake inhibitors were used at a concentration of 25 μM ^{15}N-urea: carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) (at 20 μM) as an ATPase inhibitor to separate active and passive uptake (Dahlman *et al.*, 2004), and HgCl as an aquaporin

 © The Authors (2007). Journal compilation © *New Phytologist* (2007)

blocker (Gerbeau *et al.*, 1999) (at 20 μM). All plants were incubated in uptake solutions (substrates dissolved in deionized water) for 60 min, with the solution being exchanged every 15 min. To avoid contact of solution with the cut leaf ends, solutions were applied in glass tubing (1 cm internal diameter (i.d.) and 2.5 cm length) which was tightly sealed to the leaf surface by silicon grease. Thereafter, the plants were removed, rinsed for 3 min in water and twice for 2 min in a 10 mM $CaSO_4$ solution to remove apoplastically bound ions, and dried at 60°C. The dried samples were then ground to a fine powder in a ball mill (Retsch MM2; Retsch, Vienna, Austria), weighed into tin capsules (2 mg each) and analysed by continuous-flow gas isotope ratio mass spectrometry (IRMS) for ^{15}N content.

Localization of urease activity in *in vitro* grown plants

After N starvation for 28 d, half of the *in vitro* grown plants were induced with 0.5 mM urea in N-free Knudson medium for 24 h, while the other half were used as controls and kept under N-free conditions. Activities of urease were assessed in four compartments: liquid culture medium, the plant surface, the apoplast and the symplastic compartment.

Aliquots of 2 ml of the external solution were incubated with 1 ml of urea solution (15 mmol l^{-1}) for 4 h. Assays were stopped with 16 μl of phenyl mercuric acetic acid (PMA; 2 mmol l^{-1}), which is a potent inhibitor of urease activity (Mulvaney & Bremner, 1979), and NH_4^+ released was quantified colorimetrically by indophenol formation after Kandeler & Gerber (1988). To determine the urease activities that were surface-attached or localized within the plants, plants were removed from the induction solution, washed with high-purity deionized water (MilliQ, Millipore, Vienna, Austria) and blotted dry.

Surface-attached urease activity was analysed by submerging the plants in 12 ml of urea solution (7.5 mmol l^{-1}) for 4 h at 22°C. Thereafter, plants were retrieved and incubations were stopped with 16 μl of PMA (2 mmol l^{-1}) and NH_4^+ released was quantified as described in the previous paragraph.

To determine apoplastically bound urease activity, plants were transferred into glass vials containing 10 ml of 0.1 M KCl. The plants were infiltrated five times for 2 min in a desiccator under reduced pressure (150 mbar), thereafter blotted dry and centrifuged (5 min at 1000 ***g*** and 22°C) to collect the apoplastic solution (Lohaus *et al.*, 2001). Plants were then removed and used for determination of intracellular urease activity. Aliquots of the apoplastic solution (2 ml of 0.1 M KCl solution) were incubated with 1 ml of urea solution (15 mmol l^{-1}) for 4 h and then stopped with 16 μl of PMA (2 mmol l^{-1}). NH_4^+ released was quantified as already described.

The plants were frozen in liquid N, homogenized with a mortar and pestle and a Polytron homogenizer (PT10-35, Kinematica, Luzern, Switzerland) and immediately extracted (1 : 10, weight/volume (w/v)) by addition of 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0 (Goldraij *et al.*, 2003). Samples were centrifuged at 4°C and 10 000*g*. An aliquot (0.5 ml) of supernatant was incubated with 0.5 ml of urea solution (100 mmol l^{-1}) at 22°C for 30 min. Thereafter, samples were stopped with 16 μl of PMA (2 mmol l^{-1}). Urease activity was analysed colorimetrically (Goldraij *et al.*, 2003).

For blank determination in all treatments, aliquots were immediately stopped with PMA, before urea solution was added, and analysed analogously to the samples.

Equilibrium experiment

Triplicate aliquots of tank suspensions (40 ml each) were incubated for 48 h with NH_4Cl (final concentration 100 μmol N l^{-1}), urea (150 μmol N l^{-1}), arginine (150 μmol N l^{-1}), bovine serum albumine (BSA; 150 μmol N l^{-1}), sucrose (10 μmol l^{-1}) or PMA (20 μmol l^{-1}). Controls were left untreated but diluted with an equivalent amount of deionized water. Samples were incubated at room temperature on a horizontal shaker. After 30 min, 90 min, 6 h, 14 h, 23 h and 40 h, aliquots (2 ml) were removed, centrifuged and chemically analysed as described in the next section. Moreover, after 40 h aliquots (1 ml) were taken to determine urease, deaminase and protease activities as described in the next section.

Chemical analyses

Aliquots of tank suspensions, that is solution plus fine litter (15 ml), were centrifuged at 22°C and 10 000 ***g*** for 10 min, and PMA was added to the supernatant to a final concentration of 20 μmol l^{-1} to halt microbial growth and N transformations. The pellet was resuspended in high-purity deionized water (MilliQ) and collected on glass fibre filters (GFFs). The filters were dried and weighed to determine the amount of litter in the tank water.

The supernatants were kept frozen and were brought to Vienna for analysis of the concentrations of N forms ($NH4^+$, NO_3^-, urea, protein and amino acids). Ion concentrations were analysed by ion chromatography (DX 500; Dionex, Vienna, Austria) and conductivity detection. NO_3^- was separated on an anion exchange column (AS11, 250 × 4 mm i.d.; Dionex, Vienna, Austria) after chemical suppression (ASRS-Ultra; Dionex) and linear NaOH gradient elution (0.5 to 37.5 mM within 10 min at a flow rate of 2 ml min^{-1}, with a column temperature of 35°C). NH_4^+ was analysed after separation on a cation exchange column (CS16, 5 × 250 mm i.d.; Dionex; 38°C) by isocratic methane sulphonic acid (16 mM) elution after chemical suppression (CSRS-Ultra; Dionex).

Urea was determined by colorimetric analysis after Kyllingsbaek (1975). As colour reagent, a mixture of diacetyl monoxime potassium nitrate solution, thiosemicarbazide solution and acid solution (HCl and H_3PO_4) was used, which forms a red-coloured product with urea. Colour intensity was measured photometrically at 527 nm.

© The Authors (2007). Journal compilation © *New Phytologist* (2007)

Protein content in tank water was determined by colorimetric analysis using a Bio-Rad dye-binding reagent (Bio-Rad, Vienna, Austria) and BSA as standard (Peterson, 1977). Absorbance was measured at 595 nm.

Individual amino acids were quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC) after precolumn derivatization with phenylisothiocyanate (PITC), separation of the products by reverse-phase chromatography, and detection at 254 nm (Endres & Mercier, 2003). Amino acids in tank water were purified by cation exchange on Dowex 50 W × 8 (50–100 mesh; H^+ form) before analysis.

Extracellular enzyme activities and N transformation processes

Protease activity was determined by colorimetric analysis after Ladd & Butler (1972) using a Bio-Rad dye-binding reagent (as described in the previous section). Absorbance was measured at 700 nm. For calibration, a tyrosine standard solution was used. Urease and arginine deaminase activities were analysed using the methods of Kandeler & Gerber (1988) and Alef & Kleiner (1986), respectively.

Gross N mineralization and gross nitrification rates were measured by ^{15}N pool dilution assays. Duplicate samples (10 ml) of tank suspension were transferred to glass vials and 10 µl of $(^{15}NH_4)_2SO_4$ (125 µmol l^{-1}; 98 at% ^{15}N) was added to measure gross N mineralization rates. The samples were incubated on a shaker for 1 h. Thereafter, 10 ml of 2 M KCl was added to one set of the samples and shaken for 15 min. After centrifugation the supernatants were decanted and 100 µl of PMA (2 mmol l^{-1}) was added to stop the assays. The second set of samples was stopped after 24 h in the same way. Before ^{15}N analysis, NH_4^+ was isolated by microdiffusion into acid traps after addition of 100 mg of MgO over 5 d. The acid traps consisted of two circular ash-free filter papers, each containing 4 µl of 2.5 M $KHSO_4$ and wrapped in Teflon tape. Before isotopic analysis, acid traps were dried, and the filter discs transferred to tin capsules.

Gross nitrification rates were measured with a pool-dilution assay, by adding 10 µl of $K^{15}NO_3$ (250 µmol l^{-1}; 98 at% ^{15}N) to 10 ml of tank suspension. ^{15}N:^{14}N ratios in NO_3^- were analysed according to Russow (1999).

Isotopic analyses

^{15}N enrichment was measured by continuous-flow IRMS using an elemental analyser (EA 1110; CE Instruments, Milan, Italy). The elemental analyser was interfaced via a ConFlo II device (Finnigan MAT, Bremen, Germany) to the gas isotope ratio mass spectrometer (Delta^{PLUS}; Finnigan MAT). High-purity N_2 reference gas was run with each analysis. Reference gas was calibrated to atmospheric N_2 international standards using IAEA-N-1, IAEA-N-2 and IAEA-NO-3 for $\delta^{15}N$. Stable isotope values were calculated as follows:

$$\delta^{15}N\ [‰\ \text{vs at-air}] = (R_{sample}/R_{standard} - 1) \times 1000$$

$$\text{at\% } ^{15}N = \text{moles } ^{15}N/(\text{moles } ^{15}N + \text{moles } ^{14}N)$$

(R, the ratio of ^{15}N:^{14}N for nitrogen isotope abundance.) The standard deviation (SD) of repeated measurements of a working standard was 0.15‰ for $\delta^{15}N$.

Calculations

Rates of gross N mineralization were calculated using the following equation:

$$m = (A_t - A_0)/t \times ((\log_e(APE_0/APE_t))/(\log_e(A_t/A_0)))$$

(m, gross mineralization rate; A_t and A_0, the ammonium concentration at time t (24 h of incubation) and time 0 (1 h of incubation), respectively; t, the difference between time t and 0 (23 h); APE_t and APE_0, the ^{15}N isotopic excess ($APE = \text{at\% } ^{15}N_{sample} - \text{at\% } ^{15}N_{control}$) at time t and time 0, respectively.)

