



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANDERSON KIKUCHI CALZAVARA

**BACTÉRIAS ASSOCIATIVAS AUMENTAM A TOLERÂNCIA
AO AMÔNIO E À DEFICIÊNCIA DE NITROGÊNIO DE
MUDAS DE ESPÉCIES ARBÓREAS DA MATA ATLÂNTICA**

Londrina
2020

ANDERSON KIKUCHI CALZAVARA

**BACTÉRIAS ASSOCIATIVAS AUMENTAM A TOLERÂNCIA
AO AMÔNIO E À DEFICIÊNCIA DE NITROGÊNIO DE
MUDAS DE ESPÉCIES ARBÓREAS DA MATA ATLÂNTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Pimenta.
Coorientador: Profa. Dra. Renata Stolf-Moreira.

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

AN552 Calzavara, Anderson.

Bactérias associativas aumentam a tolerância ao amônio e à deficiência de nitrogênio de mudas de espécies arbóreas da Mata Atlântica / Anderson Calzavara. - Londrina, 2020.
121 f. : il.

Orientador: José Antonio Pimenta.

Coorientador: Renata Stolf-Moreira.

Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2020.

Inclui bibliografia.

1. Metabolismo do nitrogênio - Tese. 2. Bactérias promotoras do crescimento de plantas - Tese. 3. Azospirillum brasilense - Tese. 4. Mata Atlântica - Tese. I. Antonio Pimenta, José. II. Stolf-Moreira, Renata. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU 58

ANDERSON KIKUCHI CALZAVARA

**BACTÉRIAS ASSOCIATIVAS AUMENTAM A TOLERÂNCIA AO
AMÔNIO E À DEFICIÊNCIA DE NITROGÊNIO DE MUDAS DE
ESPÉCIES ARBÓREAS DA MATA ATLÂNTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Antonio Pimenta
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira
Embrapa Soja - Londrina

Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Cristiano Medri
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Artur Berbel Lirio Rondina
Centro Universitário das Faculdades
Integradas de Ourinhos - UNIFIO

Londrina, 13 de fevereiro de 2020.

AGRADECIMENTOS

À minha família, Adriana, Cássia, Elzira, Gil, Gilvan e Júlia, minha noiva, Tatiane, e ao Leonardo, Milton e Prescila, pelo amor, amizade, incentivo e ensinamentos ao longo de minha vida.

Aos meus amigos, Adriano, Artur, Denis, Diego, Farol, Henrique, Marcelo, Mariana e Mário, pela amizade, apoio e ótimos momentos vivenciados.

Aos amigos de laboratório, Alexandre, André, Angélica, Bruno, Diego, Hilton, Ingrid, Karina, Lara, Letícia, Louise, Mariana, Natália, Rafael e Patrícia, pela amizade, conversas e auxílio nas desmontagens de experimentos e nas análises em laboratório. Agradeço, em especial, à Ingrid, por ter realizado grande parte dos experimentos e análises do primeiro capítulo desta tese, e à Mariana, por ter acompanhado praticamente todas as etapas deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Antonio Pimenta, e coorientadora, Profa. Dra. Renata Stolf-Moreira, pela paciência, atenção e orientação ao longo do doutorado.

Aos professores do laboratório de Ecofisiologia Vegetal da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Edmilson, Halley, Pimenta e Renata, e ao Moacyr, pela amizade e orientações durante toda minha experiência acadêmica.

Aos Profs. Drs. Edmilson Bianchini, Halley Caixeta de Oliveira e Weliton José da Silva, pelas sugestões na qualificação.

Aos Drs. José Antonio Pimenta, Marcn Antonio Nogueira, André Luiz Martinez de Oliveira, Cristiano Medri e Artur Berbel Lirio Rondina, pela composição da banca de defesa de tese.

Aos professores do curso de Ciências Biológicas da UEL, por todos os ensinamentos ao longo da graduação e pós-graduação.

Ao Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas da UEL, seus técnicos e professores, por fornecerem sementes, mudas e informações importantes para a realização dos experimentos.

Ao Laboratório de Ecofisiologia Animal da UEL, seus técnicos, professores e alunos, que colaboraram com equipamentos, materiais e instruções para diversas análises laboratoriais.

Ao Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira e ao Núcleo de Pesquisa para o Desenvolvimento e Aplicação de Biofertilizantes da UEL, por fornecerem os microrganismos utilizados neste estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, por viabilizar a realização do mestrado e doutorado.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

"This study was nanced in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001"

CALZAVARA, Anderson Kikuchi. **Bactérias associativas aumentam a tolerância ao amônio e à deficiência de nitrogênio de mudas de espécies arbóreas da Mata Atlântica**. 2020. 121 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

O cultivo com nitrato (NO_3^-) ou amônio (NH_4^+), a falta de nitrogênio (N) e a associação com bactérias promotoras do crescimento em plantas (BPCP) influenciam o metabolismo, a fotossíntese e o crescimento vegetal, por meio de mecanismos diversos. Neste estudo, objetivou-se verificar se a inoculação com BPCP melhora a performance de espécies arbóreas de diferentes grupos ecológicos que ocorrem na floresta estacional semidecidual da Mata Atlântica quando cultivadas com NH_4^+ ou sob restrição de nitrogênio. Foram estudadas quatro espécies vegetais, sendo duas intolerantes à sombra – *Cecropia pachystachya* e *Heliocarpus popayanensis* – e duas tolerantes à sombra – *Cariniana estrellensis* e *Cabralea canjerana*. Foram realizados dois experimentos. No primeiro, as mudas foram cultivadas em areia com NO_3^- ou NH_4^+ como fonte exclusiva de N e, no segundo, o cultivo foi feito em solo misturado com areia com ou sem suplementação de NH_4NO_3 . Em ambos os experimentos, as mudas foram também inoculadas com as estirpes Ab-V5, de *Azospirillum brasilense*, ou ZK, de *Bacillus velezensis*. Como controle, parte das mudas não foi inoculada com BPCP (Nin). Dessa forma, foram testados os efeitos do N (diferentes fontes ou deficiência de N), da inoculação e da interação entre estes fatores sobre variáveis do metabolismo do N, fotossintéticas e de crescimento das mudas. Em média, mudas de *C. canjerana* apresentaram aumento de 13% na massa seca total quando inoculadas com Ab-V5 ou ZK, independentemente do tratamento de N, crescimento que foi verificado em ambos os experimentos. Mudas de *H. popayanensis*, que apresentaram sintomas de toxicidade ao cultivo com NH_4^+ , como a diminuição de 58% na assimilação líquida de CO_2 e de 70% na massa seca total, demonstraram maior tolerância a este cátion quando inoculadas com ambas as estirpes bacterianas, verificada pela manutenção da fotossíntese e do crescimento de suas mudas em relação ao cultivo com NO_3^- . A deficiência de N limitou a fotossíntese em todas as espécies arbóreas, além de diminuir a concentração de moléculas nitrogenadas e a atividade de enzimas do metabolismo do N. Em *C. pachystachya*, a inoculação com Ab-V5 levou ao aumento do crescimento de suas mudas, que foi mais expressivo sob suplementação de N (aumento de 70%) do que sob restrição deste nutriente (aumento de 35%). Todas as espécies vegetais apresentaram algum grau de influência dos fatores (N e inoculação), especialmente sobre variáveis metabólicas. Portanto, a inoculação influencia a fotossíntese, o crescimento e o metabolismo do N de mudas das espécies arbóreas. Porém, os efeitos da inoculação são influenciados pela fonte e quantidade de N durante o cultivo das mudas. A inoculação com BPCP tem grande potencial para estimular o crescimento de mudas de espécies arbóreas do bioma Atlântico em condições de suficiência ou deficiência de N no solo, e também em solos com predominância de NH_4^+ .

Palavras-chave: *Azospirillum brasilense*, *Bacillus velezensis*, Mata Atlântica, metabolismo do nitrogênio, sucessão ecológica, trocas gasosas.

CALZAVARA, Anderson Kikuchi. **Associative bacteria increase tolerance to ammonium and nitrogen deficiency of seedlings of Atlantic Forest tree species.** 2020. 121pp. Thesis (Doctorate in Biological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

The cultivation with nitrate (NO_3^-) or ammonium (NH_4^+), the lack of nitrogen (N) and the association with plant growth-promoting bacteria (PGPB) influence plant metabolism, photosynthesis and growth, through various mechanisms. This study aimed to verify whether PGPB improves the performance of tree species from different ecological groups that occur in the semideciduous seasonal forest of the Atlantic biome when grown with NH_4^+ or under N restriction. Four species were chosen: two shade-intolerant – *Cecropia pachystachya* and *Heliocarpus popayanensis* – and two shade-tolerant – *Cariniana estrellensis* and *Cabralea canjerana*. Two experiments were carried out. In the first, the seedlings were grown in sand with NO_3^- or NH_4^+ as exclusive N source and, in the second, the cultivation was done in soil mixed with sand with or without supplementation of NH_4NO_3 . In both experiments, the seedlings were also inoculated with the strains Ab-V5, of *Azospirillum brasilense*, or ZK, of *Bacillus velezensis*. As control, part of the seedlings was not inoculated with PGPB (Nin). Thus, the effects of N (different sources or N deficiency), inoculation and the interaction between these factors on N metabolism, photosynthetic and growth variables were tested. On average, *C. canjerana* seedlings showed a 13% increase in total dry mass when inoculated with Ab-V5 or ZK, regardless of the N treatment, which was verified in both experiments. Seedlings of *H. popayanensis*, which presented toxicity symptoms to NH_4^+ , such as a 58% decrease in net CO_2 assimilation and a 70% decrease in total dry mass, showed higher tolerance to this cation when inoculated with both bacterial strains, verified by the maintenance of photosynthesis and growth in relation to cultivation with NO_3^- . Nitrogen deficiency limited photosynthesis in all tree species, besides decreasing the concentration of nitrogen molecules and the activity of enzymes of N metabolism. In *C. pachystachya*, inoculation with Ab-V5 led to increased growth, which was more pronounced under N supplementation (increase of 70%) than under restriction of this nutrient (increase of 35%). All plant species showed some degree of influence by the factors (N and inoculation), especially on metabolic variables. Therefore, inoculation with PGPB influences photosynthesis, growth and N metabolism of the tree species. However, the source and amount of N during seedling cultivation influence the effects of inoculation. Inoculation with PGPB has great potential to stimulate the growth of seedlings of tree species of the Atlantic biome under sufficient or deficient N supply and also in soils with NH_4^+ predominance.

Key-words: Atlantic Rainforest, *Azospirillum brasilense*, *Bacillus velezensis*, ecological succession, gas-exchange, nitrogen metabolism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1** – Árvores de *Cecropia pachystachya* (A), *Heliocarpus popayanensis* (B), *Cariniana estrellensis* (C) e *Cabralea canjerana* (D). Disponíveis, respectivamente, em: <https://arvores.brasil.nom.br>; <https://commons.wikimedia.org>; <https://klimanaturale.org>; <https://mercadodasmudas.com.br>. 32

CAPÍTULO 1

- Figura 1** – Eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) de mudas de *Cariniana estrellensis* (A) e *Cabralea canjerana* (B) cultivadas com NO_3^- ou NH_4^+ , não inoculadas com bactérias (Nin), ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. As barras são médias \pm erros-padrão. Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos de N, de acordo com a ANOVA (teste F ; $***P < 0,001$; $n = 15$). Médias com letras iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação (*Tukey HSD*; $P < 0,05$; $n = 10$) 55
- Figura 2** – Assimilação líquida de CO_2 (A_{max}) e condutância estomática (g_s) de mudas de *Cecropia pachystachya* (A e B), *Heliocarpus popayanensis* (C e D), *Cariniana estrellensis* (E e F) e *Cabralea canjerana* (G e H) cultivadas com NO_3^- ou NH_4^+ , não inoculadas com bactérias (Nin), ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. As barras são médias \pm erros-padrão. Nas colunas pretas, asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos de N, de acordo com a ANOVA (teste F ; $*P < 0,05$; $**P < 0,01$; $***P < 0,001$; $n = 30$). Nas colunas brancas, médias com letras iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação (*Tukey HSD*; $P < 0,05$; $n = 20$). Nas colunas cinzentas, médias com letras maiúsculas (NO_3^-) ou minúsculas (NH_4^+) iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação, e asteriscos indicam diferença

significativa entre os tratamentos de N dentro de cada tratamento de inoculação (*Tukey HSD*; $P < 0,05$; $n = 10$) 56

Figura 3 – Massa seca da raiz, da parte aérea e total de mudas de *Heliocarpus popayanensis* (A-C) e *Cabralea canjerana* (D-F) cultivadas com NO_3^- ou NH_4^+ , não inoculadas com bactérias (Nin), ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. As barras são médias \pm erros-padrão. Nas colunas pretas, asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos de N, de acordo com a ANOVA (teste *F*; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; $n = 30$). Nas colunas brancas, médias com letras iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação (*Tukey HSD*; $P < 0,05$; $n = 20$). Nas colunas cinzas, médias com letras maiúsculas (NO_3^-) ou minúsculas (NH_4^+) iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação, e asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos de N dentro de cada tratamento de inoculação (*Tukey HSD*; $P < 0,05$; $n = 10$)..... 58

CAPÍTULO 2

Figura 1 – Eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II, ao meio dia (*F_v/F_m MD*), de mudas de *Cariniana estrellensis* (A) e *Cabralea canjerana* (B) cultivadas com (N+) ou sem (N-) adição de N, não inoculadas com bactérias (Nin), ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. As barras são médias \pm erros-padrão. Nas colunas cinzas, médias com letras maiúsculas (N+) ou minúsculas (N-) iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação. Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos de N dentro de cada tratamento de inoculação (*Tukey HSD*; $P < 0,05$; $n = 5$) 89

Figura 2 – Assimilação líquida de CO_2 (*A_{max}*), condutância estomática (*g_S*), eficiência no uso da água (*EUA*) e concentração intercelular de CO_2 (*C_i*) de mudas de *Cecropia pachystachya* (A-C), *Heliocarpus popayanensis* (E-G), *Cariniana estrellensis* (H-K) e *Cabralea canjerana* (L e M) cultivadas com (N+) ou sem (N-) adição de N, não inoculadas com bactérias (Nin), ou inoculadas

com Ab-V5 ou ZK. As barras são médias \pm erros-padrão. Nas colunas pretas, asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos de N, de acordo com a ANOVA (teste F; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; $n = 30$). Nas colunas brancas, médias com letras iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação (Tukey HSD; $P < 0,05$; $n = 20$) 90

Figura 3 – Área foliar, massa seca total e razão de massa seca raiz/parte aérea (R/PA) de mudas de *Cecropia pachystachya* (A-C), *Heliocarpus popayanensis* (D-F), *Cariniana estrellensis* (G-I) e *Cabralea canjerana* (J-L) cultivadas com (N+) ou sem (N-) adição de N, não inoculadas com bactérias (Nin), ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. As barras são médias \pm erros-padrão. Nas colunas pretas, asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos de N, de acordo com a ANOVA (teste F; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; $n = 30$). Nas colunas brancas, médias com letras iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação (Tukey HSD; $P < 0,05$; $n = 20$). Nas colunas cinzentas, médias com letras maiúsculas (N+) ou minúsculas (N-) iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação, e asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos de N dentro de cada tratamento de inoculação (Tukey HSD; $P < 0,05$; $n = 10$) 91

LISTA DE TABELAS

(CAPÍTULO 1)

- Tabela 1** – Variáveis bioquímicas de mudas de *Cecropia pachystachya*, *Heliocarpus popayanensis*, *Cariniana estrellensis* e *Cabralea canjerana* cultivadas com NO_3^- ou NH_4^+ . Os valores são médias \pm erros-padrão. Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos de N, de acordo com a ANOVA (teste F ; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; $n = 15$ [metabólitos da seiva do xilema: $n = 9$]). ANR – atividade da nitrato redutase 59
- Tabela 2** – Variáveis bioquímicas de mudas de *Cecropia pachystachya*, *Heliocarpus popayanensis* e *Cariniana estrellensis* não inoculadas com bactérias (Nin), ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. Os valores são médias \pm erros-padrão. Médias com letras iguais nas linhas não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação (*Tukey HSD*; $P < 0,05$; $n = 10$ [metabólitos da seiva do xilema: $n = 6$]). ANR – atividade da nitrato redutase 60
- Tabela 3** – Variáveis bioquímicas de mudas de *Cecropia pachystachya*, *Heliocarpus popayanensis*, *Cariniana estrellensis* e *Cabralea canjerana* cultivadas com NO_3^- ou NH_4^+ , não inoculadas com bactérias (Nin), ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. Os valores são médias \pm erros-padrão. Para cada variável, médias com letras minúsculas iguais nas colunas não diferem significativamente entre os tratamentos de N; e médias com letras maiúsculas iguais nas linhas não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação (*Tukey HSD*; $P < 0,05$; $n = 5$ [metabólitos da seiva do xilema: $n = 3$]). ANR – atividade da nitrato redutase 61

(CAPÍTULO 2)

- Tabela 1** – Variáveis bioquímicas de mudas de *Cecropia pachystachya*, *Heliocarpus popayanensis*, *Cariniana estrellensis* e *Cabralea canjerana* cultivadas com (N+) ou sem (N-) adição de N. Os valores são médias \pm erros-padrão. Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos de N, de acordo com a ANOVA (teste F ; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; $n = 15$). AGS – atividade da glutamina sintetase; ANR – atividade da nitrato redutase; C_{tot} – teor total de clorofilas; $C_{\text{tot}}/\text{Car}$ – razão do teor total de clorofilas/carotenoides; N_{tot} – teor total de nitrogênio 93

Tabela 2 – Variáveis bioquímicas de mudas de *Cecropia pachystachya*, *Heliocarpus popayanensis* e *Cariniana estrellensis* não inoculadas com bactérias (Nin), ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. Os valores são médias \pm erros-padrão. Médias com letras iguais nas linhas não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação (*Tukey HSD*; $P < 0,05$; $n = 10$). AGS – atividade da glutamina sintetase; ANR – atividade da nitrato redutase; C_{tot} – teor total de clorofilas; N_{tot} – teor total de nitrogênio94

Tabela 3 – Variáveis bioquímicas de mudas de *Cecropia pachystachya*, *Cariniana estrellensis* e *Cabralea canjerana* cultivadas com (N+) ou sem (N-) adição de N, não inoculadas com bactérias (Nin), ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. Os valores são médias \pm erros-padrão. Para cada variável, médias com letras minúsculas iguais nas colunas não diferem significativamente entre os tratamentos de N; e médias com letras maiúsculas iguais nas linhas não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação (*Tukey HSD*; $P < 0,05$; $n = 5$). AGS – atividade da glutamina sintetase; ANR – atividade da nitrato redutase; C_{tot} – teor total de clorofilas; N_{tot} – teor total de nitrogênio95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A_{max}	Assimilação líquida de CO ₂
AGS	Atividade da enzima glutamina sintetase
ANR	Atividade da enzima nitrato redutase
BPCP	Bactérias promotoras do crescimento em plantas
C_i	Concentração intercelular de CO ₂
C_{tot}	Concentração total de clorofilas
C_{tot}/Car	Razão de concentração total de clorofilas/carotenoides
<i>EUA</i>	Eficiência no uso da água
F_v/F_m	Eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II
F_v/F_m M	Eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II antes do amanhecer
F_v/F_m MD	Eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II ao meio dia
GE	Grupo ecológico
g_s	Condutância estomática
N+	Tratamento com suplementação de N
N-	Tratamento sem suplementação de N
Nin	Plantas não inoculadas com BPCP
R/PA	Razão raiz/parte aérea
UEL	Universidade Estadual de Londrina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	14
1.1	IMPORTÂNCIA DA REGENERAÇÃO DE FLORESTAS	14
1.2	CRESCIMENTO VEGETAL SOB DEFICIÊNCIA DE NITROGÊNIO (N)	15
1.3	CULTIVO COM NITRATO (NO ₃ ⁻) E AMÔNIO (NH ₄ ⁺)	18
1.4	BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS (BPCP)	21
1.5	<i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i> E ESTIRPE AB-V5	26
1.6	<i>BACILLUS VELEZENSIS</i> E ESTIRPE ZK.....	28
1.7	APLICAÇÃO DE BPCP COM PROPÓSITO DE REGENERAÇÃO FLORESTAL 30	
1.8	ESPÉCIES ARBÓREAS UTILIZADAS NO ESTUDO	31
	REFERÊNCIAS	33

