

Cassia Ayumi Takahashi

**ASSIMILAÇÃO DO NITROGÊNIO EM FOLHAS DE *Vriesea gigantea*
(BROMELIACEAE) DURANTE A TRANSIÇÃO ONTOGENÉTICA DO
HÁBITO ATMOSFÉRICO PARA O EPÍFITO COM TANQUE**

Orientadora: **Profa. Dra. Helenice Mercier**

Departamento de Botânica do Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo

Co-orientador: **Prof. Dr. Rafael Silva Oliveira**

Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas

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

São Paulo

2013

RESUMO

A fase de desenvolvimento é um importante fator a ser considerado em pesquisas sobre nutrição de bromélias. O hábito de vida dessas plantas pode mudar de: *atmosférica* (com folhas sem formar um tanque) para o *com tanque* ao longo do seu desenvolvimento. Algumas pesquisas mostraram que o conteúdo de nitrogênio foliar ou capacidade fotossintética são significativamente influenciados pela fase de desenvolvimento, porém não há registros de que a nutrição e o metabolismo do nitrogênio diferem entre bromélias jovens ou adultas. O objetivo principal deste projeto foi verificar se existem diferenças na dinâmica do metabolismo do nitrogênio (absorção, transporte e assimilação), decorrente da utilização de fontes de distintas (amônio, nitrato ou ureia), entre bromélias nas fases atmosférica ou adultas com tanque desenvolvido. Para tanto, plantas de *Vriesea gigantea* foram regadas com uma solução nutritiva que conteve 5mM de N total, disponível nas formas: $^{15}\text{NH}_4^+$ ou $^{15}\text{NO}_3^-$ ou ^{15}N -ureia. Foram feitas coletas temporais das raízes e de duas diferentes porções da folha (ápice e base) das bromélias jovens e de três regiões foliares (ápice, mediana e base) das folhas das bromélias adultas com tanque. Todas as amostras vegetais foram utilizadas na avaliação das atividades da: urease, redutase do nitrato, sintetase da glutamina e desidrogenase do glutamato; e da quantificação da abundância isotópica do ^{15}N . Segundo os resultados, o nitrato foi considerado a fonte de nitrogênio absorvida em concentrações menores quando comparada com a ureia e o amônio pelas bromélias de ambas as fases de desenvolvimento. Entretanto, as bromélias atmosféricas mostraram ser capazes de capturar essa fonte inorgânica de nitrogênio mais eficientemente do que as bromélias com tanque, uma vez que o nitrato foi absorvido, transportado e assimilado rapidamente na 1ª hora após o fornecimento dessa fonte. Já para as bromélias adultas, a absorção do nitrato foi lenta e ocorreu, principalmente, no final do experimento (12ª e 24ª hora). O amônio e a ureia foram as fontes absorvidas em maiores concentrações tanto pelas bromélias jovens quanto pelas adultas. Entretanto, as bromélias atmosféricas foram capazes de captar e metabolizar maiores concentrações de nitrogênio

proveniente do amônio, enquanto que as da fase adulta com tanque foram mais aptas a absorver e assimilar maiores concentrações de ureia em seus tecidos. A bromélia *V. gigantea* pode mudar a sua morfologia e fisiologia ao longo de seu desenvolvimento, tornando-se apta a captar as fontes de nitrogênio que, talvez, sejam mais abundantes em cada fase de seu desenvolvimento. A água da chuva que contém, principalmente, fontes inorgânicas de nitrogênio diluídas, pode ser o principal meio por onde as bromélias jovens captam o nitrogênio. Ao desenvolverem um tanque, as bromélias podem mudar a sua fisiologia, capturando preferencialmente fontes de nitrogênio provenientes de matéria orgânica decomposta que se acumula no interior da cisterna. As raízes das bromélias atmosféricas também mostraram cumprir um papel fundamental na nutrição dessas plantas durante a fase juvenil, pois aumentaram a capacidade de absorção e assimilação de fontes de nitrogênio. Quando as bromélias iniciam o desenvolvimento de um tanque, as bases das folhas passaram a assumir a função do sistema radicular, enquanto que as raízes, talvez, começassem a diminuir sua capacidade de captar os nutrientes do meio ambiente. Os resultados bioquímicos demonstraram que existe uma forte sincronização de todas as etapas do metabolismo do nitrogênio (absorção, transporte e assimilação) envolvendo diferentes partes do corpo das bromélias (raízes, porções foliares da base, mediana ou ápice) de ambas as fases de desenvolvimento, sugerindo que nos tecidos vegetais dessas plantas, existe uma fina regulação de todos os processos fisiológicos e metabólicos que compreendem o metabolismo do nitrogênio. Essa regulação controlada seria necessária para que as bromélias atmosféricas ou com tanque desenvolvido consigam absorver, transportar e assimilar as fontes de nitrogênio rapidamente e com grande eficiência. Para finalizar, o novo termo “bromélia epífita jovem sem tanque” foi sugerido para se referir à bromélia *V. gigantea* na fase juvenil ao invés de “bromélia epífita atmosférica”. As raízes dessa bromélia jovem demonstraram ter um papel fundamental nos processos de absorção e assimilação das fontes de nitrogênio, uma característica que geralmente não é atribuída para as raízes das bromélias com o hábito de vida atmosférico.

ABSTRACT

The stages of ontogenetic development of bromeliad can be an important feature to be considered in the physiology studies because the young plants can be classified as atmospheric bromeliads, while the adult plants have a special structure formed by leaves called tank. Some studies showed that some physiological characteristics can be influenced by the stages of ontogenetic development in bromeliads as photosynthetic rates or the total nitrogen (N) content in leaves. However, there are no records that nutrition and nitrogen metabolism differ between young and adult epiphytic bromeliads. The objective of this project was to verify the existence of differences in the dynamics of nitrogen metabolism (absorption, transportation and assimilation) arising from the use of distinct nitrogen sources (NH_4^+ , NO_3^- or urea) in epiphytic bromeliad *Vriesea gigantea* with different stages of ontogenetic development (atmospheric or tank). A nutrient solution, consisting 5mM of total N, was offered to bromeliads. Three different forms of N sources were used: NH_4^+ , NO_3^- or urea, enriched with ^{15}N isotopes. Three distinct portions of leaf (apex, middle and base) of adult tank bromeliad and two different regions of leaf (apex and base) and roots of young bromeliads were harvested in six different times. All samples were used in enzymatic assays of urease, nitrate reductase, glutamate synthetase and glutamate dehydrogenase and in the ^{15}N isotope quantification. According to the results, the nitrate was considered the nitrogen source absorbed at lower concentration by young and adult bromeliads. The atmospheric bromeliads were able to capture nitrate more efficiently than the tank plants, since this inorganic nitrogen source was absorbed and assimilated quickly in the 1st hour of the experimental time while the tank bromeliads absorbed nitrate slowly at the end of the experiment (12th and 24th hour). Ammonium and urea sources were absorbed in higher concentrations by atmospheric and tank bromeliads. The young bromeliads were able to absorb and assimilate higher concentrations of nitrogen from ammonium, while tank bromeliad absorbed and assimilated higher concentrations of urea. In each development stage, the epiphytic bromeliad *V. gigantea* can absorb and assimilate the nitrogen sources which are more

available in the environment. The atmospheric bromeliads get to absorb diluted nutrients as inorganic nitrogen sources mainly from rainwater. After the tank structure developed in the rosette, the morphology and/or physiology features changes in the adult bromeliads. The tank bromeliads get to absorb mainly organic nitrogen sources from decomposed organic matter which accumulates inside the tank. The roots of atmospheric bromeliads also showed an important role in the nutrition of the young plants since the atmospheric bromeliads get to improve the nitrogen sources uptake and nitrogen assimilation. When the bromeliads developed a tank, the bases of the leaves might assume the absorption function, whereas the roots, perhaps, might decrease its capacity to capture the nutrients from the environment. The biochemical results showed that there is a strong synchronization of all stages of nitrogen metabolism (uptake, transport and assimilation) involving different body parts of bromeliads (roots, leaf portions of the base, middle or apex) of both development stages, suggesting that there might have a thin regulation of all physiological and metabolic processes of nitrogen metabolism in the bromeliad's tissues. This controlled regulation might be important to the atmospheric or tank bromeliads are able to absorb, allocate and assimilate nitrogen sources quickly and with great efficiency. Finally, the terminology "atmospheric epiphytic bromeliad" might not be appropriated to refer to young plants since their roots showed an important role in the absorption and assimilation of nitrogen sources. This feature is not usually attributed to the roots of atmospheric bromeliads. Then, the new terminology "young epiphytic bromeliad without tank" was suggested to refer the bromeliad *V. gigantea* in the juvenile phase.