Rates of gross nitrification were calculated using the same equation as for gross N mineralization but substituting nitrate for ammonium. Gross NH_4^+-N immobilization was calculated by subtracting gross nitrification rates from gross NH_4^+ consumption rates (Bengtson *et al.*, 2006).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with STATGRAPHICS PLUS 5.0 (Statistical Graphics Corp., Rockville, MD, USA). For all experiments, differences between two groups were tested by t-test, and differences among three or more groups were analysed by one-way analysis of variance (ANOVA) (multiple range test, least significant difference (LSD) or Tukey's test). Differences between two groups were considered to be significant at $P < 0.05$.

Results

N pools in the tank solutions

Tank solutions of field-grown plants had a slightly acidic pH value (6.14 ± 0.13; mean ± SE). The largest amount of N was found in fine litter fraction suspensions (5.7 ± 0.9 and 10.5 ± 2.1 mmol N l^{-1}, under wet and dry conditions, respectively). Among the dissolved N forms, proteins (which are high-molecular-weight compounds) were present at the highest concentrations (Fig. 1). NH_4^+ was the prevalent low-molecular-weight N compound in tank solutions, under both dry and wet conditions. NO_3^-, amino acid and urea concentrations were significantly lower than that of ammonium ($P < 0.05$; one-way ANOVA, LSD). While no significant change in NH_4^+ concentration was found between the two different conditions ($P > 0.05$; one-way ANOVA, LSD), the

 © The Authors (2007). Journal compilation © *New Phytologist* (2007)

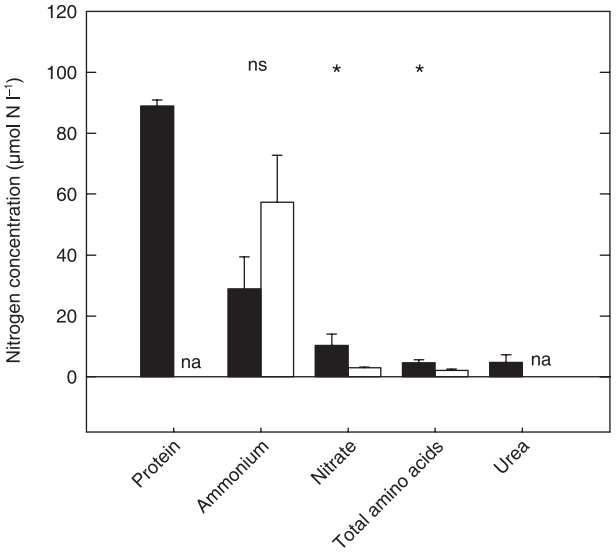


Fig. 1 Concentrations of nitrogen (N) compounds in tank suspensions of *Vriesea gigantea* after rainfall (closed bars) and after a week without rainfall (open bars). Bars represent mean + standard error ($n = 10$). The significance of differences between two conditions was tested by one-way analysis of variance (ANOVA): ns, not significant; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; na, not analysed.

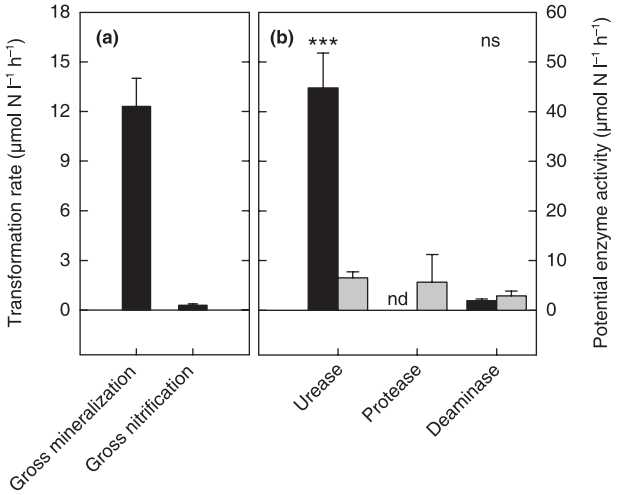


Fig. 2 (a) Gross process rates and (b) potential enzyme activities in tank suspensions of *Vriesea gigantea* after rainfall (black bars) and after a week without rainfall (grey bars). Bars represent mean + standard error ($n = 10$). The significance of differences between two conditions was tested by one-way analysis of variance (ANOVA): ns, not significant; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; nd, not detected.

Table 1 Amino acid concentrations of tank water of *Vriesea gigantea* plants from the Serra do Itapety Natural Park after a rainfall event (wet conditions) and after a few days without rainfall (dry conditions)

	Concentration (µmol N l^{-1})	
Amino acid	Wet conditions	Dry conditions
Serine	1.301 ± 0.309	0.421 ± 0.110
Glycine	0.641 ± 0.242	0.375 ± 0.094
Lysine	0.712 ± 0.151	0.035 ± 0.032
Alanine	0.491 ± 0.094	0.369 ± 0.076
Arginine	0.248 ± 0.008	0.309 ± 0.010
Threonine	0.281 ± 0.052	0.171 ± 0.038
Others	1.383 ± 0.254	1.102 ± 0.205

Values represent mean ± standard error ($n = 10$).
N, nitrogen.

concentrations of NO_3^- and total amino acids showed a significant increase after rainfall ($P < 0.05$; one-way ANOVA, LSD). The main amino acids found in the tank solutions were serine, glycine, lysine, alanine, arginine and threonine, but traces of other amino acids were also detected (Table 1).

N transformation processes

In order to elucidate the transformation of N in the tank, we used two consecutive approaches. First, we measured gross N transformation rates using an isotope dilution approach, which provided an estimate of the overall ammonification or nitrification rates in the tanks. Secondly, to dissect these overall transformation rates into their components, we further measured the potential activities of the enzymes (at substrate saturation) that catalyse the key reactions in these transformations, namely deaminase and urease.

Gross N mineralization rates in tank suspensions (wet conditions) ranged between 5.3 and 20.6 µmol N h^{-1} l^{-1} of tank suspension, while gross nitrification rates were much lower and ranged between 0.01 and 0.7 µmol N l^{-1} h^{-1} (Fig. 2a). We calculated gross NH_4^+ consumption rates to be 11.9 ± 6.7 µmol N l^{-1} h^{-1} (mean ± SD). Potential activities of key enzymes of the N cycle (urease, protease, and arginine deaminase) ranged between 2 and 11 µmol N h^{-1} l^{-1} tank suspension under dry conditions (Fig. 2b). Under wet conditions, only urease activity was significantly increased ($P < 0.001$; one-way ANOVA, LSD). Enzyme activities were associated with litter, as removal of the litter by filtration resulted in activities below the detection limit (data not shown).

We further conducted an experiment designed to elucidate the equilibrium conditions of the different N fractions in the tank solution. For this 'equilibrium experiment', various N and carbon (C) substrates or a microbicide were added to the tank suspensions and changes in the concentrations of NH_4^+ (Fig. 3a), NO_3^- (data not shown) and total amino acid contents (Fig. 3b) were monitored. A constant and significant increase of NH_4^+ concentration was found when arginine

© The Authors (2007). Journal compilation © *New Phytologist* (2007)

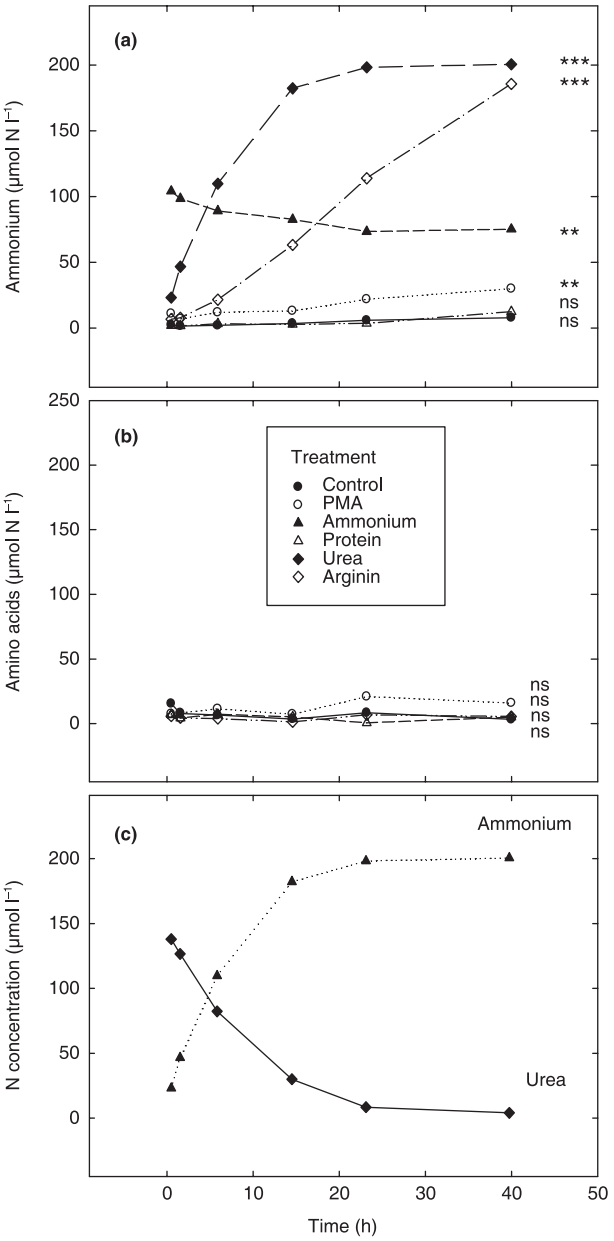


Fig. 3 Equilibrium experiment: tank suspensions of *Vriesea gigantea* were incubated with various nitrogen (N) substrates for up to 40 h (for concentrations of substrates, see the Materials and Methods section). Symbols represent means of three replicates. The significance of differences was tested by one-way analysis of variance (ANOVA): ns, not significant; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. Concentrations of (a) ammonium and (b) total amino acids are presented. The accumulation of ammonium closely followed the breakdown of urea (c).

was added (Fig. 3a), while arginine itself was immediately immobilized, presumably by the microbes present in the tank (Fig. 3b). When urea was supplied, an even faster increase in NH_4^+ was detected, together with a concomitant decrease of urea (Fig. 3c). This was consistent with high urease activities found in the phytotelmata (Fig. 2b). When NH_4^+ was added (100 µmol l^{-1}), the NH_4^+ pool reached an equilibrium concentration of ~75 µmol l^{-1}. A slight but significant increase of NH_4^+ concentration was observed after adding PMA ($P < 0.01$; one-way ANOVA). The other treatments (sucrose, control, and protein) did not result in significant changes of NH_4^+ concentration over a 40-h period (Fig. 3a). In contrast to NH_4^+, concentrations of NO_3^- (data not shown) and total amino acids (Fig. 3b) did not show any significant change with any treatment during the 40-h period ($P > 0.05$; one-way ANOVA). Interestingly, only 30 min after adding arginine at a concentration of 150 µmol l^{-1}, arginine concentrations had returned to control values, suggesting rapid microbial immobilization of this amino acid. Phosphate concentrations did not change significantly; only the PMA treatment exhibited significant increases in the inorganic P pool (data not shown). Enzyme activities (protease, urease, and arginine deaminase) were not significantly affected by any of the additions (data not shown).