	CAPÍTULO 1 - MAIOR TOLERÂNCIA AO AMÔNIO DE MUDAS DE ESPÉCIES ARBÓREAS NEOTROPICAIS É PROMOVIDA POR BACTÉRIAS ASSOCIATIVAS	46
1	INTRODUÇÃO	49
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	51
2.1	Material Biológico	51
2.2	Tratamentos	52
2.3	Análises Fotossintéticas.....	53
2.4	Análises de Crescimento.....	53
2.5	Análises Bioquímicas (Metabolismo do N)	53
2.6	Análises Estatísticas	54
3	RESULTADOS	55
3.1	Análises Fotossintéticas.....	55
3.2	Análises de Crescimento.....	57
3.3	Análises Bioquímicas	57
4	DISCUSSÃO	61
5	CONCLUSÕES.....	66
	REFERÊNCIAS	67

CAPÍTULO 2 - MUDAS DE ESPÉCIES ARBÓREAS NEOTROPICAIS INOCULADAS COM BACTÉRIAS ASSOCIATIVAS SÃO MAIS TOLERANTES A CONDIÇÕES DE DEFICIÊNCIA DE NITROGÊNIO?		80
1	INTRODUÇÃO	83
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	84
2.1	Material Biológico	84
2.2	Tratamentos	85
2.3	Análises Fotossintéticas.....	86
2.4	Análises de Crescimento.....	86
2.5	Análises Bioquímicas (Metabolismo do N)	86
2.6	Análises Estatísticas	88
3	RESULTADOS	88
3.1	Análises Fotossintéticas.....	88
3.2	Análises de Crescimento.....	89
3.3	Análises Bioquímicas	92
4	DISCUSSÃO.....	96
5	CONCLUSÕES.....	101
REFERÊNCIAS.....		102
2	CONCLUSÃO GERAL.....	111
ANEXOS	112

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 IMPORTÂNCIA DE AÇÕES PARA A REGENERAÇÃO DE FLORESTAS

As florestas são componentes essenciais das regiões tropicais, por preservarem a diversidade genética e pelo seu papel no ciclo global do carbono como mitigadoras do aumento do CO₂ atmosférico (Favaretto et al., 2011). Sua vasta destruição é um problema global, que resulta na extinção de diversas espécies (Favaretto et al., 2011). Na maioria dos países equatoriais, as florestas têm sido rapidamente convertidas em áreas com vegetação não florestal, como pastos não naturais ou terras aráveis (Juhrbandt et al., 2004). A Floresta Atlântica, por exemplo, encontra-se em estado crítico de fragmentação e é o bioma com maior alteração antrópica do Brasil, possuindo apenas 12,5% de sua cobertura original, concentrada em fragmentos pequenos cercados por pastos não naturais ou campos agrícolas (Fundação SOS Mata Atlântica e INPE, 2017). Logo, a preservação das áreas remanescentes e a regeneração florestal são grandes desafios para sua manutenção (Santos et al., 2019). A regeneração natural e manejos que facilitam a ocorrência da regeneração florestal podem produzir bons resultados na restauração da Mata Atlântica, e de forma pouco custosa (Teixeira et al., 2009; Santos et al., 2019). No entanto, o reflorestamento ativo (plantio de mudas), apesar de bastante oneroso (Brançalion et al., 2012), também tem amplo potencial na regeneração das florestas, especialmente em regiões extremamente devastadas, em que não há fontes de doadores de propágulos, sendo imprescindível o plantio (Fonseca et al., 2009).

Plantios florestais podem ser empregados para várias finalidades, que incluem a formação de serapilheira, aumento da infiltração de água no solo e redução da erosão, proteção e aumento da qualidade do solo, produção de frutos comestíveis, além do sequestro e estoque de carbono, que acabam desacelerando as alterações climáticas (Rey Benayas et al., 2009; Allen et al., 2010; Cortina et al., 2013). O reflorestamento utilizando espécies nativas variadas é mais efetivo em recuperar a microbiota do solo e suas propriedades bióticas e abióticas, devido ao provimento de maior quantidade e qualidade de recursos derivados das plantas ao solo, como matéria orgânica de folhas, raízes e seus exsudatos (Couto et al., 2016). As comunidades microbiológicas do solo são essenciais para os processos de ciclagem de nutrientes e, portanto, a composição microbiológica do solo também é crítica para a recuperação das florestas (Rodrigues et al., 2013).

Como as condições microclimáticas de florestas maduras diferem substancialmente das encontradas em áreas desflorestadas, mudas oriundas de viveiros, ao serem transplantadas no campo, são expostas a diferentes tipos e intensidades de estresses, que afetam negativamente seu desenvolvimento (Craven et al., 2011). Por isso, mudas de espécies lenhosas apresentam problemas de sobrevivência e crescimento após o plantio (Jacobs et al., 2004). Surgiu, portanto, a necessidade de se produzir mudas que tenham qualidades que favoreçam o estabelecimento no campo (Mattsson, 1996). Em meados de 1970, começou-se a dar maior importância ao uso de mudas de espécies florestais produzidas em viveiros em projetos de restauração florestal no Brasil. A partir de então, várias pesquisas foram realizadas a respeito dos tratos culturais mais adequados para a produção de mudas em viveiros (Santos et al., 2000). Ao longo das últimas décadas, as melhorias na qualidade das mudas aumentaram substancialmente suas taxas de sobrevivência e de crescimento inicial após o plantio (Cortina et al., 2013). Dessa forma, técnicas inovadoras que influenciem positivamente o desenvolvimento de mudas em situações não ótimas de crescimento são importantes na regeneração das florestas.

1.2 CRESCIMENTO VEGETAL SOB DEFICIÊNCIA DE NITROGÊNIO (N)

O solo é um sistema complexo e dinâmico que propicia o crescimento vegetal e, sob condições adversas, afeta negativamente o crescimento das plantas. Estresses bióticos no solo são representados por patógenos de plantas e os abióticos incluem a salinidade, seca, alagamento, excesso de metais pesados e deficiência ou excesso de nutrientes (Nadeem et al., 2014).

O N é um nutriente essencial para as plantas que constitui aminoácidos, proteínas, clorofilas, ácidos nucleicos, lipídeos e uma variedade de outros metabólitos (Maathuis, 2009; Kusano et al., 2011). Por isso, sua deficiência é um fator limitante para o crescimento vegetal, que influencia todos os níveis funcionais da planta, desde o metabolismo até o crescimento (Marschner, 1995; Rubio-Wilhelmi et al., 2011).

Em muitos solos, o N é o nutriente mais limitante para o crescimento vegetal (Masclaux-Daubresse et al., 2010; Amazonas et al., 2011). Em áreas agrícolas abandonadas e áreas em início de sucessão secundária, como florestas em regeneração, o solo tem pouco N disponível, mas à medida que a floresta amadurece ocorre a recuperação dos processos de ciclagem de N, isto é, as taxas de mineralização e nitrificação no solo aumentam, levando à maior disponibilidade de N

e, conseqüentemente, maior absorção deste nutriente pelas plantas (Vitousek et al., 1989; Amazonas et al., 2011). As alterações climáticas também podem influenciar a concentração de N mineral no solo, já que o aumento da ocorrência de secas severas pode impactar diretamente a microbiota do solo responsável pela fixação e mineralização do N (Nguyen et al., 2018), além de inibir a fotossíntese das plantas, diminuindo a exsudação de carbono pelas raízes. Esta deficiência exacerba a competição entre plantas e microrganismos pelo N no solo (Simon et al., 2017).

Mais de 70% do N total foliar é alocado nos cloroplastos, onde compõem principalmente pigmentos e proteínas, inclusive enzimas como a Rubisco (Makino e Osmond, 1991). Por isso, a taxa fotossintética e o teor total de N por unidade de área foliar são positivamente correlacionados. Dessa forma, a baixa disponibilidade de N resulta na diminuição da fotossíntese e da condutância estomática (Evans, 1989; Boussadia et al., 2010).

Os estresses causam, de maneira geral, desequilíbrio hormonal e nutricional nas plantas, que aumentam a susceptibilidade a doenças e induzem a senescência foliar (Ashraf, 1994; El-Iklil et al., 2000). O principal sintoma da deficiência de N nas plantas é a senescência foliar provocada pela peroxidação lipídica, que leva à perda de pigmentos, a degradação de proteínas e, conseqüentemente, a inibição da fotossíntese e a redução do crescimento vegetal (Casano et al., 1994). Durante a senescência foliar induzida pela deficiência de N, a atividade do ciclo de Calvin é diminuída, o que impede a oxidação de NADPH e provoca o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) e o aumento da peroxidação lipídica (Rubio-Wilhelmi et al., 2011). As ERO, como o oxigênio singleto ($^1O_2^*$), ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^\cdot) são prejudiciais para o crescimento e desenvolvimento vegetal (Mittler, 2002; Ashraf, 2009; Jaleel et al., 2009; Rubio-Wilhelmi et al., 2011). A presença de altas concentrações de ERO pode causar dano celular pela oxidação de lipídeos, proteínas e clorofilas e danos a ácidos nucleicos, o que restringe de maneira global o metabolismo e crescimento vegetal, podendo inclusive levar à morte da planta (Mittler, 2002; Ashraf, 2009; Rubio-Wilhelmi et al., 2011). No entanto, o estresse oxidativo causado pelas ERO pode ser combatido por um sistema antioxidante presente nos vegetais, composto por enzimas antioxidantes e por antioxidantes não enzimáticos (Mittler, 2002; Ashraf, 2009; Jaleel et al., 2009).

A fotossíntese também é regulada por carboidratos nos tecidos vegetais. A falta de N restringe o crescimento vegetal e o uso de carboidratos não estruturais (amido,

sacarose, glicose e frutose) é limitado (Boussadia et al., 2010; Adams et al., 2013). Assim, uma atividade dreno (catabolismo de carboidratos) aquém da atividade fonte (fotossíntese) leva ao acúmulo de carboidratos não estruturais nos tecidos vegetais, o que inibe a eficiência do fotossistema II (F_v/F_m) levando à fotoinibição (Adams et al., 2013).

Alguns mecanismos adaptativos, que propiciam o aumento da eficiência de captura de N em situações de carência deste nutriente, foram desenvolvidos nas plantas (Clarkson, 1985). Um deles é a regulação positiva dos sistemas de transporte de NO_3^- e de NH_4^+ e das enzimas envolvidas na assimilação de N (von Wirén et al., 2000; Masclaux-Daubresse et al., 2010). Essa regulação resulta em uma taxa de absorção de N aumentada por unidade de superfície de raiz. Outro mecanismo é o estímulo ao crescimento e modificação da arquitetura da raiz, em detrimento do crescimento da parte aérea, o que provoca o crescimento de raízes laterais e permite a exploração de um maior volume de solo (Robinson, 1994; Scheible et al., 2004; Remans et al., 2006). A diminuição do teor de clorofilas e o aumento da concentração dos carotenoides zeaxantina e anteraxantina nas folhas é outra resposta comum à falta de N no solo, que leva à diminuição da razão do teor de clorofilas/carotenoides, acarretando na redução do aproveitamento da luz absorvida, que pode ser importante para evitar a formação de ERO (Logan et al., 1999; Boussadia et al., 2010).

Em cultivares de oliveiras, Boussadia et al. (2010) verificaram que a deficiência de N provocou diminuição dos teores de N e de clorofilas nas folhas, além de reduzir a taxa fotossintética. Os autores também observaram maior acúmulo de carboidratos (amido, sacarose, glicose, manitol) nas folhas e diminuição da biomassa nas plantas submetidas à deficiência de N. O acúmulo de carboidratos (açúcares e amidos) nos tecidos e diminuição do conteúdo de clorofilas também foi observado em plântulas de *Arabidopsis*, além da diminuição da expressão e síntese de proteínas envolvidas nas reações do ciclo de Calvin, após a suspensão da nutrição nitrogenada (Scheible et al., 2004). Em plantas de tabaco, a baixa disponibilidade de N reduziu a taxa de crescimento relativo das plantas e a biomassa das folhas, efeitos que foram correlacionados à diminuição da concentração total de N e de NO_3^- nas folhas (Rubio-Wilhelmi et al., 2011).

A restrição de N também ocasiona diminuição dos teores de N total, NO_3^- e NH_4^+ , tanto nas raízes quanto na parte aérea (Lee e Rudge, 1986). Em *Arabidopsis*, a limitação de N causou diminuição nas concentrações de NO_3^- , aminoácidos e N total,

além de diminuir a atividade da nitrato redutase (NR), sem interferir no teor de NH_4^+ (Lemaître et al., 2008). Porém, a atividade da glutamina sintetase (GS) aumentou, devido ao maior catabolismo de proteínas (remobilização de N) induzido pela deficiência de N. No milho, a atividade da nitrato redutase e as concentrações de NO_3^- , aminoácidos e proteínas diminuíram nas folhas de plantas submetidas à deficiência de N (Calzavara et al., 2018).

1.3 CULTIVO COM NITRATO (NO_3^-) E AMÔNIO (NH_4^+)

As plantas absorvem o N do solo principalmente nas formas inorgânicas NO_3^- e NH_4^+ (Britto et al., 2001). As fontes nitrogenadas variam de acordo com o ambiente, desde solos muito ricos em NH_4^+ , como em florestas boreais, até solos ricos em NO_3^- , como em campos agrícolas (Britto e Kronzucker, 2005). As absorções de nitrito (NO_2^-), ureia, peptídeos e aminoácidos também ocorrem, e podem ser bastante representativas em alguns ambientes (Kotur et al., 2013). O NO_3^- é co-transportado com prótons ao citosol por transportadores de NO_3^- , enquanto a absorção de NH_4^+ é acompanhada pela extrusão de prótons pela H^+ -ATPase da membrana plasmática, o que mantém o balanço de cargas no transporte desses íons (Britto e Kronzucker, 2005). Como consequência, o meio extracelular é alcalinizado e acidificado pela nutrição com NO_3^- e NH_4^+ , respectivamente (Marschner, 1995).

A assimilação do N, passo a passo, é descrita a seguir. Quando o NO_3^- é absorvido, o início da assimilação envolve sua conversão em NO_2^- , catalisada pela enzima NR, no citosol (Lea, 1993; Bloom et al., 2010). Após a redução do NO_3^- , o NO_2^- é transportado aos cloroplastos ou plastídios, onde é reduzido a NH_4^+ pela nitrito redutase (NiR). O NH_4^+ , absorvido diretamente pelas raízes, originado da redução do nitrito, proveniente da fotorrespiração ou da reciclagem de aminoácidos, é assimilado nos cloroplastos ou plastídios pelo ciclo da GS/glutamato sintase (GOGAT). A GS fixa o NH_4^+ em uma molécula de glutamato para formar glutamina. Essa glutamina reage subsequentemente com 2-oxoglutarato para formar duas moléculas de glutamato, reação catalisada pela GOGAT. Glutamina e glutamato servem de doadores de N na biossíntese de outros aminoácidos, ácidos nucleicos e outros compostos orgânicos (Lea, 1993; Bloom et al., 2010). Alternativamente (por exemplo, em resposta a altos níveis de NH_4^+), a enzima mitocondrial NADH-glutamato desidrogenase (GDH) pode incorporar NH_4^+ em 2-oxoglutarato (Skopelitis et al., 2006). As enzimas NR, NiR e GOGAT utilizam poder redutor, respectivamente, na forma de NADH (ou NADPH),

ferredoxina e NADH (ou ferredoxina), enquanto a GS precisa de ATP (Masclaux-Daubresse et al., 2010).

Apesar de a assimilação direta do NH_4^+ requerer menos energia do que a do NO_3^- (Guo et al., 2007), poucas espécies se desenvolvem adequadamente quando o NH_4^+ é a única, ou predominante, fonte de N (Kronzucker et al., 1997). A maioria das espécies vegetais avaliadas em estudos de nutrição nitrogenada apresenta crescimento pronunciado sob nutrição com NO_3^- , mas desenvolvem sintomas de toxicidade quando crescem sob concentrações moderadas ou altas de NH_4^+ (Gerendás et al., 1997; Kronzucker et al., 1997; Britto e Kronzucker, 2002; Kronzucker et al., 2003; Mantelin e Touraine, 2004; Schimann et al., 2008; Oliveira et al., 2017a). Como a quantidade e a forma de N disponível às plantas favorecem o crescimento de algumas espécies, em detrimento de outras, este nutriente tem sido reconhecido como um importante fator ecológico que determina o desempenho e a distribuição de espécies vegetais (Aidar et al., 2003; Siddique et al., 2010; Britto e Kronzucker, 2013; Dias et al., 2014; Mao et al., 2018).

Em geral, plantas adaptadas ao baixo pH e solos redutores, como os encontrados em florestas maduras, tendem a absorver NH_4^+ ou aminoácidos, enquanto plantas adaptadas a um pH mais elevado e solos mais oxidados utilizam maiores proporções de NO_3^- (Maathuis, 2009). Em estudo feito na Mata Atlântica (Aidar et al., 2003), foi proposto que espécies arbóreas intolerantes à sombra apresentam alta capacidade de assimilação de NO_3^- na parte aérea, indicada pela translocação de altas concentrações deste ânion e alta atividade da enzima NR nas folhas. Por outro lado, espécies tolerantes à sombra possuem capacidade de assimilação de NO_3^- nas folhas muito menor do que as intolerantes à sombra e, provavelmente, assimilam o N, absorvido majoritariamente na forma de NH_4^+ , na raiz (Aidar et al., 2003).

Em outros estudos com essa abordagem, realizado com mudas de espécies arbóreas (Kronzucker et al., 2003; Oliveira et al., 2017a; Debiasi et al., 2019), verificou-se que algumas espécies, como as intolerantes à sombra, crescem a uma taxa elevada quando supridas com NO_3^- , mas podem apresentar efeitos severos de toxicidade quando tratadas com NH_4^+ como fonte exclusiva de N, o que restringe muito seu crescimento. Por outro lado, espécies tolerantes à sombra são capazes de se desenvolver adequadamente com ambas as fontes de N (NO_3^- ou NH_4^+), mas apresentam crescimento superior quando tratadas com NH_4^+ , que é assimilado

rapidamente em aminoácidos na raiz (Oliveira et al., 2017a; Debiasi et al., 2019). O metabolismo do N de plantas arbóreas é, portanto, regulado pela forma de N disponível no solo, mas de acordo com as características adaptativas de cada espécie (Schmidt e Stewart, 1998; Schmidt et al., 1998; Kronzucker et al., 2003; Schimann et al., 2008; Oliveira et al., 2017a; Debiasi et al., 2019).

Ao comparar parâmetros fotossintéticos de duas espécies vegetais com características contrastantes quanto à sensibilidade ao NH_4^+ Zhou et al. (2011) verificaram diferenças marcantes. O cultivo com NO_3^- como fonte única de N promoveu aumento da biomassa em plantas de pepino, espécie sensível ao NH_4^+ . O menor crescimento no cultivo com NH_4^+ foi associado a diminuições da taxa fotossintética, condutância estomática, concentração intercelular de CO_2 e F_v/F_m (fotoinibição) e a uma maior taxa de fotorrespiração. Já o arroz, espécie tolerante ao NH_4^+ , não apresentou diferenças no ganho de biomassa, taxa fotossintética ou F_v/F_m entre o cultivo com as formas diferentes de N.

Em baixas concentrações na solução do solo (<3 mM), o NH_4^+ geralmente não causa toxicidade, mas conforme sua concentração aumenta, ele pode se tornar tóxico para algumas espécies (Britto e Kronzucker, 2002). Os sintomas de toxicidade de NH_4^+ incluem o crescimento vegetal reduzido, alterações na arquitetura da raiz, diminuição na razão raiz/parte aérea e clorose nas folhas (Britto e Kronzucker 2002; Chen et al., 2013; Bittsánszky et al., 2015). Estes sintomas são provocados de diversas formas: inibição da absorção de cátions (K^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+}), alcalinização intra e acidificação extracelular, inibição da respiração da raiz, diminuição da fotossíntese, estímulo à fotorrespiração, alteração da expressão e atividade de enzimas envolvidas na assimilação do NH_4^+ , perda da homeostase hormonal, aumento do estresse oxidativo e alto gasto energético para manter os níveis de conteúdo de NH_4^+ no citosol baixos (Britto e Kronzucker, 2002; Bittsánszky et al., 2015; Esteban et al., 2016a).