INTRODUÇÃO

I.1- Nutrição de bromélias epífitas com tanque

A família Bromeliaceae distribui-se ao longo de toda zona tropical e subtropical das Américas, sendo a América do Sul considerada como o centro de grande diversidade (Leme, 1993). O sucesso dessa ampla distribuição geográfica pode ser explicado pelo desenvolvimento de especializações morfológicas e fisiológicas que permitiram a sobrevivência e a adaptação dessas espécies a diferentes condições ambientais (Padilha, 1973). Diferenças na disponibilidade de nutrientes em cada ecossistema é um fator ambiental que pode estar relacionado à existência das características adaptativas que melhoram a eficiência da aquisição de nutrientes das bromélias de acordo com seu hábito de vida (Benzing & Renfrow, 1974).

As bromélias de hábito terrestre absorvem os nutrientes do solo através das raízes bem desenvolvidas (Benzing & Renfrow, 1974). Diferentemente dessas, as bromélias de hábito epífito apresentam um sistema radicular bastante reduzido, cuja principal função é a sua fixação na planta hospedeira. Dessa forma, a função de absorção de água e nutrientes passou a ser executada quase totalmente pelas folhas cobertas por tricomas absorventes. Muitas bromélias epífitas possuem suas folhas dispostas em torno do seu eixo caulinar com uma sobreposição parcial entre elas, formando o que se denominou de tanque ou cisterna (Benzing, 1990).

O tanque é uma estrutura importante na obtenção de nutrientes pelas bromélias epífitas, pois a disposição das folhas permitiu que os nutrientes, como minerais, íons ou aminoácidos pudessem ser acumulados e posteriormente ser absorvidos pelos tricomas foliares (Benzing, 1990). Os fatores atmosféricos como o vento, a neblina e a chuva transportam minerais até as cisternas, contribuindo para a riqueza nutricional do tanque (Leme, 1993). Durante os eventos de chuva, certos íons e aminoácidos presentes nos troncos e folhas da planta hospedeira são levados pela água da chuva até o interior das cisternas, onde são acumulados (Benzing, 1973). Os detritos vegetais depositados no

tanque, como material foliar, troncos e galhos do hospedeiro, formam um tipo de solo orgânico (húmus) que também tem grande valor nutricional para as bromélias (Benzing, 1973; Leme, 1993).

Há outras formas de obtenção de nutrientes pelas bromélias epífitas. Segundo Benzing (1990), formigas que vivem em associação com algumas bromélias depositam outros insetos, capturados por elas, no interior das cavidades das cisternas. Esses detritos animais e as próprias excretas das formigas enriquecem o tanque de nutrientes. As epífitas com tanque têm associações com uma extensa microflora, diversos invertebrados e alguns vertebrados que geralmente procuram essas plantas como um local de proteção, alimentação e/ou reprodução (Benzing, 2000). Essas associações possibilitam um aumento na disponibilidade de nutrientes nitrogenados inorgânicos como amônio, secretado por cianobactérias (Rai *et al.*, 1983), ou orgânicos, como a uréia, excretada pelos anfíbios viventes em bromélias com tanque (Romero *et al.*, 2010).

I.2- A folha como órgão de absorção e assimilação

A folha é o principal órgão do corpo vegetativo dos membros da família Bromeliaceae (Benzing, 2000). Nas bromélias epífitas, elas possuem tanto a função de absorção quanto de assimilação dos nutrientes (Benzing, 2000). A folha de uma bromélia com tanque pode ser dividida em pelo menos três regiões principais: a porção basal, a qual forma o tanque e, portanto, geralmente está em contato com a água e nutrientes (Benzing, 1990) e as porções mediana e do ápice que estão mais expostas à luz do que a base (Popp *et al.*, 2003).

Alguns poucos trabalhos já mostraram a existência de diferenças morfológicas, anatômicas ou fisiológicas entre diferentes regiões de uma mesma folha em bromélias. Sakai & Sandford (1980), ao estudarem os tricomas presentes nas superfícies foliares de *Ananas comosus* (Bromeliaceae), observaram que os tricomas presentes no ápice apresentavam-se não funcionais, diferentemente dos tricomas da base. Nessa mesma bromélia terrestre, Popp *et al.* (2003) mostraram que há um gradiente de concentração de carboidratos e solutos orgânicos (malato, citrato), aumentando da região basal para o ápice das folhas. Olivares & Medina (1990), que também

obtiveram resultados semelhantes para as folhas de *Fourcroya humboldtiana* Treal. (Agavaceae), inferiram que esse gradiente de concentração possivelmente é decorrente de uma variação de intensidade luminosa que se forma nas diversas regiões das folhas quando essas estão dispostas em roseta. Há ainda evidências de que a porção apical das folhas da bromélia *Vriesea sanguinolenta* possui as maiores taxas fotossintéticas, quando comparada com a base foliar (Zotz *et al.*, 2002).

Quanto ao metabolismo do nitrogênio, Takahashi & Mercier (2011) demonstraram que as porções apical ou basal das folhas de *Vriesea gigantea*, uma bromélia epífita com tanque, diferem quanto à capacidade de assimilação do nitrogênio orgânico (ureia) ou inorgânico (nitrato/amônio). Os resultados mostraram que, independente da fonte nitrogenada fornecida no interior do tanque (NO_3^- , NH_4^+ ou uréia), as atividades das enzimas redutase do nitrato (NR) e urease foram mais intensas na porção basal, enquanto que as atividades das enzimas de assimilação do nitrogênio foram mais altas na porção apical. Esses resultados permitiram inferir que a região basal pode estar relacionada, preferencialmente, com a absorção do nitrogênio e produção do amônio, enquanto que a apical seria a principal região de assimilação do amônio em aminoácidos.

I.3- Fontes nitrogenadas inorgânicas e orgânicas para as bromélias epífitas com tanque

O nitrogênio é um elemento mineral importante e necessário em grandes quantidades pelos vegetais. Sua concentração e forma influenciam muito o crescimento das plantas (Yoneyama, 2001). As duas principais fontes de nitrogênio encontradas no solo são o nitrato e amônio (Jackson & Volk, 1995), porém fontes de nitrogênio orgânico também podem ser importantes para muitas plantas (Cambuí & Mercier, 2006).

As bromélias epífitas habitam um dos ambientes mais oligotróficos das florestas tropicais onde a disponibilidade de nutrientes é esporádica e totalmente dependente da chuva. Por essa razão, as bromélias epífitas têm características que as permitem capturar tanto o nitrogênio das fontes mais comumente encontradas na natureza quanto de fontes alternativas como a uréia, aminoácidos ou gás amônia. Vários trabalhos de nossa equipe avaliaram como as bromélias epífitas absorvem e

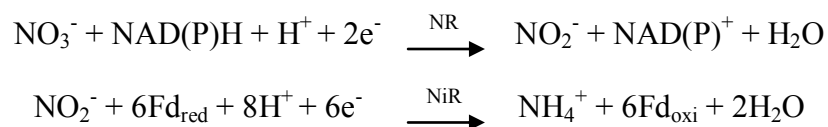
assimilam o nitrogênio proveniente de fontes inorgânicas e orgânicas, associando com a sua morfologia e o habitat em que vivem (Endres & Mercier, 2001a; Endres & Mercier, 2001b; Endres & Mercier, 2003; Nievola *et al.*, 2001; Tamaki & Mercier, 2001; Inselsbacher *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2007).