Plants held under sterile conditions exhibited considerable urease activity, which was mainly intracellularly located (10.64 ± 0.19 mmol g^{-1} fresh weight (FW) h^{-1}; data not shown). However, ureases were also released into the tanks by the plants, as low urease activities were observed in the free incubation solution (11.87 ± 3.41 µmol l^{-1} h^{-1}; data not shown). Urease activities bound to the plant surface and in the apoplast were below detection limits (data not shown).

^{15}N uptake kinetics

Plants from the field were able to take up any form of ^{15}N-labelled nitrogen that we tested, but showed a marked preference for NH_4^+ (Fig. 4a; $P < 0.05$; one-way ANOVA, LSD). On a dry matter basis, $^{15}NH_4^+$ uptake rates at 25 µM were 10-fold higher in *in vitro* grown plants (Fig. 4b) compared with plants collected at the Serra do Itapety Natural Park (Fig. 4a). All other uptake rates were similar for plants grown in *in vitro* culture and in the field (data not shown). Foliar N uptake of *in vitro* grown plants of *V. gigantea* followed Michaelis–Menten type kinetics (Fig. 4b), except in the case of urea, which exhibited first-order kinetics (a linear relationship), up to the highest urea concentration tested (10 mM; Fig. 4c). Michaelis-Menten constant (K_m) values ranged between 11 and 53 µM for all N forms (Table 2). Maximum uptake velocity (V_{max}) values were *c.* 0.1–0.2 µmol h^{-1} g^{-1} dry weight (DW) for amino acids and NO_3^- and close to 30 µmol h^{-1} g^{-1} DW for NH_4^+. Thus, the catalytic efficiency for NH_4^+ uptake was 65-fold higher compared with the other N forms.

We tested two potential inhibitors of urea uptake, CCCP (an ATPase inhibtor) and HgCl (an aquaporin blocker), which resulted in inhibitions of urea uptake of 52 and 78%, respectively, compared with control samples (0.14 ± 0.005 µmol ^{15}N l^{-1} h^{-1}).

 © The Authors (2007). Journal compilation © *New Phytologist* (2007)

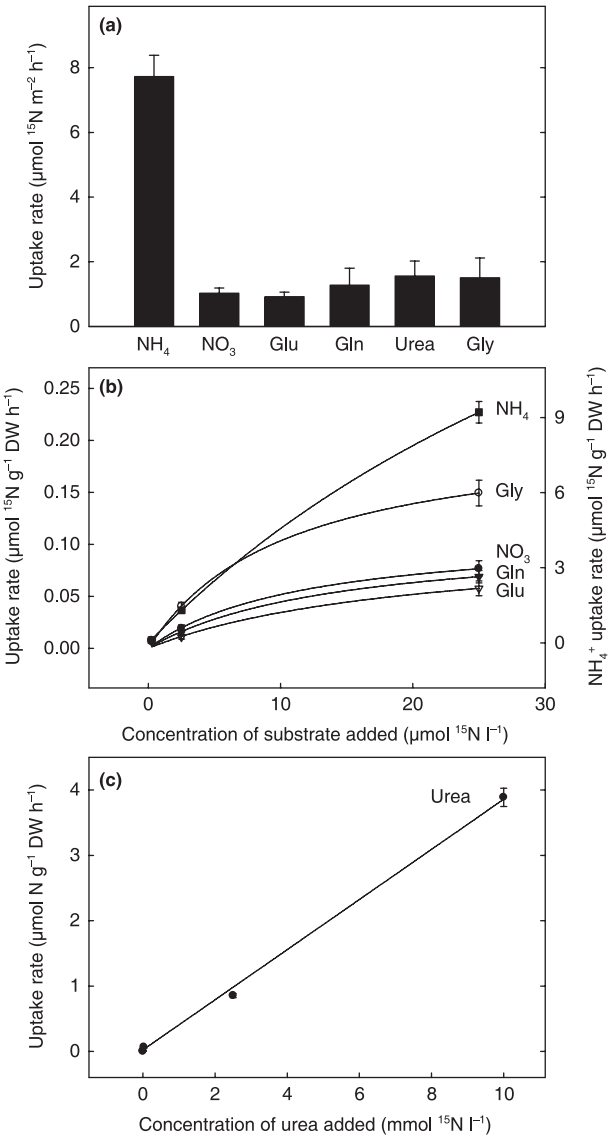


Fig. 4 Foliar ^{15}N uptake rates of field-grown *Vriesea gigantea* plants (a) and uptake kinetics of *in vitro* grown plants (b, c). (a) NH_4^+ uptake rates differed significantly from the uptake rates of all other nitrogen (N) forms at a concentration of 25 µM ^{15}N (one-way analysis of variance (ANOVA), least significant difference (LSD) test; $P < 0.05$). Bars represent mean + standard error (SE) ($n = 6$). (b) Foliar N uptake kinetics for all N forms except urea followed Michaelis–Menten kinetics (for details, see Table 2). Note the different scale for NH_4^+ uptake rates. Symbols represent mean ± SE ($n = 5$). (c) Urea uptake was linear up to 10 mM ($R^2 = 0.99$; $P < 0.0001$). Symbols represent mean ± SE ($n = 5$). DW, dry weight; Gln, glutamine; Glu, glutamic acid; Gly, glycine.

To compare the various results for N pools (Fig. 1), gross N transformation rates (Fig. 2a), potential enzyme activities (Fig. 2b), and foliar N uptake rates (Fig. 4), the data were re-calculated for an average-sized plant (140 cm in diameter, 21 leaves, and 0.6-l tank volume) and are presented in an overview figure (Fig. 5).

Discussion

Epiphytic tank bromeliads cope with water and nutrient deficiency (Nadkarni & Primack, 1989; Benzing, 2000; Reich *et al.*, 2003) by efficiently trapping rainwater, throughfall and litter within their phytotelmata. With regard to N nutrition, trapped litter is thought to be a major and constant source of organic N, while urea or uric acid may represent high but only occasional N inputs. To date, however, the extent to which the different forms of N can be used by *V. gigantea* to meet its demand for growth and maintenance remains unexplored.

Here we demonstrate that *V. gigantea* is able to take up by its leaves all reactive N forms present in the tank. This is similar to the situation in roots of terrestrial plants, which have also been shown to be able to take up all N forms (von Wiren *et al.*, 2000). However, *V. gigantea* showed considerable differences in N uptake preferences, with a distinct preference for ammonium. The calculated K_m value for NH_4^+ was in the range reported for roots of terrestrial plants (von Wiren *et al.*, 2000) and was found to be in the same range as NH_4^+ concentrations in the tanks. This was also true for all other N forms tested (Table 2, Fig. 1). The V_{max} for NH_4^+ was much higher than for other N forms (Table 2), indicating that *V. gigantea* had a greater uptake capacity for NH_4^+ uptake than for other N forms. Consequently, the catalytic efficiency for NH_4^+ uptake far exceeded the uptake of other N forms from the tank. By contrast, NO_3^-, a major N form in terrestrial plant N nutrition, seems to play a minor role in the N nutrition of *V. gigantea* (Fig. 5), as indicated by low uptake rates (Fig. 4a), low NO_3^- concentrations (Fig. 1) and negligible gross nitrification rates in the tanks (Fig. 2a).

It has been shown previously that epiphytic tank bromeliads accumulate the highest biomass when raised on organic N, such as urea (Mercier *et al.*, 1997; Nievola *et al.*, 2001b) or amino acids (Benzing, 1970). Our data suggest, however, that mechanisms other than direct N uptake must be responsible for the observed growth enhancement. The low uptake rates for amino acids (Fig. 4a, Table 2) were rather surprising, considering the large reservoir of protein N in suspended fine litter and in free tank solution and the high protease activities found in the tanks (Figs 1, 5). While this indicates high rates of protein breakdown and high amino acid production, we also found high activities of microbial deaminase activities, in accordance with high gross N mineralization rates (Fig. 2a). This explains the high NH_4^+ but low amino acid concentrations in the tank solutions and further emphasizes the importance of NH_4^+ in the N nutrition of *V. gigantea*. The data also demonstrate the importance of microbial N transformation processes in controlling the availability of the different reactive N pools in the tanks. Microorganisms in the tank immobilized amino acids very efficiently: after only 30 min, for example, added arginine was immobilized to undetectable levels (Fig. 3b). Moreover, during the following

Table 2 ^{15}N uptake kinetics of *Vriesea gigantea* leaves

	V_{max}	K_m	V_{max}/K_m	R^2	P
Ammonium	28.64 ± 1.50	52.69 ± 4.04	0.544	0.99	0.003
Nitrate	0.11 ± 0.02	11.79 ± 4.83	0.01	0.99	0.048
Glycine	0.21 ± 0.01	10.53 ± 1.40	0.02	0.99	0.016
Glutamine	0.10 ± 0.03	14.33 ± 10.24	0.008	0.99	0.075
Glutamic acid	0.10 ± 0.05	20.27 ± 20.01	0.005	0.98	0.079
Urea	NA	NA	NA	0.99	< 0.0001

In vitro grown *Vriesea gigantea* plants were incubated with different nitrogen (N) substrates (99 at% ^{15}N) at concentrations of 0.25, 2.5 and 25 μmol ^{15}N l^{-1}. Equations of regression analysis (see Fig. 4) conforming to Michaelis–Menten kinetics ($f = ax(b + x)^{-1}$), except for urea which showed a linear relationship ($f = y + ax$), are given. Maximum uptake velocity (V_{max}; μmol ^{15}N l^{-1} g^{-1} dry weight h^{-1}), Michaelis-Menten constant (K_m) (μM) and catalytic efficiencies (V_{max}/K_m) are given for each nitrogenous substrate.
Values represent mean ± standard error ($n = 5$).
NA, not applicable for urea (linear up to a substrate concentration of 10 mM).