São consideradas as principais causas da toxicidade ao NH_4^+ a acidificação da rizosfera e a diminuição das concentrações de cátions nos tecidos vegetais (Britto e Kronzucker, 2002; Coskun et al., 2013; Esteban et al., 2016a). A diminuição da taxa fotossintética e a consequente diminuição da alocação de carboidratos na raiz para gerar energia para a assimilação de NH_4^+ também é considerada um importante agravante dos efeitos da nutrição com NH_4^+ (Roosta e Schjoerring, 2008). Altas concentrações de NH_4^+ na solução do solo (5 mM) afetam negativamente a

fotossíntese pela ligação de NH_3 ao complexo de liberação de oxigênio (Drath et al., 2008) ou pelo aumento da peroxidação lipídica (Podgórska et al., 2013).

A nutrição de plantas exclusivamente com NH_4^+ como fonte de N leva à diminuição da síntese de auxina e, conseqüentemente, à diminuição do crescimento da raiz, o que restringe o desenvolvimento de raízes laterais (Yang et al., 2014, Esteban et al., 2016b). Porém, o crescimento inibido das raízes de plantas cultivadas com NH_4^+ pode ser parcialmente restabelecido pela aplicação de auxina exógena ou por bloqueadores da síntese de etileno (Li et al., 2013, Yang et al., 2014), o que indica o papel destes fitormônios na regulação ao estresse causado pelo NH_4^+ . Por outro lado, o NO_3^- diminui a expressão de genes envolvidos na síntese de etileno (Scheible et al., 2004) e aumenta os níveis endógenos de citocininas na parte aérea, o que provoca a ativação de genes relacionados à absorção de nutrientes (Argueso et al., 2009).

Algumas características propiciam tolerância ao NH_4^+ a determinadas espécies vegetais, como a elevada taxa de respiração nas raízes, necessária para disponibilizar energia para o efluxo de NH_4^+ (Cruz et al., 2011), a alta assimilação de NH_4^+ , a manutenção de baixos níveis de NH_4^+ nas folhas (Sarasketa et al., 2014) e a baixa sensibilidade à acidificação do meio externo (Zhu et al., 2009). Portanto, a tolerância ao NH_4^+ está relacionada ao balanço da absorção de NH_4^+ com seu consumo, a exemplo da rápida assimilação em moléculas orgânicas (Bittsánszky et al., 2015). Caso o NH_4^+ não seja jogado para fora do citosol ou assimilado, ele pode ser transportado para a parte aérea e contribuir para o aumento do conteúdo de NH_4^+ nas folhas, o que pode gerar efeitos negativos neste órgão (Cruz et al., 2011).

1.4 BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS (BPCP)

Na agricultura, há necessidade de fertilização nitrogenada, pois a quantidade de N no solo não é suficiente para suprir a demanda das culturas agrícolas. Porém, a aplicação de fertilizantes nitrogenados em excesso é economicamente onerosa e leva à perda de N por lixiviação, volatilização de NH_3 e desnitrificação, o que impacta negativamente o ambiente (Bacon, 1995). Na visão de agricultura sustentável, uma alternativa para melhorar a absorção de nutrientes e água pelas plantas e diminuir o uso de insumos agrícolas é o uso de BPCP, microrganismos que beneficiam o crescimento vegetal (Armada et al., 2003). A promoção do crescimento é geralmente resultado da combinação de um conjunto de mecanismos que geram um efeito final

de ampla escala na planta, mas o resultado pode variar em cada caso específico de inoculação (Bashan e de-Bashan, 2010).

As BPCP podem colonizar a rizosfera, rizoplano (superfície da epiderme radicial), córtex radicial ou estruturas especializadas da raiz chamadas nódulos (Ortiz-Castro et al., 2009). Rizosfera é o volume de solo que sofre influência direta das raízes das plantas. A microbiota presente neste ambiente é relativamente diferente daquela do restante do solo, devido à presença de exsudatos da raiz, que servem como fonte de nutrientes e energia para o crescimento dos microrganismos (Sorensen, 1997). Os exsudatos são formados por parte do carbono fixado fotossinteticamente e são disponibilizados nas formas de carboidratos, aminoácidos, ácidos orgânicos e outros compostos, que atraem e mantêm as bactérias (Bais et al., 2006). Plantas anuais apresentam menor exsudação pela raiz do que espécies arbóreas (Grayston et al., 1996), o que influencia na colonização pelas BPCP (Probanza et al., 2002). Os exsudatos também podem variar de acordo com a condição ambiental, como, por exemplo, o crescimento sob deficiência de N, situação na qual as plantas liberam exsudatos com menor concentração de aminoácidos (Carvalhais et al., 2011).

Bactérias associativas de vida livre não induzem a formação de nódulos, mas são capazes de se associar às plantas de forma epifítica e endofítica (Saha et al., 2016). Ao serem adicionadas ao solo, as bactérias colonizam a rizosfera, e depois o rizoplano (Gamalero et al., 2003; Compant et al., 2010). Bactérias endofíticas são capazes de viver no interior dos tecidos vegetais sem causar doenças (Khan et al., 2014). A entrada de bactérias endofíticas na planta hospedeira pode ocorrer a partir dos ápices das raízes, de locais de quebra onde emergem as raízes laterais e de áreas danificadas na epiderme radicial (James et al., 2002; Chi et al., 2005; Perrine-Walker et al., 2007). Depois de atingir o córtex da raiz, algumas bactérias podem atravessar a endoderme para regiões mais internas do órgão, e até mesmo se espalhar para a parte aérea, com o auxílio da secreção de enzimas que degradam a parede celular vegetal (James et al., 2002). Vários gêneros de BPCP de vida livre, como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Variovorax* são capazes de causar efeito pronunciado no crescimento das plantas (Glick e Bashan, 1997; Nadeem et al., 2014; Vejan et al., 2016). Alguns fatores que podem afetar o desempenho de uma bactéria endofítica são o conteúdo de N no solo, o tipo de solo, a variedade e a idade da planta (Muthukumarasamy et al., 2002; Oliveira et al., 2006; Egamberdiyeva, 2007).

As BPCP podem influenciar o crescimento e desenvolvimento vegetal de forma indireta ou direta. A promoção do crescimento indireto ocorre quando as BPCP previnem ou reduzem alguns dos efeitos negativos de patógenos às plantas (Glick e Bashan, 1997). Isso pode ser alcançado por competição, parasitismo, antibiose e indução da resistência sistêmica contra organismos patogênicos (Beneduzi et al., 2012).

O mecanismo de antibiose é caracterizado pela produção e liberação de compostos antimicrobianos pelas BPCP, que inibem o crescimento de patógenos (Glick, 1995). Por exemplo, a síntese de enzimas hidrolíticas, como protease, lipase, pectinase e amilase inibem o crescimento de fungos patogênicos do milho (Egamberdieva, 2007). De forma similar, as BPCP produzem sideróforos, que diminuem a disponibilidade de ferro para certos patógenos, resultando na diminuição de sua população (Glick e Bashan, 1997; Beneduzi et al., 2012).

O aumento da resistência das plantas a doenças ocorre pela alteração da vulnerabilidade da planta hospedeira, por um mecanismo chamado resistência sistêmica induzida. Essa resposta, induzida pelo ácido jasmônico, aumenta a capacidade de defesa contra infecção de agentes patogênicos por períodos prolongados (van Wees et al., 2008). Os gêneros de rizobactérias *Pseudomonas* e *Bacillus* são os mais estudados quanto à resistência sistêmica induzida em plantas (Kloepper et al., 2004; van Wees et al., 2008; Beneduzi et al., 2012).

De forma direta as BPCP podem prover benefícios à planta hospedeira por diversos mecanismos, que incluem a fixação de N, o aumento da disponibilidade (solubilização de fósforo, produção de sideróforos) e absorção de nutrientes, a produção de compostos orgânicos voláteis e a síntese de reguladores de crescimento vegetal (auxinas, giberelinas, ácido abscísico e citocininas) e de enzimas, como ACC-desaminase, quitinase e glucanase (Glick et al., 2007; Hayat et al., 2010; Vejan et al., 2016). Além de aumentar o crescimento de plantas, a inoculação com BPCP pode também acelerar a germinação e aumentar a taxa de emergência de plântulas (Lugtenberg et al., 2002; Souza et al., 2020).

Apesar da gama de mecanismos pelos quais as bactérias estimulam o crescimento vegetal, Mantelin e Touraine (2004) ressaltaram que um dos mecanismos principais é a produção de ácido indol acético (AIA), uma auxina que induz o crescimento da raiz, estimula o desenvolvimento de raízes laterais e pelos radiciais e, conseqüentemente, estimula a absorção de nutrientes do solo. Outro fitormônio

produzido por BPCP é a giberelina, cujo efeito fisiológico dominante é o crescimento da parte aérea (Probanza et al., 2002). Já as citocininas estimulam a divisão celular vegetal e a diferenciação vascular e induzem a proliferação de pelos radiciais, mas podem inibir a formação de raízes laterais e o alongamento da raiz (Aloni et al., 2006).

A diminuição da concentração de etileno nas plantas é um dos principais mecanismos elucidados, pelos quais as BPCP promovem o crescimento vegetal sob condições estressantes. O etileno é um fitormônio gasoso que regula o crescimento das plantas em baixas concentrações (Glick et al., 2007), mas sua concentração é normalmente aumentada em condições estressantes, devido ao aumento da produção de ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC), um precursor imediato da rota de biossíntese do etileno (Glick et al., 2007). Acredita-se que o etileno cause efeito adverso no crescimento das plantas, particularmente no alongamento da raiz, que, em última análise, inibe de forma geral todo o metabolismo da planta, devido à redução da absorção de água e nutrientes (Belimov et al., 2002). Para manter o crescimento adequado das plantas, é necessário que a concentração de etileno não se eleve demasiadamente. Isso pode ser facilitado por algumas BPCP que contêm ACC-desaminase, uma enzima que degrada o ACC em amônia e α -cetobutirato (Glick et al., 2007). Essa diminuição do nível de ACC resulta na queda da concentração de etileno nas proximidades da raiz, o que ajuda a promover o crescimento radicial (Glick et al., 2007).

Considerando as várias interações que existem entre as rotas de sinalização de diferentes hormônios e que as BPCP podem influenciar não apenas uma via hormonal, é difícil identificar qual dessas rotas é o principal meio pelo qual as BPCP promovem o crescimento vegetal (Mantelin e Touraine, 2004). Além disso, apesar de muitas estirpes sintetizarem fitormônios, a transferência destes hormônios para as plantas pode ser limitada e até mesmo não ocorrer (Bashan e de-Bashan, 2010).

Quanto ao benefício resultante da fixação de N, há controvérsias, pois o N fixado pelos microrganismos pode ou não contribuir em grande escala para o aumento do conteúdo de N da planta (Bashan et al., 1989; Mantelin e Touraine, 2004; Bashan e de-Bashan 2010). Grande parte da amônia (NH_3) produzida pelas BPCP pela fixação de nitrogênio atmosférico (N_2), catalisada pela nitrogenase, é assimilada pelos próprios microrganismos pela via GS/GOGAT (Mantelin e Touraine, 2004), que opera a taxas elevadas e evita o vazamento de NH_3 (Steenhoudt e Vanderleyden, 2000). Além disso, transportadores de NH_4^+ de várias BPCP estão envolvidos na reabsorção

do NH_4^+ liberado como consequência da difusão da NH_3 (van Dommelen et al., 1997). Mesmo que em alguns casos a fixação de N em vida livre não contribua em grande escala para o crescimento vegetal em culturas agrícolas, a utilização de bactérias endofíticas tem potencial para diminuir parcialmente a fertilização nitrogenada (Yanni et al., 1997; Hungria et al., 2010; Carvalho et al., 2014; Oliveira et al., 2017b). Isso se deve, provavelmente, ao aumento da capacidade de absorção de nutrientes, indiretamente pelo estímulo ao desenvolvimento de raízes laterais e diretamente por estimular os sistemas de transporte na raiz (Mantelin e Touraine 2004; Carvalho et al., 2014).

Apesar de as BPCP serem muito efetivas em promover o crescimento e desenvolvimento de plantas, algumas espécies bacterianas podem inibir seu crescimento. Um exemplo é a produção de cianeto, característica bem conhecida de algumas espécies de *Pseudomonas*: por um lado, o cianeto é um agente de biocontrole contra alguns patógenos vegetais; porém, dependendo de sua concentração, pode provocar efeitos adversos sobre o crescimento vegetal (Siddiqui et al., 2006). De forma similar, a produção de auxinas por BPCP, em baixas concentrações, pode aumentar o crescimento vegetal (Spaepen et al., 2007), enquanto em altos níveis pode levar à inibição do crescimento das raízes (Xie et al., 1996).

Uma combinação de várias estirpes de BPCP não necessariamente provocará efeitos aditivos ou sinérgicos, mas pode ocasionar uma competição entre as estirpes e resultar em crescimento reduzido da planta hospedeira (Probanza et al., 2002). Por isso, a seleção de uma estirpe em particular, ou um conjunto de microrganismos, é crítica para obter benefícios máximos, no sentido de aumentar o crescimento vegetal (Nadeem et al., 2014). É evidente que as BPCP promovem o crescimento vegetal por meio de variados mecanismos e protegem as plantas de condições prejudiciais, que direta ou indiretamente afetam seu crescimento. Porém, nem sempre a aplicação de inoculantes é efetiva em promover o crescimento vegetal, especialmente em condições de campo (Compant et al., 2010). Bashan et al. (2014) ressaltam a importância do desenvolvimento de inoculantes que aumentem as chances de sobrevivência das BPCP após a inoculação. Segundo os autores, momentos depois que suspensões de bactérias são inoculadas no solo sem um carregador apropriado, a população de bactérias da maioria de espécies de BPCP diminui rapidamente. Esse fenômeno dificulta a formação de uma população da BPCP suficientemente grande

na rizosfera. As bactérias inoculadas e desprotegidas devem competir com a comunidade microbiana nativa, frequentemente mais bem adaptada ao local. Por isso, um papel essencial da formulação dos inoculantes é o de prover um microambiente mais adequado, combinado com proteção física por um período prolongado, para prevenir um rápido declínio da população da bactéria introduzida.

Nos estudos sobre o desenvolvimento de inoculantes, o primeiro objetivo é encontrar a melhor estirpe de bactérias ou um consórcio de microrganismos para a planta alvo, para depois desenvolver uma formulação específica do inoculante para a planta alvo e um método de aplicação prático. O método de inoculação de sementes e plantas com suspensão de cultura bacteriana, sem uma formulação de inoculante específica produz resultados positivos, mas não é uma tecnologia prática para agricultores, e que serve principalmente para experimentos iniciais em casa de vegetação em instituições de pesquisa (Bashan et al., 2014).

Devido aos diversos mecanismos de promoção de crescimento, a associação com BPCP tem chamado atenção como potencial alternativa para mitigar o estresse de plantas sob condições adversas, como a falta de nutrientes (Rosegrant et al., 2009). As interações entre plantas e bactérias são profundamente influenciadas pelas condições ambientais. Em condições adversas, algumas estirpes bacterianas não são capazes de agir eficientemente devido à sua incapacidade de sobreviver ou competir adequadamente, enquanto outras são capazes de sobreviver e promover o crescimento de plantas nessas situações (Nadeem et al., 2014; Cheng et al., 2019).

Solos com baixo teor de N são capazes de suportar maiores populações de bactérias endofíticas fixadoras de N, e por períodos mais prolongados, do que solos com alta fertilidade de N (Oliveira et al., 2006). A presença de N inibe a atividade da nitrogenase bacteriana (Hartman et al., 1986; Kolb e Martin, 1988; Muthukumarasamy et al., 2002) e pode restringir o crescimento populacional de algumas estirpes diazotróficas, o que as impede de ter sucesso na competição contra outros microrganismos que conseguem manter uma população substancial nessas condições (Muthukumarasamy et al., 2002).

1.5 *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* E ESTIRPE AB-V5

No gênero *Azospirillum*, estirpes principalmente das espécies *Azospirillum brasilense* e *A. lipoferum* são conhecidas por exercer efeitos benéficos nas plantas por uma série de mecanismos (Fukami et al., 2018a). Bactérias deste gênero

apresentam alta mobilidade no solo, o que facilita sua migração para regiões próximas às raízes (Bashan et al., 2014). Na falta de N, bactérias do gênero são conhecidas por se aclimatar rapidamente, aumentando a expressão e síntese de nitrogenase, enzima responsável pela fixação de N₂ (Kamnev et al., 2008). Porém, a fertilização com N pode inibir o crescimento de populações de *Azospirillum* spp. (Hartmann et al., 1986; Kolb e Martin, 1988).

Entre os mecanismos de promoção do crescimento vegetal descritos para este gênero estão inclusos a fixação de N, a síntese de fitormônios (auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico, etileno e ácido salicílico), a solubilização de fosfato, a indução da resistência sistêmica, a síntese de sideróforos e a detoxificação de moléculas que causam o estresse oxidativo (Fukami et al., 2018a).

A inoculação com *Azospirillum* promove o aumento de N nos tecidos vegetais, em associação com várias espécies, mesmo em condições de campo (Bashan e Holguin, 1997; Hungria et al., 2010). Uma maneira pela qual estirpes de *Azospirillum* são capazes de aumentar o teor de N da planta hospedeira é o aumento da redução do NO₃⁻, por meio da atividade da nitrato redutase bacteriana, o que promove o aumento da translocação de NO₂⁻ à parte aérea (El-Komy et al., 2003). Outro mecanismo elucidado é a influência das BPCP deste gênero sobre a arquitetura da raiz, como o estímulo ao desenvolvimento de raízes laterais e adventícias, pelos radiciais e ramificações dos pelos, que contribuem para a absorção de água e nutrientes (Bashan e de-Bashan, 2010). Em concordância com este mecanismo, foi verificado que plantas inoculadas com *Azospirillum* absorvem N, P, K e microelementos de forma mais eficiente do solo, o que auxilia no crescimento vegetal (Okon e Vanderleyden, 1997; Hungria et al., 2010).

As BPCP do gênero *Azospirillum* também são capazes de exercer efeitos pronunciados de promoção do crescimento quando as plantas são submetidas a estresses diversos, como a salinidade (Bacilio et al., 2004), seca (Creus et al., 1997), excesso de ácidos húmicos (Bacilio et al., 2003), pH extremo (de-Bashan et al., 2005) e altos níveis de metais pesados (Belimov e Dietz, 2000).

A. brasilense é uma espécie cuja fonte de N preferencial para o crescimento é o NH₄⁺ (Kamnev et al., 2008). Esta espécie é capaz de produzir auxinas, giberelinas e citocininas (Tien et al., 1979; Janzen et al., 1992) e de transferir o N fixado biologicamente para um hospedeiro (de-Bashan et al., 2016). Bashan (1986) sugeriu

que, para se obter efeito positivo de crescimento na planta, a população de *A. brasilense* no inoculante deve conter 10^6 - 10^7 células por planta.

A estirpe Ab-V5, de *A. brasilense* tem capacidade de sintetizar AIA (Fukami et al., 2018b). Em inoculação em plantas de milho, Ab-V5 promoveu aumentos na fotossíntese, altura da parte aérea, número de vasos do metaxilema e teor de NO_3^- nas folhas (Calzavara et al., 2018). Além disso, sob deficiência de N, a estirpe aumentou a concentração de NH_4^+ e aminoácidos totais nas folhas, em relação às plantas não inoculadas (Calzavara et al., 2018). Benefícios da inoculação com Ab-V5 também foram avaliados em mudas de espécies arbóreas neotropicais (Tiepo et al., 2018; Souza et al., 2020). A estirpe aumentou a porcentagem de germinação e o índice de vigor de mudas de *Cecropia pachystachya* Trécul, além de diminuir o tempo de germinação de suas sementes (Souza et al., 2020). Em uma espécie intolerante à sombra sob déficit hídrico, a inoculação promoveu diminuição do teor de prolina nas folhas, aminoácido relacionado à tolerância à escassez hídrica (Tiepo et al., 2018). A inoculação com Ab-V5 também se mostrou eficiente em induzir genes relacionados à detoxificação de ERO e à resistência sistêmica induzida no milho (Fukami et al., 2017).