As bromélias terrestres e epífitas possuem respostas fisiológicas distintas de acordo com a concentração e o tipo de fonte nitrogenada disponibilizada em meio de cultura (Endres & Mercier, 2001a). O crescimento de *Ananas comosus*, uma bromelia terrestre, foi estimulado com o aumento da concentração de nitrogênio no meio de cultura. Esse resultado reflete a sua adaptação ao ambiente terrestre, onde o nitrogênio é relativamente mais abundante que o epífita. Já *Vriesea gigantea*, uma bromélia epífita, mostrou ser mais adaptada a sobreviver em ambientes escassos em nutrientes, pois as maiores taxas de crescimento foram detectadas nas condições de cultivo com baixas concentrações de nitrogênio (Endres & Mercier, 2001a). Para *Ananas comosus*, o tipo de fonte nitrogenada fornecida pouco influenciou no seu crescimento; já para *Vriesea gigantea*, verificou-se alta taxa de crescimento e grande tolerância de cultivo em elevadas concentrações de uréia (50mM) (Endres & Mercier, 2001a).

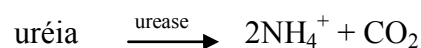
Em outros trabalhos, Nievola *et al.* (2001) mostraram que a espécie rupícola com tanque, *Vriesea fosteriana*, era mais adaptada a assimilar o nitrogênio de origem orgânica (uréia) do que a espécie terrestre sem tanque *Pitcairnia flammaea*, uma vez que foi detectada maior atividade enzimática da GS nas folhas da bromélia epífita. Tamaki & Mercier (2001) observaram que as atividades das enzimas de assimilação de nitrogênio (GS e GDH-NADH) e o conteúdo endógeno de aminoácidos aumentaram significativamente em folhas de *Tillandsia pohliana*, uma bromélia epífita atmosférica, quando essas foram expostas a concentrações elevadas do gás amônia (NH₃), demonstrando a rápida capacidade de absorção e assimilação de NH₃ pela planta (Tamaki & Mercier, 2001).

I.4- Assimilação do nitrogênio

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



Por outro lado, muitas plantas conseguem absorver fontes orgânicas de nitrogênio através das folhas como, por exemplo, a ureia (Wittwer *et al.*, 1963; Nicoulaud & Bloom, 1996). Após ser absorvida, ela pode ser hidrolisada pela enzima urease, gerando dióxido de carbono e amônio (Lehninger, 2000). A reação catalisada pela urease está descrita a seguir:

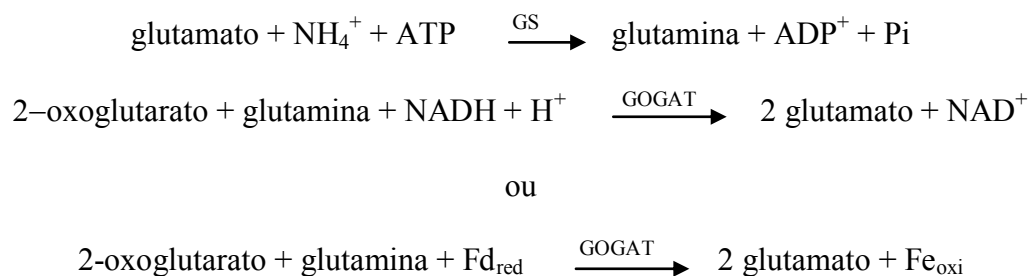


A urease é uma metaloenzima contendo o níquel como grupo prostético, tornando o nitrogênio da ureia acessível às plantas (Gerendás *et al.*, 1999). Essa enzima pode estar presente no citoplasma (Hogan *et al.*, 1983; Witte & Medina-Escobar, 2001), porém para *Vriesea gigantea*, uma bromélia epífita com tanque, recentemente foi constatado que sua localização também pode estar associada à parede celular e a membrana plasmática (Cambuí *et al.*, 2009).

O NH_4^+ pode ser incorporado em aminoácidos pela ação combinada da sintetase da glutamina (GS) e sintase do glutamato (GOGAT). A GS é uma importante enzima do metabolismo

do nitrogênio. Ela tem grande afinidade pela molécula de amônio e está presente em todos os tecidos vegetais (Mifflin & Habash, 2002). Conhecem-se duas isoformas de GS nas plantas: uma presente no citossol (GS-1) e outra localizada nos cloroplastos ou nos plastídios (GS-2) das raízes. Ambas as formas têm a função de combinar o amônio com o glutamato para produzir glutamina. Essa reação necessita da hidrólise de um ATP e envolve um cátion divalente, como o Mg^{+2} , Mn^{+2} ou Co^{+2} como co-fator.

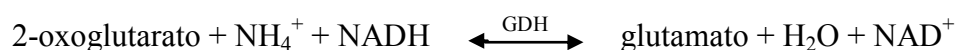
Posteriormente, a glutamina formada tem o seu grupo amida transferido para o 2-oxoglutarato, produzindo duas moléculas de glutamato (Lea, 1993). A enzima responsável por essa reação é a glutamato sintase (GOGAT) que pode estar presente nas plantas em duas formas: uma cloroplastídica, dependente de ferredoxina e outra plastídica, dependente de NADH e encontrada nos tecidos não fotossintetizantes. As reações catalisadas pela GS/GOGAT estão descritas a seguir, resumidamente.



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

A desidrogenase do glutamato (GDH) é outra enzima que parece ter uma importante função no metabolismo do nitrogênio (Mifflin & Habash, 2002). Antes da descoberta da via de assimilação GS/GOGAT, acreditava-se que a GDH tinha a função única de catalisar a síntese de glutamato a partir de NH_4^+ e 2-oxoglutarato. Entretanto, o trabalho de Cammaerts & Jacobs (1985) sugeriu um duplo papel para essa enzima. Na presença de altas concentrações de NH_4^+ , a GDH atuaria no sentido de assimilação do amônio, enquanto que a GDH-desaminante, forneceria esqueletos carbônicos quando existissem concentrações mais baixas do íon amoniaco. Assim, a GDH faria uma ligação entre os metabolismos de carbono e de nitrogênio. Stitt *et al.* (2002) sugerem que a GDH possa ter um papel cuja ação da enzima varia de acordo com as necessidades celulares com relação aos conteúdos de glutamato e esqueletos carbônicos.

Conhecem-se duas formas de GDH: uma mitocondrial, dependente de NADH, e outra cloroplastídica, dependente de NADPH (Sodek, 2004). A reação reversível catalisada por essa enzima está esquematizada a seguir:



I.5- Mudança do hábito de crescimento no decorrer da ontogenia

Estudos recentes com epífitas vasculares ressaltaram que, além dos parâmetros ambientais convencionais (umidade, temperatura, etc) ou da região foliar (vide tópico I.2), a fase de desenvolvimento também é um importante fator a ser considerado em pesquisas sobre nutrição de bromélias, uma vez que o hábito de vida dessas plantas pode mudar de *atmosférica* (sem formação de tanque) para epífita *com tanque* ao longo do seu desenvolvimento (Schmidt *et al.*, 2001; Schmidt & Zotz, 2001; Zotz, 1997).

Segundo Zotz *et al.* (2001), é essencial que se defina a fase do desenvolvimento e o tamanho das bromélias utilizadas em estudos de fisiologia vegetal. A não inclusão dessas características no estudo pode facilmente levar a interpretações precipitadas ou errôneas dos resultados (Zotz *et al.*, 2001). Estudos mostraram que certos parâmetros fisiológicos, como conteúdo de nitrogênio foliar

(Hietz *et al.* 1999), capacidade fotossintética (Zotz *et al.*, 2004), quantificações isotópicas de carbono ou nitrogênio (Zotz & Ziegler, 1999; Reich *et al.*, 2003), taxas de troca de CO₂ (Zotz *et al.*, 2002) e transpiração residual (Schmidt & Zotz, 2001), foram significativamente influenciados pela fase de desenvolvimento da bromélia.