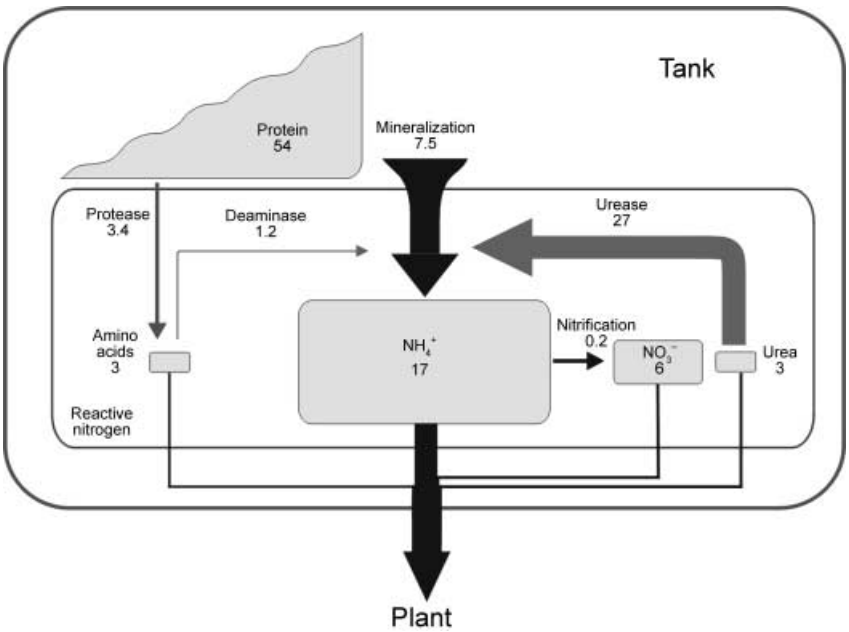


Fig. 5 Schematic compilation of nitrogen (N) pools, enzyme activities, gross N transformation rates and foliar uptake rates in tanks of *Vriesea gigantea*. N forms are given in μmol N per plant, while plant N uptake rates, enzyme activities and gross N mineralization and gross nitrification are presented in μmol N h^{-1} per plant. Values given reflect average conditions of mature *V. gigantea* plants at the Serra do Itapety Natural Park (140 cm in diameter; 21 leaves). The respective tank volume (0.6 l) was calculated according to Zotz & Thomas (1999). Size and thickness of symbols and arrows reflect the proportional differences in pools and rates found.

40 h NH_4^+ was slowly but continuously released to the tank suspension in the experiment treatment (Fig. 3a). Thus, microorganisms may not have been strongly N limited, as they released NH_4^+, but may have been rather limited by C. Although inputs of organic C into the tanks may occur via throughfall (Tukey, 1966) or by leaching from trapped litter, this may not be sufficient to meet microbial growth demands. Furthermore, unlike the root–soil interface (rhizosphere), where roots often release diverse C-containing exudates to the soil (Grayston *et al.*, 1997) and sustain a diverse microbial community, it is unlikely that leaves of tank bromeliads release a similar amount of C-containing substances into the tanks. Therefore, microorganisms may prefer organic N forms for their nutrition, as organic N forms also provide significant C. However, microorganisms in the tanks seemed to actively compete for NH_4^+ as well. This was indicated by the high rates of gross NH_4^+ consumption and gross NH_4^+ immobilization, which comprised 92.9 and 90% of gross N mineralization rates, respectively. The largest fraction of NH_4^+ released from microbes would therefore be immobilized by (other) tank microorganisms, clearly indicating that a diverse microbial community exists in this habitat. Similar to amino acids, urea concentrations in the tanks were found to be low. Taken alone, this would indicate urea to be of secondary importance for the N nutrition of the plant. In contrast to all other N forms, urea uptake by *V. gigantea* did not follow Michaelis–Menten type kinetics but was linear up to a concentration of 10 mM. This was rather surprising as we also found that urea

 © The Authors (2007). Journal compilation © *New Phytologist* (2007)

uptake was ATP-dependent (inhibited by CCCP, a known inhibitor of ATP-dependent transport across cellular plasma membranes; Dahlman *et al.*, 2004). We could also demonstrate that urea was taken up via channels, that is, aquaporins, as the uptake of urea was effectively inhibited by low concentrations of HgCl, which is known to effectively block aquaporins (Gerbeau *et al.*, 1999). In both cases, however, we would expect saturable uptake kinetics, suggesting that the V_{max} of urea uptake may have been at much higher concentrations than tested in our experiment (10 mM). Such an uptake pattern may be beneficial for *V. gigantea*, considering that the source of urea or uric acid in the tank is excretions of tank-inhabiting animals (e.g. insects or amphibians), as those excretions occur infrequently but lead to high concentrations of these N species. A high uptake capacity at high concentrations may therefore ensure that N input by urea and uric acid can be used efficiently by *V. gigantea* and may possibly constitute a significant but variable component of the overall N nutrition of these plants. We also found high potential urease activities in the tanks (Fig. 2b). When urea was added to the tanks of *V. gigantea* plants (equilibrium experiment), this pool was hydrolysed to NH_4^+ rapidly (within a few hours; Fig. 3c). At low concentrations, urea in the tanks is therefore likely to be largely hydrolysed to NH_4^+ before plants may take up significant amounts in intact form. While it is well known that microbes release ureases, we also found strong evidence that the plants themselves released these enzymes, as we found considerable urease activities in external solutions of sterile, *in vitro* grown plants which were in the same order of magnitude as the activities observed in tanks *in situ* (Fig. 2b). This indicates that *V. gigantea* plants are at least partially responsible for the high potential for urea hydrolysis, suggesting that it may be beneficial for the plants to hydrolyse urea by releasing ureases into the tanks and subsequently utilizing the released NH_4^+ instead of taking up urea directly at low concentrations. At high urea concentrations, however, *V. gigantea* had sufficiently effective urea uptake systems for direct uptake.

Figure 5 presents a compilation of the interrelationships of the different tank N pools and the transformation processes between those pools, as well as the uptake of the different available N forms by *V. gigantea*. It clearly demonstrates that protein constitutes the predominant N pool within the tank, fuelling the production of amino acids, which are then mineralized to ammonium. Ammonium is also the largest plant-available N pool, which is most effectively accessed by *V. gigantea*. The high gross mineralization rates and very high potential urease activities further demonstrate the central role of ammonium within the tank.

Overall, NH_4^+ was found to be the most important N form for the N nutrition of *V. gigantea*. The NH_4^+ pool was found to be not only the largest N pool available for foliar N uptake, but also the N pool that was replenished at the fastest rates, by direct inputs through rain and throughfall and the mineralization of organic N compounds, such as amino acids and urea. However, urea may also be a significant N source for *V. gigantea*, as ureases released into the tanks accelerate urea hydrolysis, thereby enabling the efficient utilization of released NH_4^+ at low urea concentrations and, as urea may be taken up directly when released to the tanks by animals at high concentrations.

Acknowledgements

EI wishes to thank the University of Vienna for a grant for the Fellowship for Brief Scientific Stays Abroad.

References

Alef K, Kleiner D. 1986. Arginine ammonification, a simple method to estimate microbial activity potentials in soils. *Soil Biology and Biochemistry* **18**: 233–235.

Bengtson P, Falkengren-Grerup U, Bengtsson G. 2006. Spatial distributions of plants and gross N transformation rates in a forest soil. *Journal of Ecology* **94**: 754–764.

Benzing DH. 1970. Availability of exogenously supplied nitrogen to seedlings of the Bromeliaceae. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **97**: 154–159.

Benzing DH. 1998. Vulnerabilities of tropical forests to climate change: The significance of resident epiphytes. *Climatic Change* **39**: 519–540.

Benzing DH, ed. 2000. *Bromeliaceae*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Benzing DH. 1986. Foliar specialization for animal-assisted nutrition in Bromeliaceae. In: Southwood T, ed. *Insects and the plant surface*. London, UK: Arnold, 235–256.

Benzing DH, Renfrow A. 1974. The mineral nutrition of Bromeliaceae. *Botanical Gazette* **135**: 281–288.

Brighigna L, Montanini P, Favilli F, Trejo AC. 1992. Role of the nitrogen-fixing bacterial microflora in the epiphytism of Tillandsia (Bromeliaceae). *American Journal of Botany* **79**: 723–727.

Bruijnzeel LA. 2001. Hydrology of tropical montane cloud forests: a reassessment. *Land Use and Water Resources Research* **1**: 1–18.

Coxson DS, Nadkarni NM. 1995. Ecological roles of epiphytes in nutrient cycles of forest ecosystems. In: Nadkarni NM, ed. *Forest canopies*. San Diego, CA, USA: Academic Press, 495–543.

Dahlman L, Persson J, Palmqvist K, Näsholm T. 2004. Organic and inorganic nitrogen uptake in lichens. *Planta* **219**: 459–467.

Endres L, Mercier H. 2001. Influence of nitrogen forms on the growth and nitrogen metabolism of bromeliads. *Journal of Plant Nutrition* **24**: 29–42.

Endres L, Mercier H. 2003. Amino acid uptake and profile in bromeliads with different habits cultivated in vitro. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**: 181–187.

Gentry AH, Dodson C. 1987. Contribution of non-trees to species richness of a tropical rain forest. *Biotropica* **19**: 149–156.

Gerbeau P, Guclu J, Ripoche P, Maurel C. 1999. Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes. *Plant Journal* **18**: 577–587.

Goldraij A, Beamer LJ, Polacco JC. 2003. Interallelic complementation at the ubiquitous urease coding locus of soybean. *Plant Physiology* **132**: 1801–1810.

Grayston SJ, Vaughan D, Jones D. 1997. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: The importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Applied Soil Ecology* **5**: 29–56.

Kandeler E, Gerber H. 1988. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biology and Fertility of Soils* **6**: 68–72.

Knudson LA. 1946. New nutrient solution for germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin* **15**: 214–217.