Hungria et al. (2010) verificaram que a estirpe Ab-V5 foi capaz de aumentar o rendimento de culturas de milho e trigo, além de promover aumentos nos teores de N nas folhas e de P, Mg, S, Zn e Cu nos grãos de milho, e nas concentrações de N, K, S, Zn, Mn e Cu nas folhas de trigo. Essa maior aquisição dos nutrientes foi relacionada ao estímulo ao crescimento das raízes pela BPCP (Hungria et al., 2010). Estes resultados culminaram na recomendação e autorização das estirpes Ab-V5 e Ab-V6 para a produção de inoculantes comerciais para milho e trigo. De forma similar, Oliveira et al. (2017b) verificaram que um inoculante de Ab-V5 enriquecido com biopolímeros tem potencial para diminuir parcialmente a adubação nitrogenada na cultura do milho.

1.6 *BACILLUS VELEZENSIS* E ESTIRPE ZK

As bactérias do gênero *Bacillus* são formadoras de endósporos, característica que propicia a sobrevivência a uma ampla variedade de condições ambientais e favorece sua persistência no campo por longos períodos (Probanza et al., 2002; Perez-Garcia et al., 2011). Muitas espécies de *Bacillus* são conhecidas pela eficácia como agentes de biocontrole (Gong et al., 2006; Beneduzi et al., 2008), e também

foram estudadas quanto à capacidade de produzir AIA (Swain et al., 2007; Ahmed et al., 2010).

Wu et al. (2005) reportaram que a inoculação com *Bacillus megaterium* e *Bacillus mucilaginosus* aumentou o crescimento vegetal e a assimilação de N, P e K em plantas de milho. *Bacillus pumilus* é uma das bactérias mais abundantes no filoplano (superfície foliar) de plantas de soja (Arias et al., 1999). Essa bactéria, de vida livre, é capaz de sintetizar auxina e giberelina (Gutiérrez-Mañero et al., 1996; Gutiérrez-Mañero et al., 2001; Probanza et al., 2002; Joo et al., 2004). Seus efeitos positivos no crescimento foram observados em *Pinus pinea* L. em condições de viveiro (Probanza et al., 2002) e em mudas de *Capsicum annuum* L. (Joo et al., 2004).

Bacillus velezensis é uma bactéria aeróbia gram-positiva. Seus efeitos sobre o crescimento vegetal estão relacionados principalmente com a inibição de patógenos, como bactérias, fungos e nematódeos (Rabbee et al., 2019). Além disso, a espécie é capaz de sintetizar metabólitos secundários, como lipopeptídeos e policetídeos, que são capazes de induzir o crescimento vegetal, inibir patógenos e induzir resistência sistêmica (Rabbee et al., 2019). Essa espécie também tem capacidade de promover o crescimento vegetal pela produção de compostos orgânicos voláteis, que regulam os níveis de auxina nas plantas a partir da indução de genes que codificam enzimas do metabolismo do AIA (Prabhat et al., 2013).

A estirpe ZK, de *Bacillus velezensis*, não apresenta registro de uso em inoculantes comerciais. A estirpe, isolada da rizosfera de plantas de girassol e caracterizada como BPCP por Goes et al. (2012), não é diazotrófica, mas tem capacidade de produzir auxina e sideróforos. Os efeitos desta estirpe em plantas foram testados no milho (Calzavara et al., 2018) e em duas espécies arbóreas da Mata Atlântica (Tiepo et al., 2018). No milho, a inoculação provocou aumento do número de vasos do metaxilema na raiz e da biomassa deste órgão e, em situação de deficiência de N, aumentou a taxa fotossintética (Calzavara et al., 2018). Em *Trema micrantha* (L.) Blume, uma espécie arbórea, a inoculação da estirpe ZK causou aumento da tolerância de suas mudas ao déficit hídrico, verificado pelos menores níveis de peroxidação lipídica e de peróxido de hidrogênio nas folhas (Tiepo et al., 2018). A estirpe também provocou aumento da taxa de germinação e do índice de vigor de mudas de *Cecropia pachystachya*, além de reduzir o tempo de germinação de suas sementes (Souza et al., 2020).

1.7 APLICAÇÃO DE BPCP COM PROPÓSITO DE REGENERAÇÃO FLORESTAL

Como as BPCP são frequentemente isoladas de espécies vegetais diferentes das que elas são inoculadas posteriormente, a especificidade pode ser um impedimento para o desenvolvimento de inoculantes efetivos para uso em viveiros ou programas de reflorestamento (Enebak et al., 1998). Entre as práticas disponíveis para reflorestamentos, a inoculação com BPCP é um procedimento em processo de aceitação (Chanway 1997; Bashan et al., 2012).

Apesar da principal aplicação das BPCP ocorrer na agricultura, também já foram testados efeitos da inoculação com BPCP em árvores, como o carvalho, eucalipto e pinus (Enebak et al., 1998; Sastry et al., 2000; Wonderwell e Enebak, 2000; Estes et al., 2004; Garcia et al., 2004; Enebak, 2005) e em espécies selvagens, especialmente cactos (Puente e Bashan, 1993; Bashan et al., 1999; Carrillo-Garcia et al., 2000a, b; Carrillo et al., 2002; Puente et al., 2004; Bacilio et al., 2006; Bashan et al., 2009b; Lopez et al., 2011), arbustos, gramíneas (Herrera et al., 1993; Grandlic et al., 2008) e plantas halófitas (Toledo et al., 1995; Bashan et al., 2000; Bashan e Holguin, 2002).

Entre os benefícios causados pelas BPCP nas espécies abordadas no parágrafo anterior foram observados o aumento da biomassa da raiz e parte aérea, aceleração da emergência das plântulas e proteção contra os efeitos negativos do ozônio em *Pinus taeda* L. (Enebak et al., 1998; Wonderwell e Enebak, 2000; Estes et al., 2004; Garcia et al., 2004), aumento do crescimento e aceleração da emergência de plântulas de *Pinus elliottii* Engelm. (Enebak, 2005); aumento da taxa de germinação, crescimento e taxa de sobrevivência do cacto *Pachycereus pringlei* (S. Watson) Britton & Rose (Puente e Bashan, 1993; Carrillo-Garcia et al., 2000b; Carrillo et al., 2002; Bashan et al., 2009b); aumento da taxa de sobrevivência e da biomassa de leguminosas arbustivas (Herrera et al., 1993); aumento do crescimento da espécie arbustiva *Atriplex lentiformis* (Torr.) S. Watson e da gramínea *Bouteloua dactyloides* (Nutt.) Columbus (Grandlic et al., 2008); e aumento do teor de N e proteínas nas sementes e de fósforo nas folhas da espécie halófita *Salicornia bigelovii* Torr. (Bashan et al., 2000).

Leguminosas arbóreas também foram testadas quanto à inoculação de BPCP em casa de vegetação (Bashan et al., 2009a) e em campo, em revegetação de solos erodidos de deserto (Bashan et al., 2012). No último, as BPCP foram capazes de

aumentar o crescimento das árvores de duas espécies em diversas combinações de tratamentos, mas apenas por períodos curtos (Bashan et al., 2012).

Em viveiro, a aplicação de BPCP foi feita na espécie arbórea *Dalbergia sissoo* Roxb. ex DC. (Dash et al., 2013). Segundo estes autores, a inoculação de microrganismos no solo de viveiros florestais pode ser um método eficaz para aumentar as taxas de crescimento e de sobrevivência de espécies arbóreas, já que a aplicação de fertilizantes em viveiro é mínima ou não existente (Dash et al., 2013). Em estudo com espécies arbóreas da Mata Atlântica em casa de vegetação, a inoculação com BPCP atenuou alguns efeitos negativos do déficit hídrico, como a peroxidação lipídica e o acúmulo de peróxido de hidrogênio nas folhas (Tiepo et al., 2018).

1.8 ESPÉCIES ARBÓREAS UTILIZADAS NO ESTUDO

Cecropia pachystachya Trécul (Urticaceae), conhecida como embaúba-dobrejo (Fig. 1 A), é uma espécie arbórea intolerante à sombra, de crescimento rápido e ciclo de vida curto (Durigan et al., 2002). Apresenta ampla distribuição geográfica (Lok et al., 2010) e, no Brasil, ocorre na Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal (Romaniuc e Gaglioti, 2014). Na Floresta Estacional Semidecidual, ocorre tanto em terrenos secos, quanto em solos permanentemente úmidos ou inundáveis periodicamente (Durigan et al., 2002). É abundante em áreas com alta intensidade luminosa, como bordas de florestas, florestas secundárias e terras agrícolas abandonadas (Lok et al., 2010). Sem valor comercial significativo, esta espécie é de grande importância ecológica para reflorestamentos mistos, pois fornece sombreamento rápido para outras espécies e alimento para a fauna silvestre, especialmente aves e morcegos, que dispersam suas sementes (Durigan et al., 2002).

Espécie florestal intolerante à sombra, *Heliocarpus popayanensis* Kunth (Malvaceae), popularmente conhecida como jangadeiro ou jangada-brava (Fig. 1 B), tem ampla distribuição neotropical, do norte da Argentina até o sul do México, sendo característica de bordas florestais e florestas secundárias (Robyns, 1964; Lorenzi, 2016). No Brasil, é exclusiva da Floresta Estacional Semidecidual da bacia do Paraná (Lorenzi, 2016). É uma árvore de rápido crescimento, gerando sombreamento rápido, é frequentemente recomendada para plantios visando à regeneração florestal (Robyns, 1964; Lorenzi, 2016).

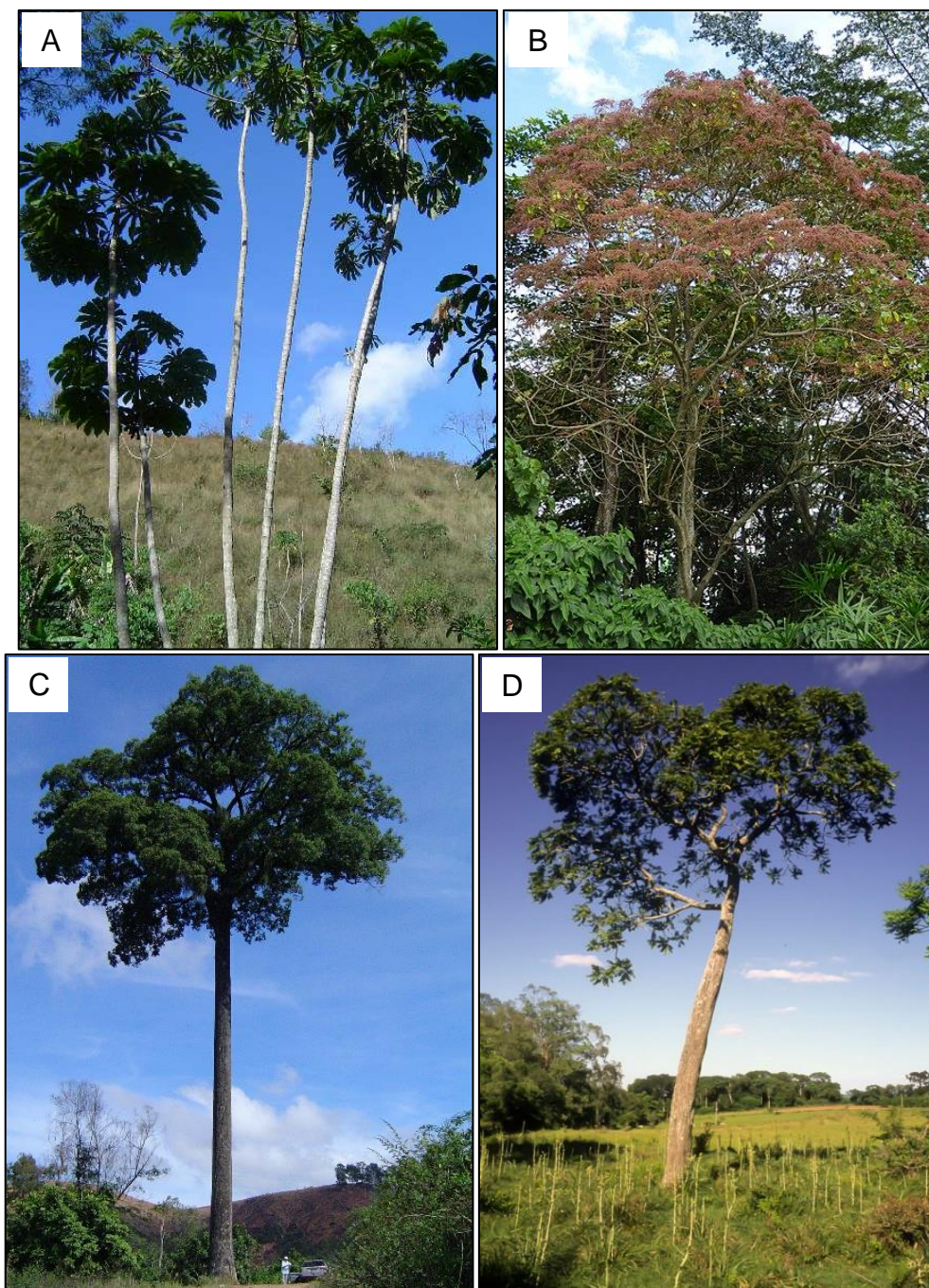


Fig.1. Árvores de *Cecropia pachystachya* (A), *Heliocarpus popayanensis* (B), *Cariniana estrellensis* (C) e *Cabralea canjerana* (D). Disponíveis, respectivamente, em: <https://arvores.brasil.com.br>; <https://commons.wikimedia.org>; <https://klimanaturale.org>; <https://mercadodasmudas.com.br>.

Cariniana estrellensis (Raddi) Kuntze (Lecythidaceae), o jequitibá-branco (Fig. 1 C), é uma espécie arbórea que atinge 45 m de altura, tolerante à sombra, com ampla distribuição no Brasil, classificada como vulnerável na lista de espécies ameaçadas de extinção (Portela et al., 2019). Tem grande importância ecológica e econômica, por sustentar comunidade de polinizadores e pela madeira de qualidade para construção,

sendo espécie prioritária para conservação e importante em programas de reflorestamento (Kubota et al., 2017; Costa et al., 2019).

Cabralea canjerana (Vell.) Mart. (Meliaceae), conhecida como cedro-canjarana ou canjarana, atinge 30 a 40 m de altura e ocorre na região neotropical, desde a Costa Rica até o Nordeste da Argentina (Barreiros e Souza, 1986). No Brasil, ocorre de norte a sul em matas de galerias e florestas (Barreiros e Souza, 1986). Devido à madeira de alta durabilidade, a espécie foi muito explorada comercialmente, e é considerada vulnerável à extinção (Zimmermann e Fleig, 2018). É uma espécie tolerante à sombra cujos indivíduos jovens são encontrados no subosque das florestas e, ao atingirem o dossel, investem na expansão lateral da copa (Zimmermann e Fleig, 2018). Esta espécie também é tolerante a inundações e é recomendada para recuperação de matas ciliares (Durigan e Nogueira, 1990).

Com base em especialistas de viveiro e pesquisas realizadas na mesma fitofisionomia e região onde as sementes foram coletadas para o estudo, é consenso que *C. pachystachya* e *H. popayanensis* são espécies intolerantes à sombra, que ocorrem apenas em áreas com alta exposição à luz (Silva e Soares-Silva, 2000; Cavalheiro et al., 2002; Zangaro et al., 2003; Calzavara et al., 2019). Já *C. estrellensis* e *C. canjerana* são espécies tolerantes à sombra, representadas por árvores de grande porte, cujas copas podem exceder o nível médio do dossel (Pillar e Quadros, 1997; Silva e Soares-Silva, 2000). Todas essas espécies são potencialmente importantes para serem utilizadas em programas de regeneração florestal.

Considerando o exposto, neste estudo foi levantada a seguinte hipótese geral: a tolerância à toxicidade de amônio e à deficiência do nitrogênio em plantas de espécies arbóreas da Mata Atlântica de diferentes grupos ecológicos aumenta com a inoculação de BPCP.

REFERÊNCIAS

- Adams, W.W. III, Muller, O., Cohu, C.M., Demmig-Adams, B., 2013. May photoinhibition be a consequence, rather than a cause, of limited plant productivity? *Photosynth. Res.* 117, 31–44.
- Ahmed, A., Hasnain, S., 2010. Auxin producing *Bacillus* sp.: Auxin quantification and effect on the growth *Solanum tuberosum*. *Pure Appl. Chem.* 82, 313–319.
- Aidar, M.P.M., Schmidt, S., Moss, G., Stewart, G.R., Joly, C.A., 2003. Nitrogen use strategies of neotropical rainforest trees in threatened Atlantic Forest. *Plant Cell Environ.* 26, 389–399.
- Allen, C.D., Macalady, A.K., Chenchouni, H., Bachelet, D., McDowell, N., Vennetier, M., Kitzberger, T., Rigling, A., Breshears, D.D., Hogg, E.H., Gonzalez, P., Fensham, R., Zhang, Z., Castro, J., Demidova, N., Lim, J.H., Allard, G., Running, S.W., Semerci, A., Cobb, N., 2010. A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecol. Manag.* 259, 660–684.
- Aloni, R., Aloni, E., Langhans, M., 2006. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: Regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Ann. Bot.* 97, 883–893.
- Amazonas, NT., Martinelli, L.A., Piccolo, M.C., Rodrigues, R.R., 2011. Nitrogen dynamics during ecosystem development in tropical forest restoration. *Forest Ecol. Manag.* 262, 1551–1557.
- Argueso, C.T., Ferreira, F.J., Kieber, J.J., 2009. Environmental perception avenues: the interaction of cytokinin and environmental response pathways. *Plant Cell Environ.* 32, 1147–1160.
- Arias, R.S., Sagardoy, M.A., van Vuurde, J.W.L., 1999. Spatiotemporal distribution of naturally occurring *Bacillus* spp. and other bacteria on the phylloplane of soybean under field conditions. *J. Basic Microb.* 39, 283–292.
- Armada, E., Portela, G., Roldan, A., Azcon, R., 2014 Combined use of beneficial soil microorganism and agrowaste residue to cope with plant water limitation under semiarid conditions. *Geoderma* 232, 3–41.
- Ashraf, M., 2009. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnol. Adv.* 27, 84–93.
- Ashraf, M., 1994. Breeding for salinity tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13, 17–42.
- Bacilio, M., Hernandez, J.P., Bashan, Y., 2006. Restoration of giant cardon cacti in barren desert soil amended with common compost and inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Biol. Fert. Soils* 43, 112–119.
- Bacilio, M., Rodriguez, H., Moreno, M., Hernandez, J.P., Bashan, Y., 2004. Mitigation of salt stress in wheat seedlings by a gfp-tagged *Azospirillum lipoferum*. *Biol. Fert. Soils* 40, 188–193.
- Bacilio, M., Vazquez, P., Bashan, Y., 2003. Alleviation of noxious effects of cattle ranch composts on wheat seed germination by inoculation with *Azospirillum* spp. *Biol. Fert. Soils* 38, 261–266.
- Bacon, P.R., 1995. Nitrogen fertilization in the environment. Marcel Dekker, New York.
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M., 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 233–266.