Em muitas bromélias, como por exemplo, em *Tillandsia deppeana*, as plantas jovens apresentaram características morfológicas semelhantes às de bromélias atmosféricas, isto é, ausência de tanque, folhas estreitas e lineares, alta densidade de tricomas em toda folha, enquanto que quando se tornam adultas, passam a ter um tanque desenvolvido, abandonando as características iniciais (Adams & Martin, 1986). Adams & Martin (1986) mostraram que, dependendo da fase de vida, *Tillandsia deppeana* também apresentou diferenças fisiológicas quando se compararam indivíduos juvenis (atmosféricos) com adultos (tanque). As formas com tanque mostraram as maiores taxas de troca de CO₂ e de transpiração quando bem hidratadas, e quando submetidas ao estresse hídrico, apresentaram uma redução maior na taxa de trocas de CO₂, quando comparado com das plantas jovens (atmosféricas). Para *Vriesea sanguinolenta*, também foram verificadas diferenças entre as plantas de tamanhos distintos (Zotz *et al.*, 2004). A capacidade fotossintética e o conteúdo de nitrogênio foliar aumentaram gradualmente da fase juvenil (atmosférica) para a fase adulta (tanque). Além disso, a disponibilidade de nutrientes no meio epifítico tornou-se maior para as bromélias adultas, já que desenvolvem um tanque armazenador de água e nutrientes. Como o conteúdo total de nitrogênio e as taxas fotossintéticas podem ser considerados parâmetros fortemente interrelacionados (Field & Mooney, 1986), uma maior absorção e assimilação de nutrientes poderiam favorecer o aumento das taxas fotossintéticas foliares nas bromélias-tanque (Zotz *et al.*, 2001).

As pesquisas citadas acima demonstraram que os diferentes hábitos de crescimento podem influenciar parâmetros fisiológicos como fotossíntese ou conteúdo de nitrogênio foliar em bromélias. Entretanto, não há estudos que relatam diferenças quanto à absorção, assimilação e

alocação do nitrogênio (orgânico ou inorgânico), entre diferentes estágios ontogenéticos de uma bromélia.

I.6- A abundância isotópica de ^{15}N nos tecidos vegetais e sua importância como estratégia de pesquisa

A utilização das técnicas com os isótopos estáveis tem sido amplamente empregada em pesquisas de ecofisiologia de plantas durante as duas últimas décadas (Handley & Raven, 1992; Dawson, 2002; Wania *et al.*, 2002; Craine, 2009). Os isótopos estáveis são elementos que apresentam o mesmo número de prótons, porém diferem unicamente no número de nêutrons. Eles são elementos não radioativos, presentes naturalmente em todos os ecossistemas e capazes de atuarem em todas as reações bioquímicas e biogeoquímicas, sem que modifiquem quaisquer características desses processos. São denominados de isótopos leves (^{14}N , ^{12}C , ^1H , ^{16}O), os elementos com menor massa atômica e mais abundantes na natureza e isótopos pesados (^{15}N , ^{13}C , ^2H , ^{17}O), aqueles que apresentam maior número de nêutrons e são mais raros. Por diferirem apenas no número de nêutrons, os isótopos leves reagem mais rapidamente nas reações bioquímicas e processos biogeoquímicos do que os pesados, devido à necessidade de uma menor energia de ativação para que as ligações químicas dos compostos com os isótopos leves sejam quebradas. A variação na proporção entre os isótopos leves e pesados entre o substrato e o produto é denominada de fracionamento isotópico ou discriminação isotópica (Dawson, 2002).

Os isótopos estáveis podem ser considerados potenciais marcadores de compostos ou moléculas presentes nos ecossistemas ou nos seres vivos. Além disso, o uso de isótopos enriquecidos com os elementos pesados (^{15}N , ^{13}C , ^2H , ^{17}O) possibilita o rastreamento de compostos marcados dentro dos ciclos biogeoquímicos e/ou no interior dos seres vivos sem que causem quaisquer interferências ou modificações nesses processos ou nos sistemas em que participam. As quantificações isotópicas podem fornecer informações relevantes como, por exemplo, quais as

origens das fontes nutricionais necessárias para as plantas e como esses recursos ciclam no interior dos organismos vegetais após serem absorvidos.

Fontes nitrogenadas enriquecidas com ^{15}N foram utilizadas em várias pesquisas que tiveram como objetivos investigar a absorção foliar ou radicular do nitrogênio e avaliar a contribuição que cada tipo de fonte na nutrição de diversas espécies vegetais (Hietz *et al.*, 1999; Reith *et al.*, 2003). Em um estudo de nutrição mineral da orquídea *Phalaenopsis sp* cultivada *in vitro*, mostrou-se a grande capacidade de absorção de ureia que as raízes dessa planta possuem (Trépanier *et al.*, 2009). A contribuição do nitrogênio proveniente da ureia foi cerca de 4 vezes maior do que a inorgânica quando essa orquídea foi cultivada em um meio contendo apenas uma fonte nitrogenada, ureia ou nitrato, enriquecidos de isótopos ^{15}N (Trépanier *et al.*, 2009).

Hietz *et al.* (1999) quantificaram a abundância natural de $\delta^{15}\text{N}$ em bromélias atmosféricas, tanque/atmosféricas (bromélias com folhas estreitas e tanque pequeno) e nas com tanque (indivíduos com folhas largas e cisterna bem desenvolvida). Embora, tenha sido verificado que os conteúdos de nitrogênio total das bromélias foram semelhantes entre si, os valores de $\delta^{15}\text{N}$ foram, significativamente, diferentes ao se comparar os resultados de bromélias de hábitos distintos. As epífitas com tanque apresentaram os maiores valores de $\delta^{15}\text{N}$ ($-6,05\% \pm 2,26$) em relação às atmosféricas ($-10,9\% \pm 2,11$). Os resultados permitiram inferir que as bromélias atmosféricas, provavelmente, obtêm os compostos nitrogenados provenientes, principalmente, da deposição atmosférica, uma vez que os valores de $\delta^{15}\text{N}$ aferidos nas folhas foram semelhantes aos valores de $\delta^{15}\text{N}$ da água da chuva. Por outro lado, apesar das bromélias epífitas com tanque também dependerem da chuva, o tanque possibilita a deposição, armazenamento e degradação de matéria orgânica (folhas, galhos, restos de animais), cujos minerais e demais compostos orgânicos podem ser utilizados como fontes de nutrientes, enriquecendo a água do tanque com uma maior quantidade de ^{15}N (Hietz *et al.*, 1999).

Reith *et al.* (2003) verificaram que dependendo da idade e do hábito de crescimento, algumas bromélias epífitas viventes em florestas podem utilizar principalmente fontes de nitrogênio

provenientes da deposição úmida ou seca da atmosfera (alóctone) ou da degradação de matéria orgânica como folhas e galhos da árvore hospedeira que se acumulam no interior do tanque (autóctone). Para as plantas jovens (atmosféricas), verificou-se que cerca de 80% do nitrogênio foliar foi proveniente de fontes nitrogenadas alóctones, enquanto que para as adultas, 70% do nitrogênio foliar eram referentes às fontes de nitrogênio autóctones (Reith *et al.*, 2003). Esses autores demonstraram que as bromélias epífitas com diferentes idades são expostas a fontes nitrogenadas distintas, porém essa pesquisa não investigou se haveria preferências por formas de N específicas (orgânicas ou inorgânicas) entre bromélias de diferentes fases do desenvolvimento.

PRINCIPAIS CONCLUSÕES

V. gigantea é uma bromélia epífita heteroblástica, isto é, muda o seu hábito de vida durante o seu desenvolvimento: de *atmosférica* (com folhas sem formar um tanque) na fase juvenil passa a contar com o *tanque* na fase adulta. Nas bromélias epífitas, a capacidade e a forma de aquisição de nutrientes, como as fontes de nitrogênio, podem ser diferentes de acordo com o seu hábito de vida.