Kyllingsbaek A. 1975. Extraction and colorimetric determination of urea in plants. *Acta Agriculturae Scandinavica* **25**: 109–112.

Ladd JN, Butler JHA. 1972. Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivates as substrates. *Soil Biology and Biochemistry* **4**: 19–30.

Laube S, Zotz G. 2003. Which abiotic factors limit vegetative growth in a vascular epiphyte? *Functional Ecology* **17**: 598–604.

Lohaus G, Pennewiss K, Sattelmacher B, Hussmann M, Muehling KH. 2001. Is the infiltration-centrifugation technique appropriate for the isolation of apoplastic fluid? A critical evaluation with different plant species. *Physiologia Plantarum* **111**: 457–465.

Mercier H, Kerbauy GB, Sotta B, Miginiac E. 1997. Effects of NO_3^-, NH_4^+ and urea nutrition on endogenous levels of IAA and four cytokinins in two epiphytic bromeliads. *Plant, Cell & Environment* **20**: 387–392.

Mopper K, Zika RG. 1987. Free amino acids in marine rains: evidence for oxidation and potential role in nitrogen cycling. *Nature* **325**: 246–249.

Mulvaney RL, Bremner JM. 1979. Modified diacetyl monoxime method for colorimetric determination of urea in soil extracts. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **10**: 1163–1170.

Nadkarni NM, Primack RB. 1989. The use of gamma spectrometry to measure within-plant nutrient allocation of a tank bromeliad, Guzmania lingulata. *Selbyana* **11**: 22–25.

Nievola CC, Mercier H, Majerowicz N. 2001a. Levels of nitrogen assimilation in bromeliads with different growth habits. *Journal of Plant Nutrition* **24**: 1387–1398.

Nievola CC, Mercier H, Majerowicz N. 2001b. Urea – a possible source of organic nitrogen for tank bromeliads. *Bromelia* **6**: 1–4.

Peterson GL. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry* **83**: 346–356.

Reich A, Ewel JJ, Nadkarni NM, Dawson T, Evans RD. 2003. Nitrogen isotope ratios shift with plant size in tropical bromeliads. *Oecologia* **137**: 587–590.

Richardson BA. 1999. The bromeliad microcosm and the assessment of faunal diversity in a neotropical forest. *Biotropica* **31**: 321–336.

Russow R. 1999. Determination of N-15 in N-15-enriched nitrite and nitrate in aqueous samples by reaction continuous-flow quadrupole mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **13**: 1334–1338.

Stewart GR, Schmidt S, Handley LL, Turnbull MH, Erskine PD, Joly CA. 1995. ^{15}N natural abundance of vascular rainforest epiphytes: implications for nitrogen source and acquisition. *Plant, Cell & Environment* **18**: 85–90.

Sugden AM, Robins RJ. 1979. Aspects of the ecology of vascular epiphytes in Colombian cloud forests. I. The distribution of the epiphytic flora. *Biotropica* **11**: 173–188.

Timberley MH, Vigor-Brown RJ, Kawashima M, Ishagami M. 1985. Organic nitrogen compounds in atmospheric precipitation: their chemistry and availability to phytoplankton. *Canadian Journal of Fish and Aquatic Sciences* **42**: 1171–1177.

Tukey HBJ. 1966. Leaching of metabolites from above-ground plant parts and its implications. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **93**: 385–401.

Veloso HP, Rangel Filho ALR, Lima JCA. 1991. *Classificacao da vegetacao brasileira, adaptada a um sistema universal.* Rio de Janeiro, Brazil: Fundacao Instituto Brasileiro de Geografia e Estatistica.

von Wiren N, Gazzarrini S, Gojon A, Frommer WB. 2000. The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 254–261.

Yanoviak SP, Nadkarni NM, Gering JC. 2003. Arthropods in epiphytes: a diversity component that is not effectively sampled by canopy fogging. *Biodiversity and Conservation* **12**: 731–741.

Zotz G, Thomas V. 1999. How much water is in the tank? Model calculations for two epiphytic bromeliads. *Annals of Botany* **83**: 183–192.

About *New Phytologist*

- *New Phytologist* is owned by a non-profit-making **charitable trust** dedicated to the promotion of plant science, facilitating projects from symposia to open access for our Tansley reviews. Complete information is available at **www.newphytologist.org**.
- Regular papers, Letters, Research reviews, Rapid reports and both Modelling/Theory and Methods papers are encouraged. We are committed to rapid processing, from online submission through to publication 'as-ready' via *OnlineEarly* – our average submission to decision time is just 30 days. Online-only colour is **free**, and essential print colour costs will be met if necessary. We also provide 25 offprints as well as a PDF for each article.
- For online summaries and ToC alerts, go to the website and click on 'Journal online'. You can take out a **personal subscription** to the journal for a fraction of the institutional price. Rates start at £131 in Europe/$244 in the USA & Canada for the online edition (click on 'Subscribe' at the website).
- If you have any questions, do get in touch with Central Office (**newphytol@lancaster.ac.uk**; tel +44 1524 594691) or, for a local contact in North America, the US Office (**newphytol@ornl.gov**; tel +1 865 576 5261).

 © The Authors (2007). Journal compilation © *New Phytologist* (2007)

Physiologia Plantarum
An International Journal for Plant Biology

Physiologia Plantarum 136: 86–93. 2009
Copyright © Physiologia Plantarum 2009, ISSN 0031-9317

Detection of urease in the cell wall and membranes from leaf tissues of bromeliad species

Camila Aguetoni Cambuí[a], Marília Gaspar[b] and Helenice Mercier[a,*]

[a]Department of Botany, Institute of Biosciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil
[b]Department of Plant Physiology and Biochemistry, Institute of Botany, São Paulo, SP, Brazil

Correspondence
*Corresponding author,
e-mail: hmercier@usp.br

Received 2 June 2008; revised 26 January 2009

doi: 10.1111/j.1399-3054.2009.01217.x

Urea is an important nitrogen source for some bromeliad species, and in nature it is derived from the excretion of amphibians, which visit or live inside the tank water. Its assimilation is dependent on the hydrolysis by urease (EC: 3.5.1.5), and although this enzyme has been extensively studied to date, little information is available about its cellular location. In higher plants, this enzyme is considered to be present in the cytoplasm. However, there is evidence that urease is secreted by the bromeliad *Vriesea gigantea*, implying that this enzyme is at least temporarily located in the plasmatic membrane and cell wall. In this article, urease activity was measured in different cell fractions using leaf tissues of two bromeliad species: the tank bromeliad *V. gigantea* and the terrestrial bromeliad *Ananas comosus* (L.) Merr. In both species, urease was present in the cell wall and membrane fractions, besides the cytoplasm. Moreover, a considerable difference was observed between the species: while *V. gigantea* had 40% of the urease activity detected in the membranes and cell wall fractions, less than 20% were found in the same fractions in *A. comosus*. The high proportion of urease found in cell wall and membranes in *V. gigantea* was also investigated by cytochemical detection and immunoreaction assay. Both approaches confirmed the enzymatic assay. We suggest this physiological characteristic allows tank bromeliads to survive in a nitrogen-limited environment, utilizing urea rapidly and efficiently and competing successfully for this nitrogen source against microorganisms that live in the tank water.

Introduction

Urease (EC 3.5.1.5) catalyzes the hydrolysis of urea to ammonium and carbon dioxide. Present in many plants, bacteria, fungi and algae, urease plays an important role in the overall metabolism of nitrogen in nature. Primarily, this enzyme allows organisms to utilize urea, externally or internally derived, to generate ammonium as a nitrogen source for growth (Mobley and Hausinger 1989; Mobley et al. 1995). Two isoenzymes have been identified in plants: the embryo-specific urease, an abundant seed protein in many plant species (Bailey and Boulter 1971; Polacco and Holland 1993; Zonia et al. 1995) and the ubiquitous urease, found in lower amounts in all plant tissues (Hogan et al. 1983; Polacco and Holland 1993). Although this enzyme was the first one to be crystallized (Sumner 1926) and, since then, intensively studied, too little information is available about its subcelullar location.

Abbreviations – BSA, bovine serum albumin; DTT, dithiothreitol; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; FW, fresh weight; IgG, immunoglobulin; NADH, nicotinamide adenine dinucleotide; PVP, polyvinilpyrrolidone; Tris, trishydroxymethylaminomethane.

In plants, urease is usually considered to be a cytoplasmic enzyme. In fact, urease activities are generally measured by using the soluble fraction of cells. However, although there are few data in the literature about the localization of this enzyme, the existing information is rather controversial. The first attempt to suggest the localization of urease in plants was made by Murray and Knox (1977). Using immunofluorescence technique, they showed that urease was associated with both small granules in the cytoplasm and in the intracellular spaces of parenchyma cells of *Canavalia ensiformis*. But these results were contradictory to the findings of Faye et al. (1986), who demonstrated that seed urease in *C. ensiformis* is a cytosolic protein, based on immunocytochemical approach.

This contradiction is also found in the studies of bacterial urease. For example, urease was associated with membrane and periplasm in *Proteus mirabilis* and in a ruminal *Staphylococus* species (McLean et al. 1985; McLean et al. 1986). Later these results were contested taking into account the technique employed by McLean and co-workers. However, there seems to be a general agreement that, at least in *Helicobacter pylori*, urease has a cell surface location. In this species, most of the urease activity (53–80%) was recovered by simply washing the cells with deionized water (Dunn et al. 1990). Moreover, approximately 90% of the whole-cell activity was recovered by extraction with the detergent n-octylglucoside at a concentration of 1% (Evans et al. 1991).

In addition, since 1986 the ability of some lichen species to secrete urease has been shown when they were floated in liquid medium containing urea (Legaz et al. 1986; Pérez-Urria and Vicente 1989; Pérez-Urria et al. 1989). These findings initially suggested a transient location of urease in isolated algal cell walls (Legaz and Vicente 1989) that was later confirmed with both indirect and direct probes. Molina and collaborators (1993), for instance, suggested the constant presence of urease in algal cell walls by using ferritin-labeled lectin, which was able to bind to the polygalactoside moiety of urease. Millanes and collaborators (2004) showed that urease was located in the cell wall using both the cytochemical detection of this enzyme and also by measuring its activity directly in the different cell fractions.