- Barreiros, H.D.S., Souza, D.S.E., 1986. Notas geográficas e taxonômicas sobre *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. no Brasil (Meliaceae). Rev. Bras. Biol. 46, 17–26.
- Bashan, Y., de-Bashan, L.E., 2010. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth – a critical assessment. Adv. Agron. 108, 77–136.
- Bashan, Y., de-Bashan, L.E., Prabhu, S.R., Hernandez, J.P., 2014. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). Plant Soil 378, 1–33.
- Bashan, Y., Holguin, G., 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990–1996). Can. J. Microbiol. 43, 103–121.
- Bashan, Y., Holguin, G., 2002. Plant growth-promoting bacteria: a potential tool for arid mangrove reforestation. Trees- Struct. Funct. 16, 159–166.
- Bashan, Y., Moreno, M., Troyo, E., 2000. Growth promotion of the seawater-irrigated oilseed halophyte *Salicornia bigelovii* inoculated with mangrove rhizosphere bacteria and halo tolerant *Azospirillum* spp. Biol. Fert. Soils 32, 265–272.
- Bashan, Y., Rojas, A., Puente, M.E., 1999. Improved establishment and development of three cacti species inoculated with *Azospirillum brasilense* transplanted into disturbed urban desert soil. Can. J. Microbiol 45, 441–451.
- Bashan, Y., Salazar, B., Moreno, M., Lopez, B.R., Linderman, R.G., 2012. Restoration of eroded soil in the Sonoran Desert with native leguminous trees using plant growth-promoting microorganisms and limited amounts of compost and water. J. Environ. Manage. 102, 26–36.
- Bashan, Y., Salazar, B., Puente, M.E., Bacilio, M., Linderman, R.G., 2009b. Enhanced establishment and growth of giant cardon cactus in an eroded field in the Sonoran Desert using native legume trees as nurse plants aided by plant growth-promoting microorganisms and compost. Biol. Fert. Soils 45, 585–594.
- Bashan, Y., Salazar, B., Puente, M.E., 2009a. Responses of native legume desert trees used for reforestation in the Sonoran Desert to plant growth-promoting microorganisms in screen house. Biol. Fert. Soils 45, 655–662.
- Bashan, Y., 1986. Significance of timing and level of inoculation with rhizosphere bacteria on wheat plants. Soil Biol. Biochem. 18, 297–301.
- Bashan, Y., Singh, C.S., Levanony, H., 1989. Contribution of *Azospirillum brasilense* Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation. Can. J. Bot. 67, 2429–2434.
- Belimov, A., Dietz, K.J., 2000. Effect of associative bacteria on element composition of barley seedlings grown in solution culture at toxic cadmium concentrations. Int. J. Microbiol. Res. 155, 113–121.
- Belimov, A.A., Safronova, V.I., Sergeyeva, T.A., Egorova, T.N., Matveyeva, V.A., Tsyganov, V.E., Borisov, A.Y., Tikhonovich, I.A., Kluge, C., Preisfield, A., Dietz, K.J., Stepanok, V.V., 2002. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. Can. J. Microbiol 47, 642–652.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., Passaglia, L.M.P., 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. Genet. Mol. Biol. 35, 1044–1051.
- Beneduzi, A., Peres, D., Vargas, L.K., Bodanese-Zanettini, M.H., Passaglia, L.M.P., 2008. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. Appl. Soil Ecol. 39, 311–320.

- Bittsánszky, A., Pilinszky, K., Gyulai, G., Komives, T., 2015. Overcoming ammonium toxicity. *Plant Sci.* 231, 184–190.
- Bloom, A.J., Burger, M., Asensio, J.S.R., Cousins, A.B., 2010. Carbon dioxide enrichment inhibits nitrate assimilation in wheat and *Arabidopsis*. *Science* 328, 899–903.
- Boussadia, O., Steppe, K., Zgallai, H., Hadj, S.B.E., Braham, M., Lemeur, R., van Labeke, M.C., 2010. Effects of nitrogen deficiency on leaf photosynthesis, carbohydrate status and biomass production in two olive cultivars 'Meski' and 'Koroneiki'. *Sci. Hortic.* 123, 336–342.
- Brancalion, P.H.S., Viani, R.A.G., Strassburg, B.B.N., Rodrigues, R.R., 2012. Finding the money for tropical forest restoration. *Unasylva* 239, 41–50.
- Britto, D.T., Kronzucker, H.J., 2002. NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. *J. Plant Physiol.* 159, 567–584.
- Britto, D.T., Kronzucker, H.J., 2013. Ecological significance and complexity of N source preference in plants. *Ann. Bot.* 112, 957–963.
- Britto, D.T., Kronzucker, H.J., 2005. Nitrogen acquisition, PEP carboxylase, and cellular pH homeostasis: new views on old paradigms. *Plant Cell Environ.* 28, 1396–1409.
- Britto, D.T., Siddiqi, M.Y., Glass, A.D.M., Kronzucker, H.J., 2001. Futile transmembrane NH_4^+ cycling: a cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. *PNAS* 98, 4255–4258.
- Calzavara, A.K., Bianchini, E., Pimenta, J.A., Oliveira, H.C., Stolf-Moreira, R., 2019. Photosynthetic light-response curves of light-demanding and shade-tolerant seedlings of neotropical tree species. *Photosynthetica* 57, 470–474.
- Calzavara, A.K., Paiva, P.H.G., Gabriel, L.C., Oliveira, A.L.M., Milani, K.S., Oliveira, H.C., Bianchini, E., Pimenta, J.A., Oliveira, M.C.N., Dias-Pereira, J., Stolf-Moreira, R., 2018. Associative bacteria influence maize (*Zea mays* L.) growth, physiology and root anatomy under different nitrogen levels. *Plant Biol.* 20, 870–878.
- Carrillo, A.E., Li, C.Y., Bashan, Y., 2002. Increased acidification in the rhizosphere of cactus seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. *Naturwissenschaften* 89, 428–432.
- Carrillo-Garcia, A., Bashan, Y., Bethlenfalvay, G.J., 2000a. Resource-island soils and the survival of the giant cactus, cardon, of Baja California Sur. *Plant Soil* 218, 207–214.
- Carrillo-Garcia, A., Bashan, Y., Diaz-Rivera, E., Bethlenfalvay, G.J., 2000b. Effects of resource island soils, competition, and inoculation with *Azospirillum* on survival and growth of *Pachycereus pringlei*, the giant cactus of the Sonoran Desert. *Restor. Ecol.* 8, 65–73.
- Carvalho, L.C., Dennis, P.G., Fedoseyenko, D., Hajirezaei, M.R., Borriss, R., von Wirén, N., 2011. Root exudation of sugars, amino acids, and organic acids by maize as affected by nitrogen, phosphorus, potassium, and iron deficiency. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 174: 3–11.
- Carvalho, T.L.G., Balsemão-Pires, E., Saraiva, R.M., Ferreira, P.C.G., Hemerly, A.S., 2014. Nitrogen signaling in plant interactions with associative diazotrophic bacteria. *J. Exp. Bot.* 65, 5631–5642.
- Casano, L.M., Martin, M., Sabater, B., 1994. Sensitivity of superoxide dismutase transcript levels and activities of oxidative stress is lower in mature-senescent than in young barley leaves. *Plant Physiol.* 106, 1033–1039.
- Cavaleiro, A.L., Torezan, J.M.D., Fadelli, L., 2002. Recuperação de áreas degradadas, in: Medri, M.E., Bianchini, E., Shibatta, O.A., Pimenta, J.A. (Eds.), *A bacia do Rio Tibagi*. Publicado pelos autores, Londrina, 213–224.
- Chanway, C.P., 1997. Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: an emerging technology for reforestation. *Forest Sci.* 43, 99–112.

- Chen, G., Guo, S.W., Kronzucker, H.J., Shi, W.M., 2013. Nitrogen use efficiency (NUE) in rice links to NH_4^+ toxicity and futile NH_4^+ cycling in roots. *Plant Soil* 369, 351–363.
- Cheng, Y.T., Zhang, L., He, S.Y., 2019. Plant-microbe interactions facing environmental changes. *Cell Host Microbe* 26, 183–192.
- Chi, F., Shen, S.H., Cheng, H.P., Jing, J.X., Yanni, Y.G., Dazzo, F.B., 2005. Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7271–7278.
- Clarkson, D.T., 1985. Factors affecting mineral nutrient acquisition by plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36, 77–115.
- Compant, S., Clément, C., Sessitsch, A., 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol. Biochem.* 42, 669–678.
- Cortina, J., Vilagrosa, A., Trubat, R., 2013. The role of nutrients for improving seedling quality in drylands. *New Forest.* 44, 719–732.
- Coskun, D., Britto, D.T., Li, M., Becker, A., Kronzucker, H.J., 2013. Rapid ammonia gas transport accounts for futile transmembrane cycling under $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ toxicity in plant roots. *Plant Physiol.* 163, 1859–1867.
- Costa, G.S., Dalmolin, A.C., Schilling, A.C., Sanches, C., Santos, M.S., Mielke, M.S., 2019. Physiological and growth strategies of two *Cariniana* species in response to contrasting light availability. *Flora* 258, 151427.
- Couto, G.M., Eisenhouer, N., Oliveira, E.B., Cesarz, S., Feliciano, A.L.P., Marangon, L.C., 2016. Response of soil microbial biomass and activity in early restored lands in the northeastern Brazilian Atlantic Forest. *Rest. Ecol.* 24, 609–616.
- Craven, D., Dent, D., Braden, D., Ashton, M.S., Berlyn, G.P., Hall, J.S., 2011. Seasonal variability of photosynthetic characteristics influences growth of eight tropical tree species at two sites with contrasting precipitation in Panama. *Forest Ecol. Manag.* 261, 1643–1653.
- Creus, C.M., Sueldo, R.J., Barassi, C.A., 1997. Shoot growth and water status in *Azospirillum*-inoculated wheat seedlings grown under osmotic and salt stresses. *Plant Physiol. Bioch.* 35, 939–944.
- Cruz, C., Domínguez-Valdivia, M.D., Aparicio-Tejo, P.M., Lamsfus, C., Bio, A., Martins-Loução, M.A., Moran, J.F., 2011. Intra-specific variation in pea responses to ammonium nutrition leads to different degrees of tolerance. *Environ. Exp. Bot.* 70, 233–243.
- Dash, S., Mohapatra, A.K., Gupta, N., 2013. Growth response of *Dalbergia sissoo* Roxb. to mineral solubilizing bacteria and fungi in nursery conditions. *Trop. Ecol.* 54, 109–115.
- de-Bashan, L.E., Antoun, H., Bashan, Y., 2005. Cultivation factors and population size control uptake of nitrogen by the microalgae *Chlorella vulgaris* when interacting with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54, 197–203.
- de-Bashan, L.E., Mayali, X., Bebout, B.M., Weber, P.K., Detweiler, A.M., Hernandez, J.P., Prufert-Bebout, L., Bashan, Y., 2016. Establishment of stable synthetic mutualism without co-evolution between microalgae and bacteria demonstrated by mutual transfer of metabolites (NanoSIMS isotopic imaging) and persistent physical association (Fluorescent *in situ* hybridization). *Algal Res.* 15, 179–186.
- Debiasi, T.V., Calzavara, A.K., Silva, L.M., Silva, J.G., Bianchini, E., Pimenta, J.A., Stolf-Moreira, R., Aidar, M.P.M., Sodek, L., Oliveira, H.C., 2019. Nitrogen metabolism of Neotropical tree seedlings with contrasting ecological characteristics. *Acta Physiol. Plant.* 41, 131.

- Dias, T., Clemente, A., Martins-Loução, M.A., Sheppard, L., Bobbink, R., Cruz, C., 2014. Ammonium as a driving force of plant diversity and ecosystem functioning: observations based on 5 years' manipulation of N dose and form in a Mediterranean ecosystem. *Plos One* 9, e92517.
- Drath, M., Kloft, N., Batschauer, A., Marin, K., Novak, J., Forchhammer, K., 2008. Ammonia triggers photodamage of photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Plant Physiol.* 147, 206–215.
- Durigan, G., Figliolia, M.B., Kawabata, M., Garrido, M.A.O., Baitello, J.B., 2002. Sementes e mudas de árvores tropicais. Páginas & Letras, São Paulo.
- Durigan, G., Nogueira, J.C.B., 1990. Recomposição de matas ciliares: orientações básicas. IF/Séries registros, São Paulo.
- Egamberdiyeva, D., 2007. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Appl. Soil Ecol.* 36, 184–189.
- El-Iklil, Y., Karrou, M., Benichou, M., 2000. Salt stress effect on epinasty in relation to ethylene production and water relations in tomato. *Agronomie* 20, 399–406.
- El-Komy H.M., Hamdia, M.A., Abd El-Baki, G.K., 2003. Nitrate reductase in wheat plants grown under water stress and inoculated with *Azospirillum* spp. *Biol. Plantarum* 46, 281–287.
- Enebak, S.A., 2005. Rhizobacteria isolated from loblolly pine seedlings mediate growth-promotion of greenhouse-grown loblolly, slash, and longleaf pine seedlings. *Forest Sci.* 51, 541–545.
- Enebak, S.A., Wei, G., Kloepper, J.W., 1998. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedlings. *Forest Sci.* 44, 139–144.
- Esteban, R., Ariz, I., Moran, J.F., 2016a. Review: mechanisms of ammonium toxicity and the quest for tolerance. *Plant Sci.* 248, 92–101.
- Esteban, R., Royo, B., Urarte, E., Zamarreño, M., Garcia-Mina, J.M., Moran, J.F., 2016b. Both free indole-3-acetic acid and photosynthetic performance are important players in the response of *Medicago truncatula* to urea and ammonium nutrition under axenic conditions. *Front. Plant Sci.* 16, 140.
- Estes, B.L., Enebak, S.A., Chappelka, A.H., 2004. Loblolly pine seedling growth after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria and ozone exposure. *Can. J. Forest Res.* 34, 1410–1416.
- Evans, J.R., 1989. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C₃ plants. *Oecologia* 78, 9–19.
- Favaretto, V.F., Martinez, C.A., Soriani, H.H., Furriel, R.P.M., 2011. Differential responses of antioxidant enzymes in pioneer and late-successional tropical tree species grown under sun and shade conditions. *Environ. Exp. Bot.* 70, 20–28.
- Fonseca, C.R., Ganade, G., Baldissera, R., Becker, C.G., Boelter, C.R., Brescovit, A.D., Campos, L.M., Fleck, T., Fonseca, V.S., Hartz, S.M., Joner, F., Käffer, M.I., Leal-Zanchet, A.M., Marcelli, M.P., Mesquita, A.S., Mondin, C.A., Paz, C.P., Petry, M.V., Piovensan, F.N., Putzke, J., Stranz, A., Vergara, M., Vieira, E.M., 2009. Towards an ecologically sustainable forestry in the Atlantic Forest. *Biol. Conserv.* 142, 1209–1219.
- Fukami, J., Abrantes, J.L.F., del Cerro, P., Nogueira, M.A., Ollero, F.J., Megías, M., Hungria, M., 2018a. Revealing strategies of quorum sensing in *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6. *Arch. Microbiol.* 200, 47–56.
- Fukami, J., Cerezini, P., Hungria, M., 2018b. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Expr.* 8: 73.

- Fukami, J., Ollero, F.J., Megías, M., Hungria, M., 2017. Phytohormones and induction of plant stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. *AMB Express* 7, 153.
- Gamalero, E., Lingua, G., Berta, G., Lemanceau, P., 2003. Methods for studying root colonization by introduced beneficial bacteria. *Agronomie* 23, 407–418.
- García, J.A.L., Domenech, J., Santamaria, C., Camacho, M., Daza, A., Manero, F.J.G., 2004. Growth of forest plants (pine and Holm oak) inoculated with rhizobacteria: relationship with microbial community structure and biological activity of its rhizosphere. *Environ. Exp. Bot.* 52, 239–251.
- Gerendás, J., Zhu, Z., Bendixen, R., Ratcliffe, G., Sattelmacher, B., 1997. Physiological and biochemical processes related to ammonium toxicity in higher plants. *J. Plant Nutr. Soil Sc.* 160, 239–251.
- Glick, B.R., Bashan, Y., 1997. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of fungal phytopathogens. *Biotechnol. Adv.* 15, 353–378.
- Glick, B.R., Cheng, Z., Czarny, J., Cheng, Z., Duan, J., 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 119, 329–339.
- Glick, B.R., 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41, 109–117.
- Goes, K.C.G.P., Fisher, M.L.C., Cattelan, A.J., Nogueira, M.A., Carvalho, C.G.P., Oliveira, A.L.M., 2012. Biochemical and molecular characterization of high population density bacteria isolated from sunflower. *J. Microbiol. Biotechn.* 22, 437–447.
- Gong, M., Wang, J.D., Zhang, J., Yang, H., 2006. Study of the antifungal ability of *Bacillus subtilis* strain PY-1 *in vitro* and identification of its antifungal substance (Iturin A). *Acta Bioch. Bioph. Sin.* 38, 233–240.
- Grandlic, C.J., Mendez, M.O., Chorover, J., Machado, B., Maier, R.M., 2008. Identification of plant growth-promoting bacteria suitable for phytostabilization of mine tailings. *Envir. Sci. Tech.* 42, 2079–2084.
- Grayston, S.J., Vaughan, D., Jones, D., 1996. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Appl. Soil Ecol.* 5: 29–56.
- Guo, S., Zhou, Y., Shen, Q., Zhang, F., 2007. Effect of ammonium and nitrate nutrition on some physiological processes in higher plants – growth, photosynthesis, photorespiration, and water relations. *Plant Biol.* 9, 21–29.
- Gutiérrez-Mañero, F.J., Acero, N., Lucas, J.A., Probanza, A., 1996. The influence of native rhizobacteria on European alder (*Alnus glutinosa* [L.] Gaertn.) growth. II. Characterisation and biological assays of metabolites from growth promoting and growth inhibiting bacteria. *Plant Soil* 182, 67–74.
- Gutiérrez-Mañero, F.J., Ramos, B., Probanza, A., Mehouchi, J., Tadeo, F.R., Talón, M., 2001. The plant growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiological active gibberellins. *Physiol. Plantarum* 111, 206–211.
- Hartmann, A.H., Fu, A., Burris, R.H., 1986. Regulation of nitrogenase activity by ammonium chloride in *Azospirillum* spp. *Journal Bacteriol.* 165, 864–870.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann. Microbiol.* 60, 579–598.

- Herrera, M.A., Salamanca, C.P., Barea, J.M., 1993. Inoculation of woody legumes with selected arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia to recover desertified Mediterranean ecosystems. *Appl. Environ. Microb.* 59, 129–133.
- Hungria, M., Campo, R.J., Souza, E.M., Pedrosa, F.O., 2010. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil* 331, 413–425.
- Jacobs, D.F., Salifu, K.F., Seifert, J.R., 2005. Relative contribution of initial root and shoot morphology in predicting field performance of hardwood seedlings. *New Forest.* 30, 235–251.
- Jaleel, C.A., Riadh, K., Gopi, R., Manivannan, P., Inés, J., Al-Juburi, H.J., Chang-Xing, Z., Hong-Bo, S., Panneerselvam, R., 2009. Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. *Acta Physiol. Plant.* 31, 427–436.
- James, E.K., Gyaneshwar, P., Mathan, N., Barraquio, W.L., Reddy, P.M., Iannetta, P.P.M., Olivares, F.L., Ladha, J.K., 2002. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Mol. Plant Microbe In.* 15, 894–906.
- Janzen, R.A., Rood, S.B., Dormaar, J.F., McGill, W.B., 1992. *Azospirillum brasilense* produces gibberellin in pure culture and chemically defined medium and in co-culture on straw. *Soil Biol. Biochem.* 24, 1061–1064.
- Joo, G.J., Kim, Y.M., Lee, I.J., Song, K.S., Rhe, I.K., 2004. Growth promotion of red pepper plug seedlings and the production of gibberellins by *Bacillus cereus*, *Bacillus macroides* and *Bacillus pumilus*. *Biotechnol Lett* 26, 487–491.
- Juhrbandt, J., Leuschner, C., Hölscher, D., 2004. The relationship between maximal stomatal conductance and leaf traits in eight Southeast Asian early successional tree species. *Forest Ecol. Manag.* 202, 245–256.
- Kamnev, A.A., Sadovnikova, Y.N., Antonyuk, L.P., 2008. Effects of nitrogen deficiency and wheat lectin on the composition and structure of some biopolymers of *Azospirillum brasilense* Sp245. *Microbiology* 77, 240–242.
- Khan, A.L., Waqas, M., Kang, S.M., 2014. Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. *J. Microbiol.* 52, 689–695.
- Kloepper, J.W., Ryu, C.M., Zhang, S.A., 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94, 1259–1266.
- Kolb, W., Martin, P., 1988. Influence of nitrogen on the number of N₂ fixing and total bacteria in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 20, 221–225.
- Kotur, Z., Siddiqi, Y.M., Glass, A.D., 2013. Characterization of nitrite uptake in *Arabidopsis thaliana*: evidence for a nitrite-specific transporter. *New Phytol.* 200, 201–210.
- Kronzucker, H.J., Siddiqi, M.Y., Glass, A.M., 1997. Conifer root discrimination against soil nitrate and the ecology of forest succession. *Nature* 385, 59–61.
- Kronzucker, H.J., Siddiqi, M.Y., Glass, A.D.M., Britto, D.T., 2003. Root ammonium transport efficiency as a determinant in forest colonization patterns: an hypothesis. *Physiol. Plantarum* 117, 164–170.
- Kubota, T.Y.K., Silva, A.M., Cambuim, J., Silva, A.A., Pupin, S., Silva, M.S., Moraes, M.A., Moraes, M.L.T., Sebben, A.M., 2017. Mendelian inheritance, genetic linkage, and genotypic disequilibrium for nine microsatellite loci in *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze (Lecythydaceae). *GMR* 16, 16029653.