Tanto as bromélias atmosféricas quanto as com tanque mostraram ser capazes de absorver fontes de nitrogênio inorgânico (nitrato ou amônio) ou orgânico (ureia) durante um período de 24 horas após o seu fornecimento. Entretanto, a eficiência da absorção e da assimilação de cada uma dessas fontes foi muito diferente entre as bromélias atmosféricas e as plantas com tanque da fase adulta.

O nitrato foi considerado a fonte de nitrogênio absorvida em menores concentrações pelas bromélias de ambas as fases de desenvolvimento. Entretanto, ao comparar a eficiência de absorção dessa fonte entre os dois tipos de bromélias, observou-se que o nitrato mostrou ser uma fonte de nitrogênio melhor utilizada pelas bromélias em fase juvenil. As bromélias sem tanque foram capazes de absorver rapidamente o nitrato pelas raízes com elevadas taxas de absorção, transportá-lo para as folhas e assimilá-lo com eficiência imediatamente após o fornecimento dessa fonte às raízes (1ª hora do período experimental), enquanto que as bromélias com tanque não apresentaram o mesmo desempenho e eficiência em captar o nitrato durante o início do experimento. Essa fonte foi incorporada pelas bases das folhas das bromélias com tanque através de uma absorção lenta que ocorreu principalmente no fim do período experimental (12ª e 24ª hora).

O amônio e a ureia foram considerados as fontes de nitrogênio melhor utilizadas pelas bromélias em ambas as fases de desenvolvimento. Entretanto, as bromélias atmosféricas foram capazes de absorver e assimilar maiores concentrações de nitrogênio proveniente do amônio, enquanto que as da fase adulta com tanque foram mais aptas a captar e metabolizar maiores concentrações de ureia em seus tecidos. Como na fase juvenil, as bromélias não possuem um

tanque, o acesso às fontes de nitrogênio orgânico pode ser mais raro nessa fase do seu desenvolvimento, uma vez que a ausência do tanque não permite que sejam acumulados água e detritos orgânicos entre suas folhas ou que a bromélia possa abrigar animais como anfíbios ou insetos, cujas excretas podem contribuir para a nutrição dessas plantas. Dessa forma, para bromélias sem tanque, o principal meio de aquisição de fontes nitrogenadas, principalmente de origem inorgânica, como o amônio, seria através da água da chuva que escorre pela copa, tronco e galhos da árvore hospedeira. No momento em que começam a desenvolver um tanque, as bromélias passam a ter a oportunidade de absorver e assimilar fontes de nitrogênio proveniente principalmente de origem orgânica, uma vez que, o tanque permite que essas plantas criem o seu próprio “solo ou húmus” entre as suas folhas através da decomposição da matéria orgânica acumulada dentro da cisterna.

A ureia mostrou ser uma fonte absorvida e assimilada em grandes concentrações pelas bromélias em ambas as fases de desenvolvimento. Essa fonte orgânica de nitrogênio pode ser considerada muito importante na nutrição das bromélias que habitam o ambiente epífita, pois as bromélias podem conseguir absorver, de uma só vez, dois átomos de nitrogênio e, talvez, também o elemento carbono.

As bromélias da fase juvenil possuem um sistema radicular fisiologicamente bastante ativo. As raízes mostraram cumprir um papel fundamental na nutrição das bromélias nessa fase de desenvolvimento, pois aumentaram a capacidade de absorção e assimilação de fontes de nitrogênio. Essa descoberta foi considerada inédita, pois as raízes de bromélias geralmente são classificadas como órgãos que perderam a função de absorção e se restringiram a fixar a bromélia na árvore hospedeira. Quando as bromélias iniciam o desenvolvimento de um tanque, as raízes, talvez, comecem a diminuir sua capacidade de captar os nutrientes do meio ambiente. As bases das folhas se especializam na função de absorção e assimilação de alguns compostos como a redução do nitrato e a hidrólise da ureia, assumindo a função do sistema radicular.

As bromélias de ambas as fases de desenvolvimento também mostraram ter a capacidade de absorver e assimilar rapidamente as fontes de nitrogênio durante a primeira hora após o fornecimento dessas fontes à planta. Essa capacidade pode ser considerada uma importante estratégia para captação de maiores concentrações de nitrogênio no ambiente epífita. As bromélias jovens não possuem um tanque capaz de armazenar a água da chuva, portanto, essas plantas precisam absorver as fontes de nitrogênio diluídas nas águas das chuvas imediatamente após suas folhas e/ou raízes entrarem em contato com os nutrientes. Já as bromélias com tanque, apesar de suas folhas estarem constantemente em contato com a água e os detritos orgânicos, enfrentam uma intensa competição pelos nutrientes existentes no interior da cisterna com as diversas comunidades de microorganismos viventes na água do tanque ou sobre a superfície de suas folhas. Por essa razão, as bromélias da fase adulta também precisam ser capazes de absorver rapidamente as fontes de nitrogênio presentes na cisterna imediatamente após a sua disponibilização.

Os resultados bioquímicos demonstraram que existe uma forte sincronização de todas as etapas do metabolismo do nitrogênio (absorção, transporte e assimilação) envolvendo diferentes partes do corpo das bromélias (raízes, porções foliares da base, mediana ou ápice) de ambas as fases de desenvolvimento, sugerindo que nos tecidos vegetais dessas plantas, existe uma fina regulação de todos os processos fisiológicos e metabólicos que compreendem o metabolismo do nitrogênio. Essa regulação controlada seria necessária para que as bromélias atmosféricas ou com tanque desenvolvido consigam absorver, transportar e assimilar as fontes de nitrogênio rapidamente e com grande eficiência. A rapidez para se metabolizar as fontes de nitrogênio pode ser considerada uma característica adaptativa fundamental para que as bromélias de ambas as fases de desenvolvimento consigam usufruir ao máximo dos momentos esporádicos em que as fontes de nitrogênio ficam disponíveis no ambiente epífita como, por exemplo, nos períodos de precipitação.

Algumas características como a compartimentalização de funções entre diferentes porções das folhas ou a preferência por fontes nitrogenadas inorgânicas pelas bromélias jovens e orgânicas pelas plantas adultas podem ser consideradas características hereditárias e não adquiridas devido ao

desenvolvimento do tanque. A divisão de funções do metabolismo do nitrogênio, onde a base da folha é preferencialmente responsável pela absorção de fontes nitrogenadas, redução do nitrato e hidrólise da ureia e o ápice seja responsável pela assimilação do amônio, foi uma característica observada nas folhas das bromélias em ambas as fases de desenvolvimento. Com relação a preferência por fontes nitrogenadas inorgânicas ou orgânicas, neste trabalho, as diferentes fontes nitrogenadas sempre foram fornecidas com a mesma concentração de nitrogênio total (5mM), portanto as diferenças observadas na absorção e assimilação dos diferentes tipos de fontes de nitrogênio podem estar diretamente relacionadas com a capacidade ou a preferência fisiológica em que as bromélias em diferentes fases de desenvolvimento estejam melhores adaptadas a utilizarem.

Para finalizar, o novo termo “bromélia epífita jovem sem tanque” foi sugerido para se referir à bromélia *V. gigantea* na fase juvenil ao invés de “bromélia epífita atmosférica”. As raízes dessa bromélia jovem demonstraram ter um papel fundamental nos processos de absorção e assimilação das fontes de nitrogênio, uma característica que geralmente não é atribuída para as raízes das bromélias com o hábito de vida atmosférico.

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, W.W. & MARTIN, C.E. Morphological changes accompanying the transition from juvenile (atmospheric) to adult (tank) forms in the Mexican epiphyte *Tillandsia deppeana* (Bromeliaceae). **Am. J. Bot.** 73: 1207-1214, 1986.
- ARIZ, I.; Cruz, C.; Moran, J.F.; Gonzáles-Moro, M.B.; García-Olaverri, C.; González-Murua, C.; Martins-Loução, M.A.; Aparicio-Tejo, P.M. Depletion of the heaviest stable nitrogen isotope is associated with $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ toxicity in NH_4^+ -fed plants. **BMC Plant Biology**, 11: 83-96, 2011.
- AWASTHI, O.P.; Sharma, E.; Palni, M.S. Stemflow: a source of nutrients in some naturally growing epiphytic orchids of the Sikkim Himalaya. **Annals of Botany**, 75: 5-11, 1995.
- BENZING, D.H. & Burt, K.M. Foliar permeability among twenty species of the Bromeliaceae. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, 97 (5): 269-279, 1970.
- BENZING, D.H. & RENFROW, A. The mineral nutrition of Bromeliaceae. **Bot. Gaz.** 135 (4): 281-288, 1974.
- BENZING, D.H. Foliar permeability and the absorption of minerals and organic nitrogen by certain tank bromeliads. **Bot. Gaz.**, 131 (1): 23-31, 1970.
- BENZING, D.H. Mineral nutrition and related phenomena in Bromeliaceae and Orchidaceae. **Quant. Review Biol.** 48: 277-290, 1973.
- BENZING, D.H. **Vascular epiphytes, general biology and related biota**. Ashton, P.S. (ed), Cambridge, Cambridge University Press, 1990.
- BENZING, D.H.. **Bromeliaceae: profile of na adaptative radiation**. Cambridge. Cambridge University, 2000.
- BENZING, D.H.; Henderson, K.; Kessel, B.; Sulak, J. The absorptive capacities of bromeliad trichomes. **Amer. J. Bot.**, 63 (7): 1009-1014, 1976.

- BIELA, A.; Grote, K.; Otto, B.; Hoth, S.; Hedrich, R.; Kaldenhoff, R. The *Nicotiana tabacum* plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercury-insensitive and permeable for glycerol. **Plant Journal**, 18: 565-570, 1999.
- BLACKWELL, R.D.; Murray, A.J.S.; Lea, P.L.; Kendall, A.C.; Hall, N.P.; Turner, J.C.; Wallsgrove, R.M. The value of mutants unable to carry out photorespiration. **Photosynth. Res.**, 16: 155-176, 1988.
- BRITTO, D.T. & Kronzucker, H.J. NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. **J.Plant Physiol.** 159: 567-584, 2002.
- CAMBUÍ, C.A. & Mercier, H. Organic nitrogen nutrition in plants. **Current Topics in Plant Biology**, 7: 13-17, 2006.
- CAMBUÍ, C.A.; Gaspar, M.; Mercier, H. **Absorção e assimilação da uréia pela bromélia epífita com tanque *Vriesea gigantea***. Dissertação (Doutorado em Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- CAMMAERTS, D. & JACOBS, M. A study of the role of glutamate dehydrogenase in the nitrogen metabolism of *Arabidopsis thaliana*. **Planta** 163: 517-526, 1985.
- CÁRDENAS-NAVARRO, R.; Adamowicz, S.; Robin, P. Diurnal nitrate uptake in young tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants: test of a feedback-based model. **Journal of Experimental Botany**, 49 (321): 721-730, 1998.
- CHAUMONT, F.; Barrieu, F.; Jung, R.; Jung, R.; Chrispeels, M.J. Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity. **Plant Physiology**, 122 (4): 1025-1034, 2000.
- CRAINE, J.M.; Elmore, A.J.; Aidar, M.P.M.; Bustamante, M.; Dawson, T.E.; Hobbie, E.A.; Kahmen, A.; Mack, M.C.; McLauchlan, K.K.; Michelsen, A.; Nardoto, G.B.; Pardo, L.H.; Peñuelas, J.; Reich, P.B.; Schuur, E.A.G.; Stock, W.D.; Templer, P.H.; Virginia, R.A.; Welker, J.M.; Wright, I.J. Global patterns of foliar nitrogen isotopes and their relationships with climate, mycorrhizal fungi, foliar nutrient concentrations, and nitrogen availability. **New Phytologist** (2009) doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02917.x

- DAWSON, T.E.; Mambelli, S.; Plamboeck, A.H.; Templer, P.H.; Tu, K.P. Stable isotopes in plant ecology. **Annu. Rev. Ecol. Syst.** 33: 507-559, 2002.
- ENDRES, L. & MERCIER, H. Amino acid uptake and profile in bromeliads with different habits cultivated *in vitro*. **Plant Physiol. Biochem.** 41: 181-187, 2003.
- ENDRES, L. & MERCIER, H. Ammonium and urea as nitrogen sources for bromeliads. **J. Plant Physiol.** 158: 205-212, 2001b.
- ENDRES, L. & MERCIER, H. Influence of nitrogen forms on the growth and nitrogen metabolism of bromeliads. **J. Plant Nutr.** 24 (1): 29-42, 2001a.
- FARNDEN, K.J.S. & ROBERTSON, J.G. **Methods for studying enzyme involved in metabolism related to nitrogenase.** *In*: BERGSEN, F.J. (ed.). **Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation.** John Wiley & Sons Ltd.; p. 279-286, 1980.
- FENG, J.; Volk, R.J.; Jackson, W.A. Inward and outward transport of ammonium in roots of maize and sorghum: contrasting effects of methionine sulphoximine. **Journal of Experimental Botany**, 45: 429-439, 1994.
- FIELD, C. & MOONEY, H.A. The photosynthesis-nitrogen relationship in wild plants. *In*: Givnish, T.J. ed. *On the economy of plant form and function.* Cambridge: Cambridge University Press, 25-55, 1986.
- FRESCHI, L.; Takahashi, C.A.; Cambuí, C.A.; Semprebom, T.R.; Fonseca, A.B.P; Mito, P.T.; Versieux, L.M.; Calvente, A.M.; Lantansio-Aidar, S.R.; Aidar, M.P.M; Mercier, H. Leaf portions of the tank bromeliad *Guzmania monostachia* answer differentially during CAM induction by drought. **J. Plant. Physiol.**, 167: 526-533, 2010.
- GASPAR, M.; Bousser, A.; Sissoëff, Igor; Roche, O.; Hoarau, J.; Mahé, A. Cloning and characterization of *Zm PIP1-5b*, an aquaporin transporting water and urea. **Plant Science**, 163: 21-31, 2003.
- GEGENBAUER, C.; Mayer, V.E.; Zotz, G.; Richter, A. Uptake of ant-derived nitrogen in the myrmecophytic orchid *Caularthron bilamellatum*. **Annals of Botany**, 110 (4): 757-766, 2012.

- GERENDÁS, J. & SATTELMACHER, B. Influence of Ni supply on growth and nitrogen metabolism of *Brassica napus* L. grown with NH₄NO₃ or urea as N source. **Ann. Bot.** 83: 65-71, 1999.
- GLASS, A.D.M.; Britto, D.T.; Kaiser, B.N.; Kinghorn, J.R.; Kronzucker, H.J.; Kumar, A.; Okamoto, M.; Rawat, S.; Siddiqi, M.Y.; Unkles, S.E.; Vidmar, J.J. The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. **Journal of Experimental Botany**, 53 (3170): 855-864, 2002.
- GONÇALVES, A.Z.; Mercier, H.; Mazzafera, P.; Romero, G.Q. Spider-fed bromeliads: seasonal and interspecific variation in plant performance. **Annals of Botany**, 107: 1047-1055, 2011.
- HANDLEY, L.L. & RAVEN, J.A. The use of natural abundance of nitrogen isotopes in plant physiology and ecology. **Plant, Cell and Environment** 15: 965-985, 1992.
- HELDT, H-W. Nitrate assimilation. In HELDT, H-W., **Plant Biochemistry & Molecular Biology**, Oxford University Press, p. 247-276, 1997.
- HIETZ, P.; Wanek, W.; Popp, M. Stable isotopic composition of carbon and nitrogen and nitrogen content in vascular epiphytes along an altitudinal transect. **Plant, Cell and Environment** 22: 1435-1443, 1999.
- HOGAN, M.E.; Swift, I.E.; Done, J. Urease assay and ammonia release from leaf tissues. **Phytochemistry** 22: 663-667, 1983.
- HOWITT, S.M. & Udvardi, M.K. Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1465: 152-170, 2000.
- INSELSBACHER, E.; Cambuí, C.A.; Richter, A.; Stange, C.F.; Mercier, H.; Wanek, W. Microbial activities and foliar uptake of nitrogen in the epiphytic bromeliad *Vriesea gigantea*. **New Phytol.** 175: 311-320, 2007.
- JACKSON, W.A. & VOLK, R.J. Attributes of the nitrogen uptake systems of maize (*Zea mays* L.): maximal suppression by exposure to both nitrate and ammonium. **New Phytologist** 130(3): 327-335, 1995.

- JAWORSKI, E. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 43 (6): 1274-1279, 1974.
- JOHANSSON, U.; Karlsson, M.; Johansson, I.; Gustavsson, S.; Sjövall, S.; Frayse, L.; Weig, A.R.; Kjellbom, P. 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, 2001.
- KALAMAKI, M.S.; Merkouropoulos, G.; Kanellis, A.K. Can ornithine accumulation modulate abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*? **Plant Signaling & Behavior**, 4 (11): 1099-1101, 2009.
- KING, B.J.; Siddiqi, M.Y.; Ruth, T.J.; Warner, R.L.; Glass, A.D.M. Feedback regulation of nitrate influx in barley roots by nitrate, nitrite and ammonium. **Plant Physiology**, 102: 1279-1286, 1993.
- KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination for orchid seed. **Amer. Orch. Soc. Bull.** 15: 214-217, 1946.
- LAM, H.M.; Coschiagano, K.T.; Oliveira, I.C.; Melo-Oliveira, R.; Coruzzi, G.M. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, 47: 569-593, 1996.
- LASA, B.; Frechilla, S.; Aparicio-Tejo, P.M.; Lamsfus, C. Role of glutamate dehydrogenase and phosphoenolpyruvate carboxylase activity in ammonium nutrition tolerance in roots. **Plant Physiol. Biochem.**, 40: 969-976, 2002.
- LAWLOR, D.W. Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production systems. **J. Exp. Bot.** 53 (370): 773-787, 2002.
- LEA, P.J. **Nitrogen metabolism**. In: LEA, P.J. & LEEGOOD, R.C. (eds.). **Plant Biochemistry and Molecular Biology**. 1^a ed. England: John Wiley & Sons Ltda.; pp: 155-180, 1993.

- LEHNINGER, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. **Biossíntese de aminoácidos, nucleotídeos e moléculas relacionadas**. In: LEHNINGER, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. (eds.). **Princípios de Bioquímica**. 2ª ed. São Paulo: Savier Editora de Livros Médicos Ltda. p. 514-551, 2000.
- LEJAY, L.; Tillard, P.; Lepetit, M.; Olive, F.D.; Filleur, S.; Daniel-Vedele, F.; Gojon, A. Molecular and functional regulation of two NO₃⁻ uptake systems by N- and C-status of *Arabidopsis* plants. **The Plant Journal**, 18: 509-519, 1999.
- LEME E.M.C. & MARIGO, L. C. **Bromélias na natureza**. Marigo Comunicação Visual Ltda. Rio de Janeiro, 1993.
- LIU, L.; Ludewig, U.; Frommer, W.B.; von Wiren, N. At DUR3 encodes a new type of high affinity Urea/H⁺ symporter in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, 15: 790-800, 2003.
- LOPEZ, F.; Bousser, A.; Sissoëff, I.; Gaspar, M.; Lachaise, B.; Hoarau, J.; Mahé, A. Diurnal regulation of water transport and aquaporina gene expression in maize roots: contribution of PIP2 proteins. **Plant Cell Physiol.**, 44 (12): 1384-1395, 2003.
- MA, J.F.; Tamai, K.; Yamaji, N.; Mitani, N.; Konish, S.; Katsuhara, M.; Ishiguro, M.; Murata, Y.; Yano, M. A silicon transporter in rice. **Nature**, 440: 688-691, 2006.
- MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; Valadier, M.H.; Carrayol, E.; Reisdorf-Cren, M. and Hirel, B. Diurnal changes in the expression of glutamate dehydrogenase and nitrate reductase are involved in the C/N balance of tobacco source leaves. **Plant Cell Environ.** 25: 1451-1462, 2002.
- MCCULLOUGH, H. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. **Clin Chim Acta.** 17(2): 297-304, 1967.
- MIFLIN, B.J. & HABASH, D.Z. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. **J. Exp. Bot.** 53 (370): 979-987, 2002.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiol. Plant.** 15: 473-479, 1962.

- NADKARNI, N.M. & Primack, R.B. The use of gamma spectrometry to measure within-plant nutrient allocation of a tank bromeliad, *Guzmania lingulata*. **Selbyana**, 11: 22-25.
- NADKARNI, N.M. Epiphyte biomass and nutrient capital of a Neotropical elfin forest. **Biotropica**, 16: 249-256, 1984.
- NADKARNI, N.M. The nutritional effects of epiphytes on host trees with special reference to alteration of precipitation chemistry. **Selbyana**, 9: 44-51, 1986.
- NEAL, C.; Brian, R.; Neal, M.; Hill, L.; Wickham, H.; Pugh, B. Nitrogen in rainfall, cloud water, throughfall, stemflow, stream water and groundwater for the Plynlimon catchments of mid-Wales. **The Science of the Total Environment**, 314-316: 121-151, 2003.
- NICOULAUD, B.A.L. & BLOOM, A.J. Absorption and assimilation of foliarly applied urea in tomato. **J Am. Soc. Hortic. Sci.** 121: 1117-1121, 1996.
- NIEVOLA, C.C.; Mercier, H.; Majerowicz, N. Levels of nitrogen assimilation in bromeliads with different growth habits. **J. Plant Nutr.** 24(9): 1387-1398, 2001.
- NYMAN, L.P.; Davis, J.P.; O'Dell, S.J.; Arditti, J.; Stephens, G.C.; Benzing, D.H. Active uptake of amino acids by leaves of an epiphytic vascular plant, *Tillandsia paucifolia* (Bromeliaceae). **Plant Physiology**, 83: 681-684, 1987.
- OKAMOTO, M.; Vidmar, J.J.; Glass, A.D.M. Regulation of *NRT1* and *NRT2* gene families of *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate provision. **Plant Cell Physiology**, 44 (3): 304-317, 2003.
- OLIVARES, E. & MEDINA, E. Carbon dioxide exchange, soluble carbohydrates and acid accumulation in a fructan accumulating plant: *Fourcroya humboldtiana* Treal.. **J. Exp. Bot.** 41(226): 579-585, 1990.
- ONO, F.; Frommer, W.B.; von Wiren, N. Coordinated diurnal regulation of low- and high-affinity nitrate transporters in tomato. **Plant Biology**, 2: 17-23, 2000.
- ORSEL, M.; Filleur, S.; Fraissier, V.; Daniel-Vedele, F. Nitrate transport in plants: which gene and which control? **Journal of Experimental Botany**, 53 (370): 825-833, 2002.

- PADILHA, V. **Bromeliads**. New York, Crow Publishers Inc., 1973.
- PÉREZ-SOBA, M.; Stulen, I. & van der Eerden, L.J.M.. Effect of atmospheric ammonia on the nitrogen metabolism of Scots pine (*Pinus sylvestris*) needles. **Physiol. Plant.** 90: 629-636, 1994.
- PITTENDRIGH, C.S. The bromeliad-Anopheles-malaria complex in Trinidad. I. The bromeliad flora. *Evolution* 2: 58-89, 1948.
- POPP, M.; Janett, H-P.; Lüttge, U.; Medina, E. Metabolite gradients and carbohydrate translocation in rosette leaves of CAM and C3 bromeliads. **New Phytol.** 157: 649-656, 2003.
- RAI, A.N.; Rowell, P. & Stewart, W.D.P. Interactions between cyanobacterium and fungus during $^{15}\text{N}_2^-$ incorporation and metabolism in the lichen *Peltigera canina*. **Archives of microbiology** 134: 136-142, 1983.
- REICH, A.; Ewel, J.J.; Nadkarni, N.M.; Dawson, T.; Evans, R.D. Nitrogen isotope ratios shift with plant size in tropical bromeliads. **Oecologia** 137: 587-590, 2003.
- REIZER, J.; Reizer, A.; Saier Jr., M.H. A functional superfamily of sodium/solute symporters, **Biochim. Biophys. Acta**, 1197: 133-166, 1994.
- ROMERO, G.Q.; Mazzafera, P.; Vasconcellos-Neto, J.; Trivelin, P.C.O. Bromeliad-living spiders improve host plant nutrition and growth. **Ecology**, 87 (4): 803-808, 2006.
- ROMERO, G.Q.; Nomura, F.; Gonçalves, A.Z.; Dias, N.Y.N.; Mercier, H.; Conforto, E.C.; Rossa-Feres, D.C. Nitrogen fluxes from treefrogs to tank epiphytic bromeliads: an isotopic and physiological approach. **Oecologia** 162: 162-941, 2010.
- RYAN, P.R. & Walker, N.A. The regulation of ammonia uptake in *Chara australis*. **Journal of Experimental Botany**, 45: 1057-1067, 1994.
- SAIER, M.H. A functional- phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 64: 354-411, 2000.
- SAKAI, W.S. & SANDFORD, W.G. Ultrastructure of the water-absorbing trichomes of pineapple (*Ananas comosus*, Bromeliaceae). **Ann. Bot.** 46: 7-11, 1980.

- SALAMA, A.M.S. E1-D. A. & WAREING. Effects of mineral nutrition on endogenous cytokinins in plants of sunflower (*Helianthus annuus* L.). **J. Exp. Bot.** 30: 971-981, 1979.
- SCHIMPER, A.F.W. Epiphytische Vegetation Amerikas, Bot. Mitt. Tropen II, 1888.
- SCHMIDT, G. & ZOTZ, G. Ecophysiological consequences of differences in plant size – *in situ* carbon gain and water relations of the epiphytic bromeliad, *Vriesea sanguinolenta*. **Plant, Cell and Environment** 24: 101-112, 2001.
- SCHMIDT, G.; Stuntz, S.; Zotz, G. Plant size – an ignored parameter in epiphyte ecophysiology. **Plant Ecology** 153: 65-72, 2001.
- SMITH, L.B. Geographical evidence on the lines of evolution in the Bromeliaceae. **Bot. Jahr.**, 66: 446-468, 1934.
- SODEK, L. **Metabolismo do Nitrogênio**. In: KERBAUY, G.B. (ed.). **Fisiologia Vegetal**. Primeira edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ; p. 94-113, 2004.
- STITT, M.; Müller, C.; Matt, P.; Gibon, Y.; Carillo, P.; Morcuende, R.; Scheible, W-R.; Krapp, A. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. **J. Exp. Bot.** 53 (370): 959-970, 2002.
- TAKAHASHI, C.A. & Mercier, H. Nitrogen metabolism in leaves of a tank epiphytic bromeliad: characterization of a spatial and functional division. **Journal of Plant Physiology** 168: 1208-1216, 2011.
- TAKAHASHI, C.A.; Ceccantini, G.C.T.; Mercier, H.. Differential capacity of nitrogen assimilation between apical and basal leaf portions of a tank epiphytic bromeliad. **Braz. J. Plant Physiol.** 19 (2): 119-126, 2007.
- TAKANO, J.; Wada, M.; Ludwig, U.; Schaaf, G.; von Wiren, N. Fujiwara, T. The *Arabidopsis* major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. **Plant Cell**, 18: 1498-1509, 2006.

- TAMAKI, V. & MERCIER, H.. Effects of different ammoniacal nitrogen sources on N-metabolism of the atmospheric bromeliad *Tillandsia pohliana* Mez. **Revta. Brasil. Bot.** 24 (4): 407-413, 2001.
- TRÉPANIÉ, M.; Lamy, M-P; Dansereau, B. Phalaenopsis can absorb urea directly through their roots. **Plant Soil** 319: 95-100, 2009.
- TURK E. & Wright, E.M. Membrane topology motifs in the SGLT cotransporters family. **J. Membr. Biol.**, 159: 1-20, 1997.
- von WIRÉN, N.; Lauter, F.R.; Ninnemann, O.; Gillissen, B.; Walch-Liu, P.; Engels, C.; Jost, W.; Frommer, W.B. Differential regulation of three functional ammonium transporter genes by nitrogen in root hairs and by light in leaves of tomato. **The Plant Journal**, 21: 176-175, 2000.
- WANG, W-H.; Köhler, B.; Cao, F-Q.; Liu, L-H. Molecular and physiological aspects of urea transport in higher plants. **Plant Science**, 175: 467-477, 2008.
- WANIA, R.; Hietz, P., Wanek, W. Natural ¹⁵N abundance of epiphytes depends on the position within the forest canopy: source signals and isotope fractionation. **Plant, Cell and Environment** 25: 581-589, 2002.
- WEATHERBURN, M.W. Phenol-Hypochlorite Reaction for Determination of ammonia. **Analytical Chemistry** 39: 971-974, 1967.
- WINKLER, U. & Zotz, G. Highly efficient uptake of phosphorus in epiphytic bromeliads. **Annals of Botany**, 103: 477-484, 2009.
- WITTE, C-P. & Medina-Escobar, N. In-gel detection of urease with nitroblue tetrazolium and quantification of the enzyme from different crop plants using the indophenol reaction. **Anal. Biochem.** 290: 102-107, 2001.
- WITTWER, S.H.; Bokovac, M.J.; Tukey, H.B. **Advances in foliar feeding of plant nutrients.** In MCVICKAR, M.H., (ed), **Fertilizer Technology and Usage.** Soil Science Society of America, Madison, WI, p. 429-455, 1963.

- YAMAYA, T.; Oaks, A.; Matsumoto, H. Characteristics of glutamate dehydrogenase in mitochondria prepared from corn shoots. **Plant Physiol.**, 76: 1009-1013, 1984.
- YONEYAMA, T.; Matsumaru, T.; Usui, K.; Engelaar, W.M.H.G. Discrimination of nitrogen isotopes during absorption of ammonium and nitrate at different nitrogen concentrations by rice (*Oryza sativa* L.) plants. **Plant, Cell and Environment** 24: 133-139, 2001.
- YUE, X.; Zhao, X.Y.; Fei, Y.; Zhang, X. Correlation of aquaporins and transmembrane solute transporters revealed by genome-wide analysis in developing maize leaf. **Comparative and Functional Genomics**, 2012: 14 páginas, 2012.
- ZOTZ, G. & ZIEGLER, H. Size related differences in carbon isotope discrimination in the epiphytic orchid, *Dimerandra emarginata*. **Naturwissenschaften** 86: 39-40, 1999.
- ZOTZ, G. Photosynthetic capacity increases with plant size. **Botanica Acta** 110: 306-308, 1997.
- ZOTZ, G.; Enslin, A.; Hartung, W.; Ziegler, H. Physiological and anatomical changes during the early ontogeny of the heteroblastic bromeliad, *Vriesea sanguinolenta*, do not concur with the morphological change from atmospheric to tank form. **Plant, Cell and Environment** 27: 1341-1350, 2004.
- ZOTZ, G.; Hietz, P. Schmidt, G. Small plants, large plants: the importance of plant size for the physiological ecology of vascular epiphytes. **J. Exp. Bot.** 52(363): 2051-2056, 2001.
- ZOTZ, G.; Reichling, P.; Valladares, F. A simulation study on the importance of size-related changes in leaf morphology and physiology for carbon gain in an epiphytic bromeliad. **Ann. Bot.** 90: 437-443, 2002.