Recently, the ability to secrete urease has also been demonstrated in a vascular plant species, the tank bromeliad *Vriesea gigantea*, when urea was present in the tank water of plants growing in aseptic condition (Inselsbacher et al. 2007). This indicated the existence of at least a transient location of this enzyme in the plasma membrane and cell wall. Moreover, previous work showed the great preference of this species for urea as nitrogen (N) source for growth (Endres and Mercier 2001). In natural conditions, urea is mainly derived from excretions of amphibians that visit or live inside the tank, and its assimilation is partly dependent on urease activity. Thus, this plant species seems to be a good biological material for studying the processes involved in urea utilization, including urease activity and its subcellular location. In this study, we quantified the urease activity in distinct cell fractions (cytoplasm, cell wall and membranes) of bromeliad leaf tissues, comparing species with different growth habitats and nitrogen preference. We hypothesized that the presence of urease in cell wall and membranes would be higher in the tissues of plants, which preferentially use urea as nitrogen source, like tank bromeliads, in comparison to species with preference for inorganic nitrogen sources, like terrestrial bromeliads. To test this hypothesis, we used two species of bromeliads: the epiphytic tank bromeliad *V. gigantea* and the terrestrial bromeliad *Ananas comosus*. As a control, it was used the leguminous species *Phaseolus vulgaris*. For all species, urease localization was investigated by enzymatic and immunoreaction assays of the protein pool extracted from cell wall, cytoplasm and membrane fractions. Moreover, cytochemical detection of this enzyme was also investigated in *V. gigantea* leaf tissues.

Materials and methods

Chemicals

Anti-mouse IgG conjugated to peroxidase, *C. ensiformis* purified urease, diaminobenzidine, dithiothreitol (DTT), formaldehyde, glutaraldehyde, malate dehydrogenase, nitrocellulose membrane, osmium tetroxide, polyvinil-pyrrolidone (PVP) and triton X-100 were purchased from Sigma (St Louis, MO). Ammonium sulfide was purchased from Riedel - de Haën (Hanover, Germany). Spurr Resin was purchased from Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA). Uranile acetate was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The remaining chemicals were of analytical grade. Monoclonal anti-urease antibody utilized was purchased from Sigma. The antibody was produced in mouse using purified *C. ensiformis* urease as immunogen. Its specificity has been tested by Sigma and no cross-reactivity is observed with urease derived from *Bacillus pasteurii*.

Plant material

The experiments were conducted with two bromeliad species, the terrestrial *A. comosus* (L.) Merr. and the

epiphytic tank bromeliad *V. gigantea* (Gaudich.). The Leguminosae species *P. vulgaris* (L.) was used as a positive control, due to its plant phylogenetic proximity to *C. ensiformis*, the unique plant species studied about the cellular location of urease until now (both belong to the tribe Phaseoleae). *A. comosus* plants were obtained by *in vitro* vegetative multiplication using the Murashige and Skoog medium (1962) with addition of 0.5 mg l^{-1} of piridoxin-HCl and nicotinic acid, 4.0 mg l^{-1} of glycine, 100 mg l^{-1} of inositol and 0.5 mg l^{-1} of naphthaleneacetic acid and benzylaminopurine. *V. gigantea* plants were obtained from seeds grown in *in vitro* conditions and cultivated in a culture medium containing the macronutrients of Knudson (1946) and micronutrients of Murashige and Skoog (1962) formulation. The *in vitro* culture strategy was chosen due to the facility to control the quality and concentration of nitrogen sources. The absence of microorganisms assured that no microbial N transformation occurred during the experiment, and also that no interference in plant metabolism happened. Moreover, the culture medium created a film of nutrients around the leaves, resulting in a permanent availability of nutrients to the leaves. *P. vulgaris* plants were obtained from seeds cultivated in vermiculite substrate during 3 weeks, having no cotyledon reserves anymore and with secondary leaves already expanded. All plants were grown in a photoperiod of 14 h, with a light intensity of 50 μmol photons m^{-2} s^{-1} supplied by cool white fluorescent tubes (Philips), and an average temperature of $25 \pm 2°C$.

Prior to the experiment, plants were N starved for 2 weeks in order to deplete part of the endogenous N reserves of the plants. After this period plants were cultivated in the presence of 5 m*M* urea and 10 μ*M* of nickel, which were added in the culture medium (in the case of bromeliads) or sprayed on the leaves (*P. vulgaris*) 2 days before harvesting. The leaf tissues of 15 plants from the three species were collected and used for urease activity quantification and Dot Western immunoblotting detection in different cell compartments. *V. gigantea* leaves were also used for cytochemical detection of urease. Two independent experiments were performed.

Analysis of urease activity in cellular fractions

Plant leaves were homogenized with a mortar and pestle using liquid nitrogen and four volumes (v/w) of extraction buffer (0.1 *M* potassium phosphate pH 7.5 containing 2 m*M* DTT, 1% PVP and 0.1% albumin). Samples were centrifuged (4°C, 10 000 *g*) for 15 min, and the supernatant was collected and kept in ice. The pellet was washed twice with extraction buffer, centrifuged and the supernatant discarded. Three volumes of extraction buffer were added to the pellet and 1 *M* NaCl or 1% triton X-100 was added in order to extract cell wall proteins (CW) or membranes proteins, respectively. The samples were kept in ice for 30 min, then centrifuged (4°C, 10 000 *g*) for 15 min, and the supernatant was collected. The samples were desalted using a Sephadex G-25 column and the resulting extract was used for the urease assay. Aliquots of 0.5 ml of extract were incubated with 200 m*M* urea in 0.1 *M* potassium phosphate buffer (pH 7.5) at 30°C for 40 min. Aliquots of 0.1 ml were used to quantify the ammonium produced in the reaction, using the phenol-hypochlorite method (Weatherburn, 1967).

Analysis of PEPCase activity in cellular fractions

In order to estimate cytoplasmic contamination, the activity of the marker enzyme phosphoenol pyruvate carboxylase (PEPCase; the key enzyme in CO_2 assimilation path way in C_4 and CAM plants) was quantified in the different cell fractions of the three species analyzed. Extraction and assay of PEPCase (EC 4.1.1.31) were based on the method described by Leport et al. (1996) with modifications. Plant leaves were homogenized with a mortar and pestle using liquid nitrogen and four volumes (v/w) of extraction buffer (0.2 M Tris-HCl pH 8.0 containing 10 m*M* $MgCl_2$, 5 m*M* DTT, 1 m*M* ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 10% glycerol and 0.5% albumin). Samples were centrifuged (4°C, 10 000 *g*) for 15 min, and the supernatant was collected and kept in ice. The pellet was washed twice with extraction buffer, centrifuged and the supernatant discarded. Three volumes of extraction buffer were added to the pellet and 1 *M* NaCl or 1% triton X-100 was added in order to extract cell wall proteins or membranes proteins, respectively. The samples were kept in ice for 30 min, and then centrifuged (4°C, 10 000 *g*) for 15 min, and the supernatant was collected. The samples were desalted using a Sephadex G-25 column and the resulting extract was used for the PEPCase assay. Aliquots of 0.4 ml of extract were assayed in a reaction buffer containing 50 m*M* Tris-HCl pH 8.0, 10 m*M* $MgCl_2$, 1 m*M* DTT, 2 m*M* phosphoenolpyruvate, 10 units of malate dehydrogenase, 0.2 m*M* nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and 10 m*M* $NaHCO_3$. The consumption of NADH was measured in a spectrophotometer at 340 nm.

Cytochemical detection of urease

Leaf sections of 1 mm were initially fixed in 2% formaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in phosphate

buffer 0.1 *M* (pH 7.5). The tissues were washed with phosphate buffer and incubated with 100 m*M* urea and 10 m*M* $CoCl_2$ in phosphate buffer at 30°C for 40 min. The control was prepared incubating tissues without urea. After incubation, leaf sections were washed abundantly in distilled water and treated with $(NH_4^+)_2S$ for 30 s at room temperature. After that, the tissues were washed anew with distilled water and incubated with 1% osmium tetroxide in phosphate buffer for 1.5 h, and subsequently incubated with 0.5% uranile acetate overnight. The material was dehydrated and embedded in Spurr resin for a week at 60°C. Ultrathin sections of leaves, obtained with Leica ultracut UCT ultratome, were analyzed on Zeiss EM 900 electron microscope.

Dot Western immunoblotting

For protein extraction, 1 g of leaf tissues was homogenized with a mortar and pestle using liquid nitrogen and four volumes (v/w) of extraction buffer (0.1 *M* potassium phosphate pH 7.5 containing 2 m*M* DTT and 1% PVP). Samples were centrifuged (4°C, 10 000 *g*) for 15 min, and the supernatant was collected and kept in ice. The pellet was washed with extraction buffer, centrifuged and the supernatant discarded. Three volumes of extraction buffer were added to the pellet and 1 *M* NaCl or 1% triton X-100 was added in order to extract cell wall proteins or membrane proteins, respectively. The samples were incubated in ice for 30 min, and then centrifuged (4°C, 10 000 *g*) for 15 min, and the supernatant was collected. The proteins from all cell fractions were precipitated overnight with the addition of five volumes of methanol and 100 m*M* ammonium acetate and then centrifuged (4°C, 2500 *g*) for 15 min. The supernatant was discarded and the protein pellet washed with methanol. After being centrifuged again, the pellet was resuspended in 0.5 ml of water and aliquots of 20 µl were applied on a nitrocellulose membrane. The membrane was incubated with potassium ferricyanide for 1 h to inhibit peroxidase activity from the tissue and then blocked during 3 h in a solution containing 0.1% gelatin, 1% bovine serum albumin (BSA) and 0.1% Tween 20 in 0.1 *M* phosphate buffer saline (pH 7.0). The membrane was incubated overnight with monoclonal *C. ensiformis* anti-urease antibody produced in mouse (diluted in the proportion 1:1000). The membrane was washed with 50 m*M* Tris-HCl pH 7.4 and subsequently incubated for 2 h with anti-mouse IgG conjugated to peroxidase (diluted in the proportion 1:1000). The membrane was washed again and the reaction was visualized by the addition of 0.05% diaminobenzidine dissolved in 50 m*M* Tris–HCl pH 7.4, and 0.03% hydrogen peroxide.

Results

The measurement of the urease activity in the pool of proteins extracted from the different cell fractions showed in two independent experiments that urease was present both at the cell wall and membrane fractions besides the cytoplasm, in both bromeliad species analyzed. In *V. gigantea* leaf tissues, on average 61% of the enzyme was located in the cytoplasm; considerable amounts, 21 and 18% of the enzyme activities, were detected in the membranes and cell wall, respectively (Fig. 1A). In *A. comosus*, the terrestrial bromeliad, 83% of the urease activity was found in the soluble fraction, while approximately 8.5% was detected both in the cell wall and in the membranes (Fig. 1B). In *P. vulgaris*, the control plant, the urease activity was mainly derived from the soluble protein pool: a range from 85 to 92% of the total urease was present in the cytoplasm, while in the cell wall and membranes this percentage varied from 4.5 to 5.5% and from 3.7 to 9.3%, respectively (Fig. 1 C).

The degree of contamination of the cell wall and membrane fractions with cytoplasmic proteins was low, as demonstrated through the activity of the marker enzyme PEPCase (Table 1). The percentage of contamination varied from 4.1 to 5.1% in *V. gigantea*, from 3 to 5.4% in *A. comosus* and from 2.6 to 2.9% in *P. vulgaris*.

Proteins extracted from the different cell fractions of the three species studied in this work were also allowed to react with anti-urease antibody and subsequently with a secondary antibody conjugated with peroxidase. The presence of urease was observed in all analyzed cell fractions (cytoplasm, cell wall and membranes) and predominated in the cytoplasm and membranes (Fig. 2). Although this is a qualitative experiment, it was demonstrated that urease is not found exclusively in the cytoplasm, confirming the results obtained by the urease activity assay in the different cell fractions.

Finally, the considerable amount of urease activity found in the cell wall and membranes in the leaf tissues of *V. gigantea* was also confirmed by the cytochemical detection of this enzyme. Briefly, the CO_2 resulting from urease activity reacted with cobalt chloride producing cobalt carbonate, that in addition of $(NH_4)_2S$ resulted in the electron-dense precipitate, cobalt sulfide, easily visualized under transmission electron microscope. A large amount of the cobalt sulfide deposits appeared in association with plasmatic membranes and/or cell walls, as well as in the cytoplasm (Figs. 3A and B). The control tissues, not incubated with the urease substrate, did not show a significant amount of cobalt deposits in the cells (Fig. 3C).

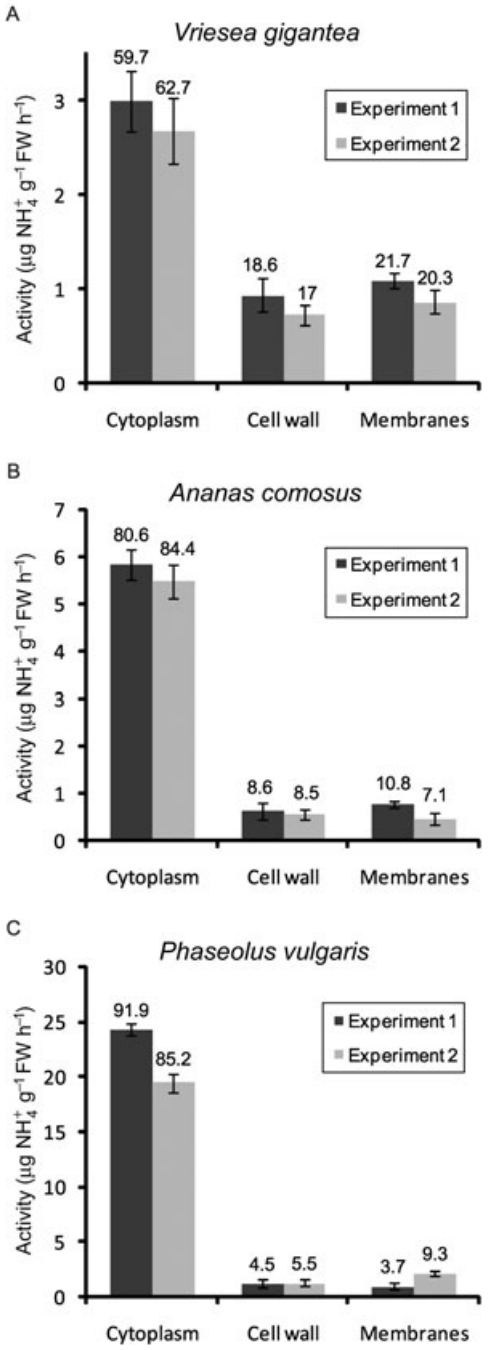


Fig. 1. Distribution of urease activities in cytoplasmic, cell wall and membrane fractions in *Vriesea gigantea, Ananas comosus* and *Phaseolus vulgaris* leaf tissues. The bromeliads were cultivated *in vitro* for 2 days in the presence of 5 m*M* urea and 10 µ*M* nickel and then collected for the enzyme assay. *P. vulgaris* leaves were sprayed with the same concentrations of urea and nickel used for bromeliads and were collected after 48 h. Two independent experiments were performed. Bars represent means ± SD of three technical replicates obtained from a pool of 15 plants per species. The results are expressed in µg NH_4^+ produced g^{-1} FW h^{-1}. Percentage of urease activity in each fraction in relation to the total activity is presented above the bars.

Table 1. Determination of cytoplasmic contamination in the cell wall and membrane fractions of *Vriesea gigantea, Ananas comosus* and *Phaseolus vulgaris* leaf tissues using the cytoplasmic marker enzyme PEPCase. PEPCase activity is expressed in nmol NADH consumed g^{-1} FW min^{-1}. An experiment was performed and the values represent the average ± SD of three technical replicates obtained from a pool of 15 plants per species. Percentage of cytosolic contamination in cell wall and membrane fractions of each species is showed between parentheses.

	Cytoplasm	Cell wall	Membranes
Vriesea gigantea	92 ± 5	3.8 ± 1.0 (4.1%)	4.7 ± 0.7 (5.1%)
Ananas comosus	716 ± 36	21.4 ± 1.9 (3.0%)	38.3 ± 10.8 (5.4%)
Phaseolus vulgaris	1059 ± 27	30.2 ± 1.7 (2.9%)	27.9 ± 5.7 (2.6%)

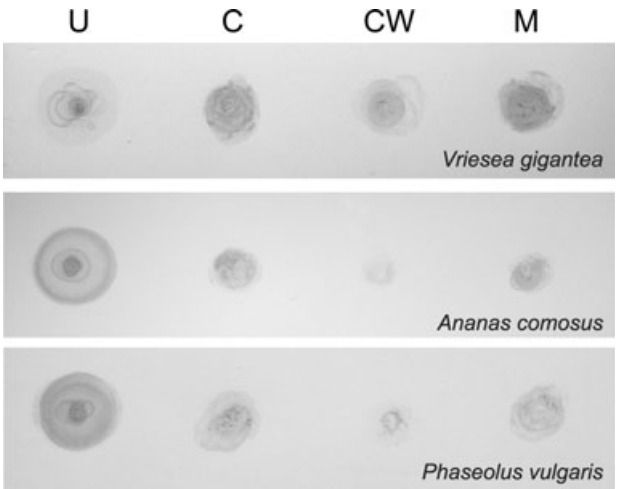


Fig. 2. Dot Western immunoblotting of the proteins extracted from soluble, cell wall and membrane fractions of *Vriesea gigantea, Ananas comosus* and *Phaseolus vulgaris* leaf tissues. The bromeliads were N starved for 2 weeks and then cultivated for 2 days in a culture medium containing 5 m*M* urea and 10 µ*M* nickel. *P. vulgaris* leaves were sprayed with 5 m*M* urea and 10 µ*M* nickel and were collected after 48 h. The extracted proteins were allowed to react with anti-urease antibody followed by peroxidase-conjugated IgG secondary antibody. Two independent experiments were conducted. One of the results is shown and is representative for both experiments. U, positive control prepared with 1 µg urease protein isolated from *Canavalia ensiformis*; S, soluble proteins; CW, cell wall proteins; M, membrane proteins.

Discussion

Despite the importance of urease in the history of enzymology (i.e. that it was the first crystallized enzyme—Sumner (1926)—and the first one shown to contain nickel—Dixon et al., 1975), and the amount of publications about this enzyme, very little information is available about its cellular location. In higher plants, for example, urease is considered to be a cytoplasmic enzyme, although only one species has been analyzed on this topic until now—*C. ensiformis* (Murray and

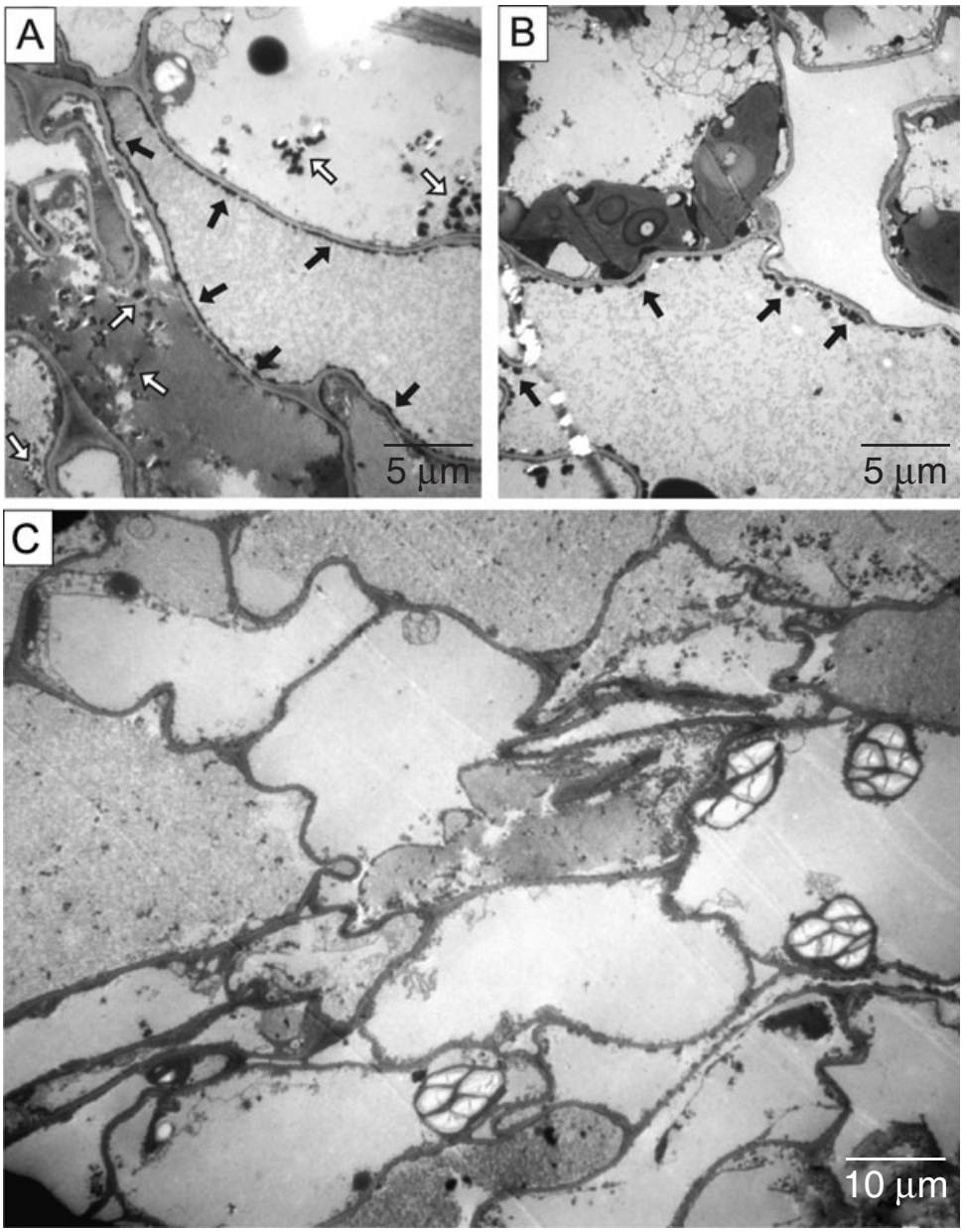


Fig. 3. Cytochemical detection of urease in leaf cells of *Vriesea gigantea* plants by transmission electron microscopy. An experiment was performed and representative ultrathin sections of the plant material are presented. Leaf cells of *Vriesea gigantea* were incubated at 30°C for 40 min with 100 m*M* urea and 10 m*M* $CoCl_2$ in phosphate buffer and then treated with ammonium sulfide (A) and (B). Electron-dense deposits of CoS can be visualized in the proximities of plasma membrane/cell wall (arrows), indicating the presence of urease in this region. Soluble urease in the cytoplasm is indicated with open arrows. (C) Control cells of *V. gigantea* were incubated at 30°C for 40 min with 10 m*M* $CoCl_2$ in phosphate buffer in the absence of urea and then treated with ammonium sulfide.

Knox, 1977; Faye et al., 1986)—and both studies presented controversial results. Recently, Inselsbacher et al. (2007) showed that the bromeliad *V. gigantea* secreted urease to the external medium in the presence of urea, which implied that this enzyme was at least temporally located in the plasma membrane and cell wall. The same characteristic of urease secretion has been shown in some lichen species (Legaz et al., 1986; Pérez-Urria and Vicente, 1989; Pérez-Urria et al., 1989), and its cytolocalization was recently defined by Millanes et al. (2004). In *Evernia prunastri* and *Xanthoria parietina*, for instance, about 80% of total urease activity was associated with the cell wall fraction of algal cells, and 20% was recovered as soluble enzyme (Millanes

et al., 2004). These results were related to the high competition for nutrients between the fungus and the algal components of the lichen. Accounting for only 10% of the volume of the lichen, the main chance of the algal cells to utilize the urea is its superficial hydrolysis, with subsequent absorption of ammonium.

In this study, we showed that urease is not restricted to the soluble fraction of plant cells. In *V. gigantea,* considerable amounts of this enzyme were associated with the cell wall and membranes, which was demonstrated through enzyme activity, immunoreaction assay and cytochemical detection. Another interesting result was the difference observed among the species: while *V. gigantea* had approximately 40% of the urease activity distributed in the membranes and cell wall fraction, only 17 and 11% were found in the same fractions in *A. comosus* and *P. vulgaris*, respectively. These results might be explained by comparing both growth habits and the importance of urea as a nitrogen source for the studied species. Different from the terrestrial species *A. comosus* and *P. vulgaris*, the epiphytic tank bromeliad *V. gigantea* has shown a great ability to utilize urea, which can be inferred by its higher growth rate when cultivated *in vitro* with this N source in comparison to ammonium and nitrate (Endres and Mercier, 2001). In addition, it is important to take into account that the epiphytic habit is usually associated with nutrient limitation (Benzing, 2000). The presence of extensive macro- and microbiont communities inside the tank results in rapid nitrogen transformation rates. Urea, for example, the preferred N source for *V. gigantea*, was transformed into ammonium within a few hours and could subsequently be immobilized by microorganisms easily, so urea uptake by the plants must be rapid (Inselsbacher et al., 2007). It was further demonstrated that probably there is an efficient urea uptake by aquaporins when urea is present in high concentrations in the tank water of *V. gigantea* (Inselsbacher et al., 2007).

In conclusion, we observed significant differences in the urease activity associated with cytoplasmic, cell wall and membrane fractions among epiphytic and terrestrial species. For the epiphytic tank bromeliad, a higher proportion of urease was found in cell wall/membranes in comparison to terrestrial species. The urease localization, detected by enzymatic, cytochemical and immunoreactions assays, suggests that *V. gigantea* maintains either the enzyme near the urea uptake region, increasing the N assimilation efficiency, or releases the urease into the tank solution. This characteristic allows tank bromeliads living in a nitrogen-limited environment to utilize urea rapidly and efficiently and compete successfully for this nitrogen source against microorganism that live in the tank water.

Acknowledgements – We are grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for the fellowship granted to Camila Aguetoni Cambui (grant 06/5059-5) and to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the grant conceded to Helenice Mercier (303715-04-9).

References

Bailey CJ, Boulter D (1971) Urease, a typical seed protein of the Leguminosae. In: Harbone JB, Boulter D, Turner BL (eds) Chemotaxonomy of the Leguminosae. Academic Press, New York, pp 485–502

Benzing DH (2000) *Bromeliaceae: Profile of an Adaptative Radiation. Cambridge University Press, Cambridge*

Dixon NE, Gazzola C, Blakeley RL, Zerner B (1975) Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel? J Am Chem Soc 97: 4131–4133

Dunn BE, Campbell GP, Perez-Perez GI, Blaser MJ (1990) Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. J Biol Chem 265: 9464–9469

Endres L, Mercier H (2001) Influence of nitrogen forms on the growth and nitrogen metabolism of bromeliads. J Plant Nutr 24: 29–42

Evans DJ, Evans DG Jr, Kirkpatrick SS, Graham DS (1991) Characterization of the *Helicobacter pylori* urease and purification of its subunits. Microb Pathog 10: 15–26

Faye L, Greenwood JS, Chrispeels MJ (1986) Urease in Jack bean (*Canavalia ensiformis* (L) DC) seeds is a cytosolic protein. Planta 168: 579–585

Hogan ME, Swift IE, Done J (1983) Urease assay and ammonia release from leaf tissues. Phytochemistry 22: 663–667

Inselsbacher E, Cambui CA, Richter A, Stange CF, Mercier H, Wanek W (2007) Microbial activities and foliar uptake of nitrogen in the epiphytic bromeliad *Vriesea gigantea*. New Phytol 175: 311–320

Knudson L (1946) A new nutrient solution for germination for orchid seed. Amer Orch Soc Bull 15: 214–217

Legaz ME, Vicente C (1989) Regulation of urease activity *Cladina dendroides* and its photobiont by lichen phenols. Plant Sci 63: 15–24

Legaz ME, Díaz-Santos E, Vicente C (1986) Lichen substrates and urease production and secretion: a physiological approach using four Antarctic species. Biochem Syst Ecol 14: 375–379

Leport L, Kandbinder A, Baur B, Kaiser WM (1996) Diurnal modulation of phosphoenolpyruvate carboxylation in pea leaves and roots as related to tissue malate concentrations and to the nitrogen source. Planta 198: 495–501

McLean RJC, Cheng K-J, Gould WD, Costerton JW (1985) Cytochemical localization of urease in a rumen

Staphylococcus sp. by electron microscopy. Appl Environ Microbiol 49: 253–255
McLean RJC, Cheng K-J, Gould WD, Nickel JC, Costerton JW (1986) Histochemical and biochemical urease localization in the periplasm and outer membrane of two *Proteus mirabilis* strains. Can J Microbiol 32: 772–778
Millanes AM, Fontaniella B, García ML, Solas MT, Vicente C, Legaz ME (2004) Cytochemical location of urease in the cell wall of two different lichen phycobionts. Tissue Cell 36: 373–377
Mobley HLT, Hausinger RP (1989) Microbial urease: significance, regulation, and molecular characterization. Microbiol Rev 53: 85–108
Mobley HLT, Island MD, Hausinger RP (1995) Molecular biology of microbial ureases. Microbiol Rev 59: 451–480
Molina MC, Muñiz E, Vicente C (1993) Enzymatic activities of algalbinding protein and its algal cell wall receptor in the lichen *Xanthoria parietina*. An approach to the parasitic basis of mutualism. Plant Physiol Biochem 31: 131–142
Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473–497
Murray DR, Knox RB (1977) Immunofluorescent localization of urease in the cotyledons of jack bean, *Canavalia ensiformis*. J Cell Sci 26: 9–18
Pérez-Urria E, Vicente C (1989) Purification and some properties of a secreted urease from *Evernia prunastri*. J Plant Physiol 133: 692–695
Pérez-Urria E, Vicente C, Filho LX (1989) Screening of urease production by seven species of Finnish lichens. Biochem Syst Ecol 17(5): 359–363
Polacco JC, Holland MA (1993) Roles of urease in plant cells. Int Rev Cytol 145: 65–103
Sumner JB (1926) The isolation and crystallization of the enzyme urease. J Biol Chem 69: 435–441
Weatherburn MW (1967) Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. Anal Chem 39: 971–974
Zonia LE, Stebbins NE, Polacco JC (1995) Essential role of urease in germination of nitrogen limited *Arabidopsis thaliana* seeds. Plant Physiol 107: 1097–1103

Edited by B. Sundberg