- Kusano, M., Fukushima, A., Redestig, H., Saito, K., 2011. Metabolomic approaches toward understanding nitrogen metabolism in plants. *J. Exp. Bot.* 62, 1439–1453.
- Lea, P.J., 1993. Nitrogen Metabolism. in: Lea, P.J., Leegood, R.C. (Eds.), *Plant biochemistry and Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York, 155–180.
- Lee, R.B., Rudge, K.A., 1986. Effects of nitrogen deficiency on the absorption of nitrate and ammonium by barley plants. *Ann. Bot.* 57, 471–486.
- Lemaître, T., Gaufichon, L., Boutet-Mercey, S., Christ, A., Masclaux-Daubresse, C., 2008. Enzymatic and metabolic diagnostic of nitrogen deficiency in *Arabidopsis thaliana* Wassileskija accession. *Plant Cell Physiol.* 49, 1056–1065.
- Li, G.J., Li, B.H., Dong, G.Q., Feng, X.Y., Kronzucker, H.J., Shi, W.M., 2013. Ammonium-induced shoot ethylene production is associated with the inhibition of lateral root formation in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 64, 1413–1425.
- Logan, B.A., Demmig-Adams, B., Rosenstiel, T.N., Adams, W.W. III., 1999. Effect of nitrogen limitation on foliar antioxidants in relationship to other metabolic characteristics. *Planta* 209, 213–220.
- Lok, A.F.S., Tan, K., Chong, K.Y., Nghiem, T.P.L., Tan, H.T.W., 2010. The distribution and ecology of *Cecropia* species (Urticaceae) in Singapore. *NiS* 3, 199–209.
- Lopez, B.R., Bashan, Y., Bacilio, M., 2011. Endophytic bacteria of *Mammillaria fraileana*, an endemic rock-colonizing cactus of the Southern Sonoran Desert. *Arch. Microbiol.* 193, 527–541.
- Lorenzi, H., 2016. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. v.1. Editora Plantarum, São Paulo.
- Lugtenberg, B.J.J., Chin-A-Woeng, T., Bloemberg, G., 2002. Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 373–383.
- Makino, A., Osmond, B., 1991. Effects of nitrogen nutrition on nitrogen partitioning between chloroplast and mitochondria in pea and wheat. *Plant Physiol.* 96, 355–362.
- Mao, Q., Lu, X., Mo, H., Gundersen, P., Mo, J., 2018. Effects of simulated N deposition on foliar nutrient status, N metabolism and photosynthetic capacity of three dominant understory plant species in a mature tropical forest. *Sci. Total Environ.* 610–611, 555–562.
- Mantelin, S., Touraine, B., 2004. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *J. Exp. Bot.* 55, 27–34.
- Maathuis, F.J.M., 2009. Physiological functions of mineral macronutrients. *Curr. Opin. Plant Biology* 12, 250–258.
- Marschner, H., 1995. *Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press, London.
- Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Drchorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L., Suzuki, A., 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Ann. Bot.* 105, 1141–1157.
- Mattsson, A., 1996. Predicting field performance using seedling quality assessment. *New Forest.* 13, 227–252.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405–410.
- Muthukumarasamy, R., Revathi, G., Loganathan, P., 2002. Effect of inorganic N on the population, *in vitro* colonization and morphology of *Acetobacter diazotrophicus* (syn *Gluconacetobacter diazotrophicus*). *Plant Soil* 243, 91–102.

- Nadeem, S.M., Ahmad, M., Zahir, Z.A., Javaid, A., Ashraf, M., 2014. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnol. Adv.* 32, 429–448.
- Nguyen, L.T.T., Osanai, Y., Lai, K., Anderson, I.C., Bange, M.P., Tissue, D.T., Singh, B.K., 2018. Responses of the soil microbial community to nitrogen fertilizer regimes and historical exposure to extreme weather events: flooding or prolonged-drought. *Soil Biol. Biochem.* 118, 227–236.
- Okon, Y., Vanderleyden, J., 1997. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. *ASM News* 63, 366–370.
- Oliveira, A.L.M., de Canuto, E.L., Urquiaga, S., Reis, V.M., Baldani, J.I., 2006. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. *Plant Soil* 284, 23–32.
- Oliveira, A.L.M., Santos, O.J.A.P., Marcelino, P.R.F., Milani, K.M.L., Zuluaga, M.Y.A., Zucareli, C., Gonçalves, L.S.A., 2017b. Maize inoculation with *Azospirillum brasilense* Ab-V5 cells enriched with exopolysaccharides and polyhydroxybutyrate results in high productivity under low N fertilizer input. *Front. Microbiol.* 8, 1873.
- Oliveira, H.C., Silva, L.M.I., Freitas, L.D., Debiasi, T.V., Marchiori, N.M., Aidar, M.P.M., Bianchini, E., Pimenta, J.A., Stolf-Moreira, R., 2017a. Nitrogen use strategies of seedlings from neotropical tree species of distinct successional groups. *Plant Physiol. Bioch.* 114, 119–127.
- Ortiz-Castro, R., Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., López-Bucio, J., 2009. The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signal. Behav.* 4, 701–712.
- Perez-Garcia, A., Romero, D., de Vicente, A., 2011. Plant protection and growth simulation by microorganism: Biotechnological applications of *Bacillus* in agriculture. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22, 187–193.
- Perrine-Walker, F.M., Prayitno, J., Rolfe, B.G., Weinman, J.J., Hocart, C.H., 2007. Infection process and the interaction of rice roots with rhizobia. *J. Exp. Bot.* 58, 3343–3350.
- Pillar, V.D., Quadros, F.L.F., 1997. Grassland-forest boundaries in Southern Brazil. *Coenoses* 12, 119–126, 1997.
- Podgórska, A., Gieczewska, K., Lukawska-Kuzma, K., Rasmusson, A.G., Gardeström, P., Szal, B., 2013. Long-term ammonium nutrition of *Arabidopsis* increases the extrachloroplastic NAD(P)H/NAD(P)⁺ ratio and mitochondrial reactive oxygen species level in leaves but does not impair photosynthetic capacity. *Plant Cell Environ.* 36, 2034–2045.
- Portela, F.C.S., Macieira, B.P.B., Zanetti, L.V., Gama, V.N., Silva, D.M., Milanez, C.R., Cuzzuol, G.R.F., 2019. How does *Cariniana estrellensis* respond to different irradiance levels? *J. For. Res.* 30, 31–44.
- Prabhat, N.J., Gupta, G., Jha, P., Mehrotra, R., 2013. Association of rhizospheric/endophytic bacteria with plants: a potential gateway to sustainable agriculture. *Greener J. Agric. Sci.* 3, 7384.
- Probanza, A., Lucas-García, J.A., Ruiz-Palomino, M., Ramos, B., Gutiérrez-Mañero, F.J., 2002. *Pinus pinea* L. seedling growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR *Bacillus* (*B. licheniformis* CECT 5106 and *B. pumilus* CECT 5105). *Appl. Soil Ecol.* 20, 75–84.
- Puente, M.E., Bashan, Y., 1993. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* strains on the germination and seedlings growth of the giant columnar Cardon cactus (*Pachycereus pringlei*). *Symbiosis* 15, 49–60.

- Puente, M.E., Bashan, Y., Li, C.Y., Lebsky, V.K., 2004. Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. I. Root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biol.* 6, 629–642.
- Rabbee, M. F., Ali, M.S., Choi, J., Hwang, B.S., Jeong, S.C., Baek, K., 2019. *Bacillus velezensis*: a valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules* 24, 1046.
- Remans, T., Nacry, P., Pervent, M., Girin, T., Tillard, P., Lepetit, M., Gojon, A., 2006. A central role for the nitrate transporter NRT2.1 in the integrated morphological and physiological responses of the root system to nitrogen limitation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 140, 909–921.
- Rey Benayas, J.M., Newton, A.C., Diaz, A., Bullock, J.M., 2009. Enhancement of biodiversity and ecosystem services by ecological restoration: a meta-analysis. *Science* 325, 1121–1124.
- Robinson, D., 1994. The responses of plants to non-uniform supplies of nutrients. *New Phytol* 127, 635–674.
- Robyns, A., 1964. Flora of Panama. Part VI. Family 114. Tiliaceae. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 51, 1–35.
- Rodrigues, J.L.M., Pellizari, V.H., Mueller, R., Baek, K., Jesus, E.C., Paula, F.S., Mirza, B., Hamaoui, G.S., Tsai, S.M., Feigl, B., Tiedje, J.M., Bohannan, B.J.M., Nusslein, K., 2013. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. *PNAS USA* 110, 988–993.
- Romaniuc, S., Gaglioti, A.L., 2014. Lista de Espécies da Flora do Brasil: *Urticaceae*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Roosta, H.R., Schjoerring, J.K., 2008. Root carbon enrichment alleviates ammonium toxicity in cucumber plants. *J. Plant Nutr.* 31, 941–958.
- Rosegrant, M.W., Ringler, C., Zhu, T., 2009. Water for agriculture: maintaining food security under growing scarcity. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 34, 205–222.
- Rubio-Wilhemí, M.M., Sanchez-Roriguez, E., Rosales, M.A., Begoña, B., Rios, J.J., Romero, L., Blumwald, E., Ruiz, J.M., 2011. Effect of cytokinins on oxidative stress in tobacco plants under nitrogen deficiency. *Environ. Exp. Bot.* 72, 167–173.
- Saha, C., Mukherjee, G., Agarwal-Banka, P., Seal, A., 2016. A consortium of non-rhizobial endophytic microbes from *Typha angustifolia* functions as probiotic in rice and improves nitrogen metabolism. *Plant Biol.* 18, 938–946.
- Santos, C.B., Longhi, S.J., Hoppe, J.M., Moscovich, F.A., 2000. Efeito do volume de tubetes e tipos de substratos na qualidade de mudas de *Cryptomeria japonica* (L.F.) D. Don. *Ciênc. Florest.* 10,1–15.
- Santos, J.F.C., Gleriani, J.M., Velloso, S.G.S., Souza, G.S.A., Amaral, C.H., Torres, F.T.P., Medeiros, N.G., Reis, M., 2019. Wildfires as major challenge for natural regeneration in Atlantic Forest. *Sci. Tot. Environ.* 650, 809–821.
- Sarasketa, A., González-Moro, M.B., González-Murua, C., Marino, D., 2014. Exploring ammonium tolerance in a large panel of *Arabidopsis thaliana* natural accessions. *J. Exp. Bot.* 65, 6023–6033.
- Sastry, M.S.R., Sharma, A.K., Johri, B.N., 2000. Effect of an AM fungal consortium and *Pseudomonas* on the growth and nutrient uptake of *Eucalyptus* hybrid. *Mycorrhiza* 10, 55–61.
- Scheible, W.R., Morcuende, R., Czechowski, T., Fritz, C., Osuna, D., Palacios-Rojas, N., Schindelasch, D., Thimm, O., Udvardi, M.K., Stitt, M., 2004. Genome-wide reprogramming

- of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of Arabidopsis in response to nitrogen. *Plant Physiol.* 136, 2483–2499.
- Schimann, H., Ponton, S., Hattenschwiler, S., Ferry, B., Lensi, R., Domenach, A.M., Roggy, J.C., 2008. Differing nitrogen use strategies of two tropical rainforest late successional tree species in French Guiana evidence from ^{15}N natural abundance and microbial activities. *Soil Biol. Biochem.* 40, 487–494.
- Schmidt, S., Stewart, G.R., 1998. Transport, storage and mobilization of nitrogen by trees and shrubs in the wet/dry tropics of northern Australia. *Tree Physiol.* 18, 403–410.
- Schmidt, S., Stewart, G.R., Turnbull, M.H., Erskine, P.D., Ashwath, N., 1998. Nitrogen relations of natural and disturbed communities in tropical Australia. *Oecologia* 117, 95–104.
- Siddique, I., Vieira, I.C., Schmidt, S., Lamb, D., Carvalho, C.J.R., Figueiredo, R.O., Blomberg, S., Davidson, E.A., 2010. Nitrogen and phosphorus additions negatively affect tree species diversity in tropical forest regrowth trajectories. *Ecology* 91, 2121–2131.
- Siddiqui, I.A., Shaukat, S.S., Hussain Sheikh, I., Khan, A., 2006. Role of cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the suppression of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in tomato. *World J. Microb. Biot.* 22, 641–650.
- Silva, F.C., Soares-Silva, L.H., 2000. Arboreal flora of the Godoy Forest State Park, Londrina, PR, Brazil. *Edinburgh J. Bot.* 57, 107–120.
- Simon, J., Dannenmann, M., Pena, R., Gessler, A., Rennenberg, H., 2017. Nitrogen nutrition of beech forests in a changing climate: importance of plant-soil-microbe water, carbon, and nitrogen interactions. *Plant Soil* 418, 89–114.
- Skopelitis, D., Paranychianakis, N., Paschalidis, K., Pliakonis, E., Delis, I., Yakoumakis, D., Kouvarakis, A., Papadakis, A., Stephanou, E., Roubelakis-Anfelakis, K. 2006. Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. *Plant Cell* 18, 2767–2781.
- Sorensen, J., 1997. The rhizosphere as a habitat for soil microorganisms. in: van Elsas, J.D., Trevors, J.T., Wellington, E.M.H. (Eds.), *Modern soil microbiology*. Marcel Dekker, New York, pp. 21–45.
- SOS Mata Atlântica, INPE, 2017. Atlas Dos Remanescentes Florestais Da Mata Atlântica 2015-2016. Fundação SOS Mata Atlântica/Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São Paulo.
- Souza, N.L., Rocha, S.S., Narezzi, N.T., Tiepo, N.A., Oliveira, A.L.M., Oliveira, H.C., Bianchini, E., Pimenta, J.A., Stolf-Moreira, R., 2019. Differential impacts of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on seeds of neotropical tree species with contrasting tolerance to shade. *Trees* 34, 121–132.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R., 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 425–448.
- Steenhoudt, O., Vanderleyden, J., 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 487–506.
- Swain, M.R., Naskar, S.K., Ray, R.C., 2007. Indole-3-acetic acid production and effect on sprouting of Yam (*Dioscorea rotundata* L.) minisetts by *Bacillus subtilis* isolated from culturable cowdung microflora. *Pol. J. Microbiol.* 56, 103–110.
- Teixeira, A.M.G., Soares-Filho, B.S., Freitas, S.R., Metzger, J.P., 2009. Modeling landscape dynamics in an Atlantic rainforest region: implications for conservation. *For. Ecol. Manag.* 257, 1219–1230.

- Tien, T., Gaskin, M., Hubbel, D., 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 1016–1024.
- Tiepo, A.N., Hertel, M.F., Rocha, S.S., Calzavara, A.K., Oliveira, A.L.M., Pimenta, J.A., Oliveira, H.C., Bianchini, E., Stolf-Moreira, R., 2018. Enhanced drought tolerance in seedlings of Neotropical tree species inoculated with plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiol. Bioch.* 130, 277–288.
- Toledo, G., Bashan, Y., Soeldner, A., 1995. *In vitro* colonization and increase in nitrogen fixation of seedling roots of black mangrove inoculated by a filamentous cyanobacteria. *Can. J. Microbiol.* 41, 1012–1020.
- van Dommelen, A., van Bastelaere, E., Keijers, V., Vanderleyden, J., 1997. Genetics of *Azospirillum brasilense* with respect to ammonium transport, sugar uptake, and chemotaxis. *Plant Soil* 194, 155–160.
- van Wees, S.C.M., van der Ent, S., Pieterse, C.M.J., 2008. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 443–448.
- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., Boyce, A.N., 2016. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability – a review. *Molecules* 21, 573.
- Vitousek, P.M., Matson, P.A., Cleve, K.V., 1989. Nitrogen availability and nitrification during succession: primary, secondary, and old-field series. *Plant Soil* 115, 229–239.
- Vonderwell, J.D., Enebak, S.A., 2000. Differential effects of rhizobacterial strain and dose on the ectomycorrhizal colonization of loblolly pine seedlings. *For. Sci.* 46, 437–441.
- von Wirén, N., Gazzarrini, S., Gojon, A., Frommer, W.B., 2000. The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 254–261.
- Wu, S.C., Caob, Z.H., Lib, Z.G., Cheunga, K.C., Wonga, M.H., 2005. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma* 125, 155–166.
- Xie, H., Pasternak, J.J., Glick, B.R., 1996. Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that overproduce indole acetic acid. *Curr. Microbiol.* 32, 67–71.
- Yang, H., von der Fecht-Bartenbach, J., Friml, J., Lohmann, J.U., Neuhäuser, B., Ludewig, U., 2014. Auxin-modulated root growth inhibition in *Arabidopsis thaliana* seedlings with ammonium as the sole nitrogen source. *Funct. Plant Biol.* 2, 239–251.
- Yanni, Y.G., Rizk, R.Y., Corich, V., Squartini, A., Ninke, K., Philip-Hollingsworth, S., Orgambide, G., de Bruin, F., Stoltzfus, J., Buckley, D., Schmidt, T.M., Mateos, P.F., Ladha, J.K., Dazzo, F.B., 1997. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. *Plant Soil* 194, 99–114.
- Zangaro, W., Nisizaki, S.M.A., Domingos, J.C.B., Nakano, E.M., 2003. Mycorrhizal response and successional status in 80 woody species from south Brazil. *J. Trop. Ecol.* 19, 315–324.
- Zhou, Y., Zhang, Y.L., Wang, X., Cui, J., Xia, X., Shi, K., Yu, J., 2011. Effects of nitrogen form on growth, CO₂ assimilation, chlorophyll fluorescence, and photosynthetic electron allocation in cucumber and rice plants. *J. Zhejiang Univ.-Sci. B* 12, 126–134.
- Zhu, Y., Di, T., Xu, G., Chen, X., Zeng, H., Yan, F., Shen, Q., 2009. Adaptation of plasma membrane H⁺-ATPase of rice roots to low pH as related to ammonium nutrition. *Plant Cell Environ.* 32, 1428–1440.

Zimmermann, A.P.L., Fleig, F.D., 2018. Growth of a population of *Cabralea canjerana* in a natural regeneration stage in a secondary forest with use of the liberation. Floresta 49, 554–560.

Capítulo 1 – Maior tolerância ao amônio de mudas de espécies arbóreas neotropicais é promovida por bactérias associativas

Anderson Kikuchi Calzavara^{a,*}, Renata Stolf-Moreira^a, José Antonio Pimenta^a

^a*Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil*

**Autor Correspondente: Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid Km 380, Londrina, PR, 86057-970, Brasil*

E-mail: anderson.calzavara@hotmail.com

Artigo a ser submetido para publicação na revista *Environmental and Experimental Botany*.

Fator de impacto: 3,712.

<https://www.journals.elsevier.com/environmental-and-experimental-botany>

Destaques

- *Cecropia pachystachya* teve o crescimento severamente limitado pelo NH_4^+ .
- O metabolismo do N foi influenciado pela fonte de N e por BPCP em todas as espécies vegetais.
- A inoculação preveniu parcialmente a toxicidade do NH_4^+ em *Heliocarpus popayanensis*.
- As BPCP promoveram aumento da fotossíntese e do crescimento em mudas de *Cabralea canjerana*.

Abreviações

A_{max} , assimilação líquida de CO_2 ; ANR, atividade da enzima nitrato redutase; BPCP, bactérias promotoras do crescimento em plantas; F_v/F_m , eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II; g_s , condutância estomática; N_{in} , plantas não inoculadas com bactérias.

Resumo

As plantas absorvem o nitrogênio (N) do solo principalmente nas formas inorgânicas de amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-), mas muitas espécies desenvolvem sintomas de toxicidade quando cultivadas com NH_4^+ , como é o caso de árvores intolerantes à sombra. O metabolismo do N das plantas é regulado pela forma de N disponível no solo, o que influencia a fotossíntese e o crescimento vegetal. Estes processos podem ser influenciados pela associação com bactérias promotoras do crescimento em plantas (BPCP), por meio de mecanismos diversos. Não há estudos que relacionam os efeitos do cultivo de mudas com NO_3^- e NH_4^+ , com plantas inoculadas com BPCP, sobre o metabolismo e crescimento de espécies arbóreas neotropicais. Neste estudo, objetivou-se verificar os efeitos da inoculação com BPCP sobre a fotossíntese, o crescimento e o metabolismo do N de mudas de espécies arbóreas de diferentes grupos ecológicos que ocorrem na floresta estacional semidecidual do bioma Atlântico, cultivadas com NO_3^- ou NH_4^+ como fonte exclusiva de N. Foram escolhidas quatro espécies, sendo duas intolerantes à sombra – *Cecropia pachystachya* e *Heliocarpus popayanensis* – e duas tolerantes à sombra – *Cariniana estrellensis* e *Cabralea canjerana*. As estirpes Ab-V5, de *Azospirillum brasilense*, e ZK, de *Bacillus velezensis*, foram selecionadas como BPCP para inoculação. Mudas das quatro espécies vegetais foram cultivadas em areia com NO_3^- ou NH_4^+ como fonte de N, e foram também inoculadas com as estirpes Ab-V5 ou ZK. Como controle, para cada tratamento de N, parte das mudas não foi inoculada com BPCP (Nin). Dessa forma, foram testados os efeitos das fontes de N, da inoculação e da interação entre estes dois fatores sobre as mudas. Das espécies analisadas, a única que apresentou sintomas de toxicidade ao cultivo com NH_4^+ foi *H. popayanensis*, espécie intolerante à sombra. Foi perceptível o benefício da inoculação com ambas as BPCP para a tolerância ao NH_4^+ , refletido na manutenção da fotossíntese e do crescimento de suas mudas. Uma das espécies tolerantes à sombra, *C. canjerana*, teve influência positiva na fotossíntese e no crescimento pela inoculação com as BPCP, independente da fonte de N. As demais espécies arbóreas, *C. pachystachya* e *C. estrellensis*, apresentaram crescimento similar com ambas as fontes de N e com as diferentes inoculações. Todavia, todas as espécies vegetais demonstraram algum grau de influência pelos fatores (fonte de N e inoculação), especialmente sobre as variáveis bioquímicas. Os resultados obtidos permitem afirmar que a inoculação com BPCP exerce influência sobre a fotossíntese, o crescimento e o metabolismo do N de mudas das espécies arbóreas estudadas. Além disso, os efeitos das BPCP variam com a fonte de N em que as mudas são cultivadas. Os efeitos da fonte de N e da inoculação tiveram pouca relação com os grupos ecológicos. Neste estudo foi observado que a inoculação com BPCP tem potencial para estimular o crescimento de mudas de espécies arbóreas do bioma Atlântico, inclusive em situações não ótimas de crescimento, como no cultivo em ambientes onde a razão $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ é alta.

Palavras chave: *Azospirillum brasilense*, *Bacillus velezensis*, nitrogênio, sucessão ecológica, trocas gasosas.

Abstract

Plants uptake nitrogen (N) from the soil mainly in the inorganic forms of ammonium (NH_4^+) and nitrate (NO_3^-), but many species develop toxicity symptoms when grown with NH_4^+ as the N source, as is the case of shade-intolerant trees. The N-metabolism of plants is regulated by the N-form available in the soil, which influences photosynthesis and plant growth. These processes can be influenced by the association with plant growth-promoting bacteria (PGPB), through various mechanisms. There are no studies that relate the effects of seedling cultivation with NO_3^- and NH_4^+ , and inoculated with PGPB, on the metabolism and growth of neotropical tree species. This study aimed to verify the effects of the inoculation with PGPB on photosynthesis, growth and N metabolism of seedlings of tree species of different ecological groups that occur in the semideciduous seasonal forest of the Atlantic biome, cultivated in sand with NO_3^- or NH_4^+ as the sole N source. Four tree species were chosen: two shade-intolerant – *Cecropia pachystachya* and *Heliocarpus popayanensis* – and two shade-tolerant – *Cariniana estrellensis* and *Cabralea canjerana*. The strains Ab-V5, of *Azospirillum brasilense*, and ZK, of *Bacillus velezensis*, were selected as PGPB for inoculation. Seedlings were grown with NO_3^- or NH_4^+ as N source, and were also inoculated with Ab-V5 or ZK strains. As control, for each N treatment, part of the seedlings was not inoculated with PGPB (Nin). Hence, the effects of the N sources, inoculation and the interaction between these two factors on the seedlings were tested. Among the species, the only one that exhibited toxicity symptoms to the cultivation with NH_4^+ was *H. popayanensis*, a shade-intolerant species. The benefit of inoculation with both PGPB for the tolerance to NH_4^+ was noteworthy, reflected in the maintenance of photosynthesis and growth of its seedlings. One of the shade tolerant species, *C. canjerana*, exhibited a positive influence on photosynthesis and growth by the inoculation with PGPB, regardless the N source. The other tree species, *C. pachystachya* and *C. estrellensis*, showed similar growth with both N sources and with the different inoculations. However, all plant species showed some degree of influence by the factors (source of N and inoculation), especially on the biochemical variables. The results confirm that the inoculation with PGPB influences photosynthesis, growth and N metabolism of seedlings of the tree species analysed. In addition, the effects of PGPB vary with the N source in which the seedlings are grown. The effects of N source and inoculation had low relation with the ecological groups. This study showed that the inoculation with PGPB has the potential to stimulate the growth of tree species from the Atlantic biome, even under non-optimal growth conditions, such as in cultivation where the $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ ratio is high.

Keywords: *Azospirillum brasilense*, *Bacillus velezensis*, ecological succession, gas-exchange, nitrogen.

1. Introdução

O nitrogênio (N) é o nutriente que mais limita a produtividade de vários ecossistemas, devido à sua baixa disponibilidade nos solos (Vitousek et al., 1989) e por ser o nutriente absorvido pela raiz necessário em maiores quantidades nos tecidos vegetais, onde compõe moléculas essenciais diversas (Kusano et al., 2011). Por isso, o teor de N de uma planta influencia uma série de processos na planta, como a fotossíntese, o crescimento e o metabolismo vegetal (Guo et al., 2007).

As plantas absorvem o N do solo principalmente nas formas inorgânicas de amônio (NH_4^+) e de nitrato (NO_3^-) (Britto et al., 2001). Apesar de a assimilação do NH_4^+ requerer menos energia do que a do NO_3^- (Guo et al., 2007), poucas espécies se desenvolvem adequadamente quando o NH_4^+ é a única, ou a predominante, fonte de N (Gerendás et al., 1997; Kronzucker et al., 1997; Britto e Kronzucker, 2002; Kronzucker et al., 2003; Mantelin e Touraine, 2004; Schimann et al., 2008; Oliveira et al., 2017a; Debiasi et al., 2019). Como a quantidade e a forma de N disponível às plantas favorecem o crescimento de algumas espécies, em detrimento de outras, este nutriente tem sido reconhecido como um importante fator ecológico que determina a distribuição de espécies vegetais (Aidar et al., 2003; Siddique et al., 2010; Britto e Kronzucker, 2013; Dias et al., 2014; Mao et al., 2018).

Em estudo feito no bioma Atlântico, foi proposto que espécies arbóreas intolerantes à sombra apresentam alta capacidade de assimilação de NO_3^- na parte aérea, indicada pela translocação de altas concentrações deste ânion na seiva do xilema e alta atividade da enzima nitrato redutase (ANR) nas folhas (Aidar et al., 2003). Por outro lado, espécies tolerantes à sombra possuem capacidade de assimilação de NO_3^- nas folhas muito menor do que as intolerantes à sombra e, provavelmente, assimilam o N, absorvido majoritariamente na forma de NH_4^+ , na raiz (Aidar et al., 2003). Em mudas de espécies arbóreas verificou-se que algumas espécies de início de sucessão crescem a uma taxa elevada quando supridas com NO_3^- , mas podem apresentar efeitos severos de toxicidade quando tratadas com NH_4^+ como fonte exclusiva de N, o que restringe muito seu crescimento (Kronzucker et al., 2003; Oliveira et al., 2017a; Debiasi et al., 2019). Espécies tolerantes à sombra são capazes de se desenvolver sob suprimento com ambas as fontes de N, mas são mais tolerantes ao NH_4^+ , que é assimilado rapidamente em aminoácidos na raiz (Oliveira et al., 2017a). O metabolismo do N de plantas arbóreas é, portanto, regulado pela forma de N disponível no solo, mas essa regulação depende das restrições adaptativas de cada espécie (Schmidt e Stewart 1998; Schmidt et al., 1998; Kronzucker et al., 2003; Schimann et al., 2008; Oliveira et al., 2017a).

O metabolismo e o crescimento das plantas também podem ser influenciados pela inoculação com bactérias promotoras do crescimento em plantas (BPCP). Elas correspondem a um grupo de microrganismos com capacidade de colonizar a rizosfera e tecidos internos da planta (Ortíz-Castro et al., 2009) e são utilizadas para melhorar o rendimento das culturas agrícolas (Herridge et al., 2008). A microbiota da rizosfera é relativamente diferente daquela em seu entorno, devido à presença de exsudatos da raiz, formados por parte do carbono fixado fotossinteticamente e disponibilizados nas formas de carboidratos, aminoácidos, ácidos orgânicos e outros compostos, que atraem as bactérias (Bais et al., 2006). A quantidade e qualidade de exsudatos liberados pela raiz variam com o grupo ecológico e com a disponibilidade de nutrientes no solo, e isso pode influenciar na colonização pelas BPCP (Grayston et al., 1996; Carvalhais et al., 2011; Probanza et al., 2002).

Os principais mecanismos pelos quais as BPCP contribuem para o crescimento das plantas são através da fixação de N, do aumento da disponibilidade e absorção de nutrientes, da síntese de reguladores de crescimento vegetal e enzimas e da inibição da ação de patógenos no solo (Glick et al., 2007; Berg, 2009; Hayat et al., 2010; Beneduzi et al., 2012; Vejan et al., 2016). A promoção do crescimento é geralmente resultado da combinação de mais de um dos mecanismos supracitados que se acumulam e geram um efeito final de ampla escala na planta, mas o resultado pode variar em cada caso específico de inoculação (Bashan e de-Bashan, 2010). Apesar da gama de mecanismos pelos quais as bactérias estimulam o crescimento vegetal, Mantelin e Touraine (2004) ressaltaram que o principal deles é a produção de ácido indol-3-acético, uma auxina que induz o crescimento da raiz (estimula o desenvolvimento de raízes laterais e pelos radiciais) e, conseqüentemente, aprimora a absorção de nutrientes do solo. Já o benefício resultante da fixação de N é controverso, pois o N fixado pelos microrganismos pode ou não contribuir em grande escala para o aumento do teor de N da planta (Bashan et al., 1989; Mantelin e Touraine, 2004; Bashan e de-Bashan, 2010).

As estirpes Ab-V5, de *Azospirillum brasilense*, e ZK, de *Bacillus velezensis*, são capazes de produzir auxina (Goes et al., 2012; Fukami et al., 2018a). Além disso, o gênero *Azospirillum* é constituído por microrganismos de vida livre capazes de fixar N (Vejan et al., 2016). Mesmo na ausência de efeitos da fixação de N, há relatos de efeitos benéficos causados em plantas por ambas as estirpes (Bashan et al., 1989; Hungria et al., 2010; Fukami et al., 2018b; Calzavara et al., 2018), inclusive em espécies arbóreas de floresta estacional semidecidual (Tiepo et al., 2018). A aplicação de *A. brasilense* mostrou-se eficiente em experimentos de longa duração com espécies arbóreas e cactos em

programas de reflorestamento de uma área desértica (Bashan et al., 2009a, b, 2012). Estirpes de *B. velezensis* também têm sido descritas como benéficas ao crescimento das plantas, principalmente por inibir o crescimento de patógenos e por sintetizar metabólitos secundários, como lipopeptídeos e policetídeos (Rabbee et al. 2019).

Não há estudos que relacionam os efeitos do cultivo de mudas com NO_3^- e NH_4^+ com os da inoculação com BPCP sobre o metabolismo e crescimento de plantas. De acordo com estudos anteriores (Schmidt e Stewart, 1998; Schmidt et al., 1998; Aidar et al., 2003; Kronzucker et al., 2003; Schimann et al., 2008; Oliveira et al., 2017a; Debiasi et al., 2019), pressupõe-se que mudas de espécies arbóreas de diferentes grupos ecológicos (intolerantes e tolerantes à sombra) apresentem respostas distintas ao cultivo com NO_3^- ou NH_4^+ . Diante disso, objetivou-se verificar os efeitos da inoculação com BPCP sobre a fotossíntese, o crescimento e o metabolismo do N de mudas de espécies arbóreas do bioma Atlântico, cultivadas com NO_3^- ou NH_4^+ como fonte exclusiva de N, para obter respostas a três questões: 1- A inoculação com BPCP influencia a fotossíntese, o crescimento e o metabolismo do N destas mudas?; 2- Os efeitos das BPCP sobre as mudas variam de acordo com a fonte de N inorgânico com que estas plantas são cultivadas? e 3- A inoculação com BPCP aumenta a tolerância das plantas ao amônio?

2. Material e métodos

2.1. Material biológico

Foram escolhidas quatro espécies arbóreas utilizadas em programas de reflorestamento desenvolvidos pelo viveiro de mudas do Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas, da Universidade Estadual de Londrina (UEL), que forneceu as sementes. Das espécies escolhidas, duas são intolerantes à sombra – *Cecropia pachystachya* Trécul (Urticaceae) e *Heliocarpus popayanensis* Kunth (Malvaceae) – e duas são tolerantes à sombra – *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze (Lecythidaceae) e *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae).

Duas estirpes de bactérias, fornecidas pelo Núcleo de Pesquisa para o Desenvolvimento e Aplicação de Biofertilizantes da UEL, que apresentam alto potencial como promotoras do crescimento vegetal, foram escolhidas para este estudo. *Azospirillum brasilense* (estirpe Ab-V5) foi isolada da rizosfera de plantas de milho e está registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil para uso em inoculantes comerciais (Hungria et al., 2010). A estirpe é diazotrófica, produz auxina, tem capacidade de solubilização de amido e proteína, além de ter alta atividade antagonista a fungos patogênicos. *Bacillus velezensis* (estirpe ZK) não apresenta registro de uso em inoculantes

comerciais. A estirpe, isolada da rizosfera de plantas de girassol e caracterizada como BPCP por Goes et al. (2012) não é diazotrófica, mas tem capacidade de produzir auxina e sideróforos.

Os inoculantes foram preparados de acordo com Oliveira et al. (2017b). Para a preparação do pré-inóculo, as espécies de BPCP foram inicialmente cultivadas em 5 mL de meio *Dygs*, em tubos mantidos sob agitação orbital (180 rpm, a 28 ± 2 °C), por 24 h. Posteriormente, 1 mL do pré-inóculo foi adicionado a 50 mL de meio de cultura *Form15*, em frascos que foram mantidos sob agitação orbital (180 rpm, a 28 ± 2 °C) por 48 h. Após este período de crescimento, a densidade das culturas foi normalizada para 1×10^9 células mL⁻¹, pela diluição em meio de cultura *Form15* esterilizado. Uma última diluição foi feita em água destilada para reduzir a densidade das bactérias para 1×10^6 células mL⁻¹. Essa diluição, que resultou no inoculante final, foi feita imediatamente antes da adição das BPCP ao substrato de cultivo das plantas.

2.2. Tratamentos

As sementes foram colocadas para germinar em bandejas (7,5 L de volume) com areia esterilizada, que foi umedecida com 2,5 L do inoculante final (Ab-V5 ou ZK), ou com água (não inoculadas [Nin]). Após a germinação e a completa expansão do primeiro eofilo, as mudas foram transferidas para vasos plásticos (400 mL de volume; 10,5 cm de altura; 9,5 cm e 14 cm de diâmetros inferior e superior, respectivamente) preenchidos com areia esterilizada. Em seguida, adicionaram-se 100 mL do inoculante final (Ab-V5 ou ZK), ou água (controle), ao substrato, em cada vaso.

Após uma semana de aclimação das mudas aos vasos, iniciou-se o tratamento com fontes distintas de N (NO_3^- e NH_4^+). Duas vezes por semana, adicionaram-se em cada vaso 90 mL de solução nutritiva composta por KH_2PO_4 1 mM, K_2SO_4 2 mM, MgSO_4 2 mM, CaCl_2 2 mM, $\text{FeSO}_4\text{-EDTA}$ 100 μM , H_3BO_3 92,5 μM , MnCl_2 18 μM , ZnCl_2 1,5 μM , Na_2MoO_4 0,6 μM , CuCl_2 0,7 μM . Além dos nutrientes não nitrogenados, a solução nutritiva foi composta de KNO_3 4 mM ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 mM como fonte de N ([N] total = 4 mM). O pH de ambas as soluções foi ajustado para 5,5. As soluções nutritivas com as diferentes fontes de N foram suplementadas com N-alitiourea 100 μM para prevenir a nitrificação (Ginestet et al., 1998). Uma vez por semana, as mudas foram irrigadas com água destilada, para evitar a dessecação.

Foram distinguidos seis tratamentos: i) cultivo com NO_3^- , sem inoculação (NO_3^-/Nin); ii) cultivo com NO_3^- e inoculação com Ab-V5 ($\text{NO}_3^-/\text{Ab-V5}$); iii) cultivo com NO_3^- e inoculação com ZK (NO_3^-/ZK); iv) cultivo com NH_4^+ , sem inoculação (NH_4^+/Nin); v) cultivo com NH_4^+ e

inoculação com Ab-V5 (NH_4^+ /Ab-V5); e vi) cultivo com NH_4^+ e inoculação com ZK (NH_4^+ /ZK). As plantas foram mantidas em casa de vegetação, sob condições naturais de umidade e temperatura, e sob 45 % da intensidade luminosa total. A intensidade luminosa máxima em dias ensolarados foi de cerca de $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Após 60 dias do início dos tratamentos de N foram feitas as análises não destrutivas e a coleta do material vegetal.

2.3. Análises fotossintéticas

Analisou-se a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) em folhas intactas por meio de um fluorômetro *OS1p* (*Opti-Sciences*, Hudson, EUA), conforme descrito por Shimizu et al. (2006). As análises de F_v/F_m foram realizadas antes do amanhecer (06:00-07:00 h), após 10 minutos de aclimação ao escuro, condição obtida com o uso de cliques foliares.

Análises de trocas gasosas foram realizadas ao término do experimento, entre 8 e 10 h, utilizando-se um analisador portátil de gás por infravermelho (Irga), modelo *LICOR 6400 XT* (*LiCor*, Lincoln, EUA), conectado a uma câmara de 6 cm^2 com fonte de luz artificial. Sob intensidade luminosa saturante ($1900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), foram medidas a assimilação líquida de CO_2 (A_{max}) e a condutância estomática (g_s).

2.4. Análises de crescimento

Para avaliar o crescimento das mudas, foram medidas as massas secas da raiz, da parte aérea e total (raiz + parte aérea) ao término do experimento. Para isso, as partes vegetativas foram secas a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 72 h e, depois, pesadas.

2.5. Análises bioquímicas (metabolismo do N)

Porções finas das ramificações da raiz primária e as últimas folhas desenvolvidas, completamente expandidas, foram coletadas para análises de atividades enzimáticas e de metabólitos. Todas as análises bioquímicas utilizaram métodos espectrofotométricos. As leituras das absorbâncias foram feitas em leitor de microplacas *SpectraMax Plus 384* (*Molecular Devices*, Sunnyvale, EUA).

A atividade da enzima nitrato redutase (ANR) na raiz e folhas foi determinada *in vivo*, imediatamente após a coleta de material vegetal fresco, com base no método de extração proposto por Stewart et al. (1986). Amostras de raízes e folhas foram transferidas para o meio de reação (K_2HPO_4 0,05 M, pH 7,5; propanol 1 % e KNO_3 0,05 M), submetidas à baixa pressão para infiltração do meio nos tecidos e, subsequentemente, mantidas no escuro por 40 minutos à temperatura ambiente. Uma alíquota foi coletada para dosagem de nitrito

(NO₂⁻), resultante da ANR, pela reação com o reagente de Griess e leitura da absorbância a 540 nm (Hageman e Reed, 1980).

As porções de raízes e folhas foram coletadas em N₂ líquido e armazenadas a -80 °C. Para extração dos metabólitos, as amostras foram maceradas em N₂ líquido até atingirem consistência de pó. Compostos de baixo peso molecular (NO₃⁻, NH₄⁺ e aminoácidos livres) foram extraídos com MCW (metanol/clorofórmio/água, 12/5/3, v/v/v), de acordo com Oliveira e Sodek (2013). Proteínas foram extraídas com NaOH 0,1 M, a partir do precipitado resultante da extração com MCW (Oliveira e Sodek, 2013).

A seiva do xilema foi coletada do caule, com auxílio de câmara de pressão do tipo *Schölander SAPS2*, modelo 3115 (*Soil Moisture Equipment*, Santa Barbara, EUA). A seiva coletada foi armazenada a -20 °C e utilizada diretamente para dosagem de NO₃⁻, NH₄⁺ e aminoácidos livres.

Os metabólitos extraídos de raízes, folhas e seiva do xilema tiveram suas concentrações determinadas pelos seguintes métodos. A concentração de NO₃⁻ foi determinada após sua redução por VCl₃ (0,4 % em HCl 0,5 M) a 37° C por 30 minutos e subsequente dosagem do NO₂⁻ formado pela reação com o reagente de Griess, com leitura a 540 nm (Miranda et al., 2001). O teor de NH₄⁺ foi determinado pelo método fenol-hipoclorito (McCullough, 1967), com modificações. Para isso, a amostra foi misturada com o reagente 1 (fenol 1 % e nitroprussiato de sódio 0,2 mM) e, subsequentemente, com o reagente 2 (NaOH 125 mM, Na₂HPO₄ 150 mM e NaClO 0,12 %). Após reagir por 35 minutos a 37 °C, a absorbância foi lida a 625 nm. A concentração de aminoácidos livres foi quantificada pelo ensaio com ninhidrina (Yemm e Cocking, 1995). Para isso, a amostra, tampão citrato 0,2 mM (pH 5), ninhidrina (5 % em metilcelusolve) e KCN (10 mM em metilcelusolve) foram misturados e mantidos a 100 °C por 20 minutos. Depois, a mistura foi diluída em etanol 60 % e a absorbância foi lida a 570 nm. Para os metabólitos da seiva do xilema, foi calculada a concentração relativa de NO₃⁻, NH₄⁺ e aminoácidos: (concentração de NO₃⁻, NH₄⁺ ou aminoácidos × 100)/concentração total de NO₃⁻, NH₄⁺ e aminoácidos na amostra.

Por fim, o teor de proteínas foi determinado pela reação do extrato de proteínas de raízes e folhas com o reagente *Coomassie Brilliant Blue G-250* (*Bio-Rad Laboratories Inc.*, Hercules, EUA) e posterior leitura da absorbância a 595 nm (Bradford, 1976).

2.6. Análises estatísticas

Nos experimentos, para cada espécie, foi adotado o delineamento inteiramente casualizado. Cinco réplicas biológicas foram utilizadas para as análises de F_v/F_m e

bioquímicas, enquanto dez réplicas foram utilizadas para as análises de trocas gasosas (A_{\max} e g_s) e de crescimento. Para os dados bioquímicos obtidos da seiva do xilema, três réplicas foram utilizadas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) fatorial e, quando houve efeito da interação (fonte de N \times inoculação), as médias foram comparadas pelo teste de *Tukey HSD* ($P < 0,05$) dentro de cada nível dos fatores fonte de N (NO_3^- e NH_4^+) e inoculação (Nin, Ab-V5 e ZK). Em caso de interação não significativa, foram testados os efeitos, separadamente, da fonte de N (teste *F*) e da inoculação (*Tukey HSD*, $P < 0,05$). As análises estatísticas foram feitas no programa *Statistica*, versão 12.0 (*StatSoft*, Tulsa, EUA).

3. Resultados

3.1. Análises fotossintéticas

Apenas duas espécies arbóreas tiveram a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) influenciada pelos tratamentos. Em *C. estrellensis* esta variável foi afetada negativamente pelo cultivo com NH_4^+ , em relação ao NO_3^- (Fig. 1 A). Em *C. canjerana*, o efeito foi o contrário, ou seja, a F_v/F_m aumentou nas plantas cultivadas com NH_4^+ , em comparação com mudas cultivadas com NO_3^- (Fig. 1 B). Nesta espécie, a inoculação com ZK teve efeito positivo sobre a F_v/F_m , em comparação com mudas Nin.

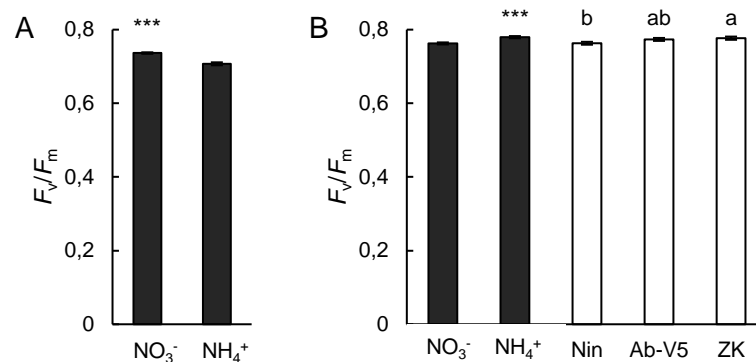


Fig. 1. Eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) de mudas de *Cariniana estrellensis* (A) e *Cabralea canjerana* (B) cultivadas com NO_3^- ou NH_4^+ , não inoculadas com bactérias (Nin), ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. As barras são médias \pm erros-padrão. Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos de N, de acordo com a ANOVA (teste *F*; *** $P < 0,001$; $n = 15$). Médias com letras iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação (*Tukey HSD*; $P < 0,05$; $n = 10$).

Em *C. pachystachya* a A_{\max} e g_s foram influenciadas pela fonte de N, com aumento no tratamento com NH_4^+ , em relação ao NO_3^- (Fig. 2 A e B). Mudas inoculadas com Ab-V5 apresentaram maiores A_{\max} e g_s do que as inoculadas com ZK. Em *H. popayanensis* houve interação nos efeitos dos fatores (fonte de N \times inoculação) sobre a A_{\max} , e g_s (Fig. 2 C e D).

Nas plantas tratadas com NH_4^+ , as não inoculadas apresentaram diminuição nestas variáveis, em relação às plantas inoculadas com BPCP. As mudas de *C. estrellensis* foram influenciadas apenas pela fonte de N (Fig. 2 E e F), havendo redução da A_{max} e g_s em mudas cultivadas com NH_4^+ , em comparação com as tratadas com NO_3^- . Em *C. canjerana*, a A_{max} e g_s foram maiores em plantas inoculadas com ZK, em relação a plantas Nin, e a g_s das mudas inoculadas com ZK foi maior do que a de mudas Nin ou Ab-V5 (Fig. 2 G e H).

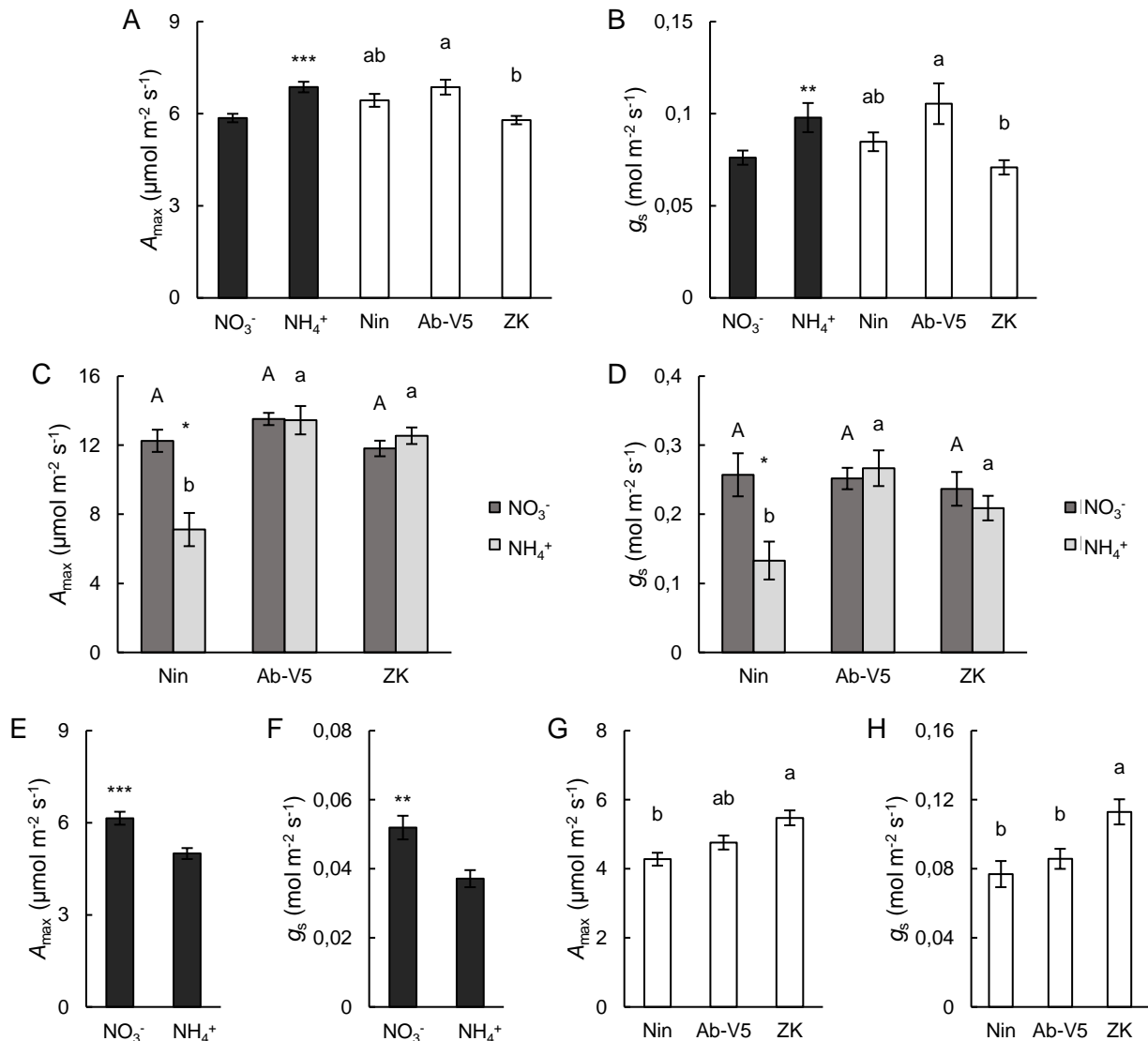


Fig. 2. Assimilação líquida de CO_2 (A_{max}) e condutância estomática (g_s) de mudas de *Cecropia pachystachya* (A e B), *Heliocarpus popayanensis* (C e D), *Cariniana estrellensis* (E e F) e *Cabralea canjerana* (G e H) cultivadas com NO_3^- ou NH_4^+ , não inoculadas com bactérias (Nin), ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. As barras são médias \pm erros-padrão. Nas colunas pretas, asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos de N, de acordo com a ANOVA (teste F; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; $n = 30$). Nas colunas brancas, médias com letras iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação (Tukey HSD; $P < 0,05$; $n = 20$). Nas colunas cinzentas, médias com letras maiúsculas (NO_3^-) ou minúsculas (NH_4^+) iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação, e asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos de N dentro de cada tratamento de inoculação (Tukey HSD; $P < 0,05$; $n = 10$).

3.2. Análises de crescimento

Cecropia pachystachya e *C. estrellensis* não tiveram as variáveis de crescimento influenciadas pelos tratamentos. Houve interação entre os efeitos da fonte de N e da inoculação sobre a massa seca da raiz e total em *H. popayanensis*. Em comparações dentro de cada tratamento de inoculação, verificou-se que o NH_4^+ provocou diminuição da massa seca da raiz nas mudas não inoculadas e na diminuição da massa seca total em qualquer inoculação (Nin, Ab-V5 e ZK), em relação às mudas cultivadas com NO_3^- (Fig. 3 A e C). Além disso, a inoculação levou a um aumento da massa seca da raiz e total de plantas cultivadas com NH_4^+ , de forma que a massa seca da raiz foi similar às das plantas cultivadas com NO_3^- . O cultivo de mudas com NH_4^+ resultou na diminuição da massa seca da parte aérea em *H. popayanensis*, em relação ao cultivo com NO_3^- , enquanto a inoculação com ZK promoveu aumento nessa variável, independente da fonte de N (Fig. 3 B). Em mudas de *C. canjerana*, o inóculo ZK provocou aumento da massa seca da raiz, parte aérea e total, em comparação com plantas Nin (Fig. 3 D, E e F). A inoculação com Ab-V5 também teve efeito positivo sobre as mudas de *C. canjerana*, e promoveu aumento da massa seca da parte aérea e total, em relação a mudas Nin (Fig. 3 E e F).

3.3. Análises bioquímicas

Em *C. pachystachya*, o cultivo com NH_4^+ levou às diminuições da concentração relativa de NO_3^- na seiva do xilema e da concentração de aminoácidos na raiz, e da ANR na raiz e folhas, além de aumentar o teor de NH_4^+ na raiz e de proteínas nas folhas, em relação ao cultivo com NO_3^- (Tabela 1). A inoculação teve efeito sobre a concentração de aminoácidos na raiz, sendo que mudas inoculadas com Ab-V5 apresentaram diminuição desta variável, em relação a mudas Nin (Tabela 2). Houve interação dos efeitos da fonte de N e da inoculação em três variáveis (Tabela 3). Nas folhas, as concentrações de NH_4^+ e aminoácidos aumentaram em plantas tratadas com NH_4^+ e inoculadas com ZK, em relação aos demais tratamentos. A porcentagem de aminoácidos na seiva foi maior em plantas cultivadas com NH_4^+ e inoculadas com Ab-V5, em comparação com os demais tratamentos.

Em *H. popayanensis*, plantas supridas com NH_4^+ apresentaram menores concentrações de NO_3^- na seiva do xilema e folhas e de proteínas nas folhas e menor ANR nas folhas, porém, maiores concentrações de aminoácidos na raiz, seiva do xilema e folhas, em relação a mudas cultivadas com NO_3^- (Tabela 1). A inoculação com Ab-V5 provocou aumento da porcentagem de NO_3^- na seiva, em relação às mudas Nin (Tabela 2). Nesta espécie, houve interação dos efeitos da fonte de N e da inoculação sobre a concentração de NO_3^- na raiz e de NH_4^+ na raiz e folhas (Tabela 3). Dentro de cada inoculação (Nin, Ab-

V5 e ZK), verificou-se aumento da concentração de NO_3^- na raiz das plantas cultivadas com NO_3^- , em relação às cultivadas com NH_4^+ . Entre as plantas tratadas com NO_3^- , as inoculadas com Ab-V5 apresentaram aumento da concentração de NO_3^- na raiz, em comparação com plantas Nin ou inoculadas com ZK. A concentração de NH_4^+ na raiz foi maior em mudas Nin tratadas com NH_4^+ , em relação às mudas inoculadas com BPCP. Nas folhas, entre as mudas tratadas com NH_4^+ , a concentração deste cátion foi maior em plantas inoculadas, comparadas às não inoculadas.

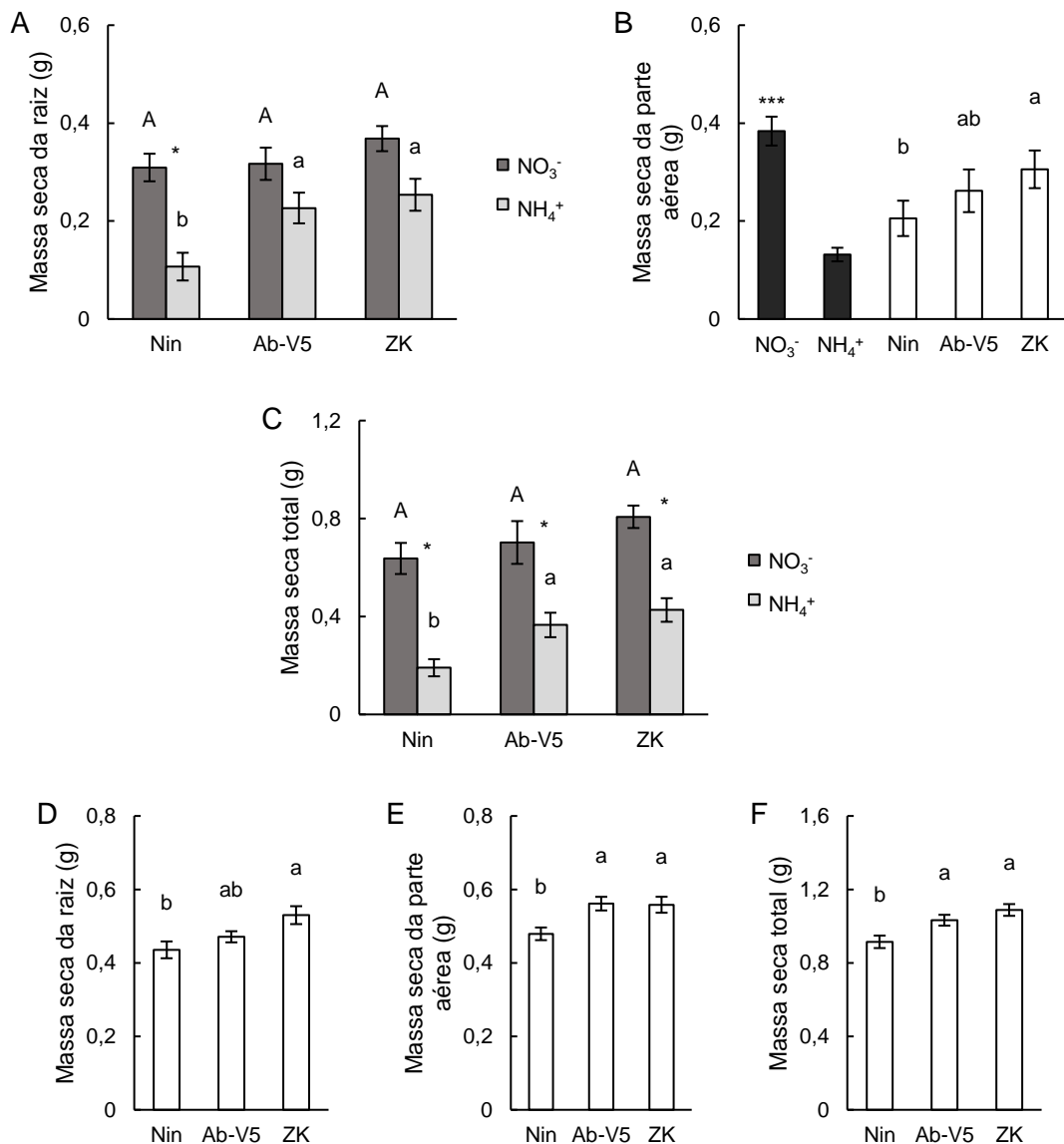


Fig. 3. Massa seca da raiz, da parte aérea e total de mudas de *Heliocarpus popayanensis* (A-C) e *Cabralea canjerana* (D-F) cultivadas com NO_3^- ou NH_4^+ , não inoculadas com bactérias (Nin), ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. As barras são médias \pm erros-padrão. Nas colunas pretas, asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos de N, de acordo com a ANOVA (teste F; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; $n = 30$). Nas colunas brancas, médias com letras iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação (