



ATIVIDADE DA NITRATO REDUTASE NA BROMÉLIA *ALCANTAREA IMPERIALIS* (CARRIÈRE) HARMS CULTIVADA *IN VITRO* EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO

Flávia Maria Kazue Kurita Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais, Instituto de Botânica, São Paulo, SP
Doutaranda de Pós- Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica;
Vívian Tamaki Pesquisador Científico do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais, Instituto de Botânica, São Paulo, SP

INTRODUÇÃO

Alcantarea imperialis (Carrière) Harms, popularmente conhecida como bromélia imperial (Versieux e Wanderley, 2007), é uma espécie endêmica da Serra dos Órgãos, no Estado do Rio de Janeiro. Inúmeros exemplares de espécies de bromélias ornamentais são retirados ilegalmente da mata, como ocorre com *A. imperialis*, visto que se trata de uma espécie que está na lista da flora brasileira ameaçada de extinção na categoria “em perigo de extinção” (Biodiversitas, 2007), sendo necessárias medidas de conservação, assim o uso do cultivo *in vitro* pode ser uma ferramenta interessante para os estudos nutricionais da espécie. Um aspecto importante do cultivo *in vitro* é o suprimento mineral do meio de cultura, uma vez que a nutrição mineral é essencial para o crescimento e o desenvolvimento das plantas (Bunn et al., 2011). O N, segundo Marschner (1995), é o principal componente de aminoácidos, proteínas, ácidos nucléicos, clorofilas e coenzimas. Quando em deficiência, o N é translocado das folhas mais velhas, que apresentam clorose para as folhas jovens que apresentam um menor desenvolvimento. As duas principais fontes de nitrogênio encontradas no solo são o nitrato (NO₃⁻) e o amônio (NH₄⁺) (Jackson e Volk, 1995). O NO₃⁻ é absorvido pelas raízes apenas por processo ativo e, em seguida, reduzido nas folhas e raízes para NH₄⁺ pela enzima nitrato redutase (NR) onde é assimilado em aminoácidos e proteínas (Kerbaudy, 2008).

OBJETIVOS

O objetivo do trabalho foi de analisar a atividade diurna e noturna da NR de *A. imperialis* sob cultivo *in vitro* com diferentes concentrações de nitrogênio.

MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram realizados no Laboratório do Núcleo de Pesquisas em Plantas Ornamentais, do Instituto de Botânica, da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. As plântulas obtidas *in vitro* foram depositadas nos tratamentos com meio de Murashige e Skoog (1962-MS) nas concentrações de 5 mM de N (4,375 mM de NO₃⁻ e 0,625 mM de NH₄⁺), 15 mM de N (9,375 mM de NO₃⁻ e 5,625 mM de NH₄⁺), 30 mM de N (16,875 mM de NO₃⁻ e 13,125 mM de NH₄⁺), e 60 mM de N (31,875 mM de NO₃⁻ e 28,125 mM de NH₄⁺). As coletas foram realizadas de 4 em 4 horas durante 24 horas após a transferência, que se iniciou as 10h, sendo o fotoperíodo de 12 horas (início às 5h e término às 17h). Foram utilizadas 150 plantas por tratamento e foram mantidas em sala de cultura com fotoperíodo de 12 horas com luminosidade de 30 µmol.m⁻².s⁻¹ e a temperatura média de 26±2 °C. A atividade da nitrato redutase (NR) *in vivo* foi determinada de acordo com o método descrito por Jaworski (1971). As porções das folhas

coletadas de uma amostra composta de 150 plantas foram picadas em porções de 0,25 a 0,5 g e foram depositadas em tubos de ensaio adicionados de 6 ml de solução de incubação, tal procedimento foi realizado em duplicata. A solução de incubação foi constituída por tampão fosfato 0,1 M, contendo 1% propanol, 25 mM KNO₃ e pH 6,5. O tecido vegetal foi mantido submerso na solução de incubação e os tubos foram submetidos a vácuo para facilitar a infiltração da solução tampão nos tecidos, após esse procedimento, foram utilizados 1ml de cada tubo, que foram incubados a 30 °C na ausência de luz durante 90 minutos. Decorrido o período de incubação, a quantidade de íons nitrito, liberada no meio de infiltração, foi determinada em alíquotas de 1 ml acrescidas de 0,3 ml de sulfanilamida 1% em HCl 3 M e 0,3 ml de N-naftil-etileno-diamino a 0,2%. A determinação do nitrito produzido ocorreu 30 minutos (tempo de reação) após a adição desses reagentes às alíquotas. Findo esse período, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro a 540nm. As médias dos valores obtidos foram submetidas à análise de variância (ANOVA), sendo comparadas pelo teste Tukey em nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS

As atividades da NR medidas nas plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas em diferentes concentrações de N mostram que nas primeiras 8 horas após a transferência para os tratamentos, as plantas depositadas em 60 mM de N apresentaram as maiores atividades quando comparadas as outras concentrações. Em seguida, quando se observa os resultados após 12 horas da coleta, as plantas crescidas em 5, 15 e 30 mM de N continuaram a ter um aumento da atividade da enzima, resultado oposto ao das plantas em 60 mM que tiveram uma redução na atividade enzimática. Já nas horas subsequentes, as plantas cultivadas em todas as concentrações tiveram uma diminuição acentuada na atividade da NR até as 24^a hora.

DISCUSSÃO

De acordo Zonia *et al.* (1995) a disponibilidade de nitrato, pode influenciar positivamente na atividade da NR, pois o nitrato é o substrato da enzima estudada, o que pode explicar as maiores atividades de NR observadas nas plantas do presente trabalho na presença de maior concentração de nitrogênio. Isso também foi observado por Reis *et al.* (2007) em folhas do cafeeiro, que mostraram uma maior atividade da NR com o aumento do teor de nitrogênio. Porém, as maiores atividades da NR ocorreram no escuro, isto provavelmente pode estar relacionado à presença das reservas produzida durante o período com luz que são usadas para ativar a NR no escuro, como foi descrito por Queiroz *et al.* (1993) ao analisarem o ritmo diurno da NR em plantas de café.

CONCLUSÃO

Conclui-se que há atividade de NR nas folhas das plantas de *A. imperialis* cultivadas *in vitro*, sendo maior em 60 mM de N e durante o período de escuro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Biodiversitas. 2007. Lista da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção.

Bunn, E., Turner, S.R., Dixon, K.W. 2011. Biotechnology for saving rare and threatened florain a biodiversity hotspot. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 47:188-200.

Jackson, W.A., Volk, R.J. 1995. 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.

Jaworski, E. 1974. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 43 (6): 1274-1279.

Kerbauy, G. 2008. *Fisiologia Vegetal*. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 431p.

Marschner, H. 1995. *Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press: London. 889p.

Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

Versieux, L.M., Wanderley, M.G.L. 2007. Two new species of *Alcantarea* (Bromeliaceae, Tillandsioideae) from Brazil. *Brittonia* 59: 57-64.

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.

Queiroz, C.G.S., Rena, A.B., Cordeiro, A.T., Alves, J.D. 1993. Ritmo diurno na atividade da redutase de nitrato em folhas e raízes de *Coffea arabica* L. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 28:787-795

Reis, A.R., Junior, E.F., Haga, K.I. 2007. Atividade da redutase do nitrato em folhas de café em função da adubação nitrogenada. *Acta Sci. Agron.* 29(2): 269-276.

Agradecimento

Instituição Financiadora: Fapesp- Processo 2011/09116-6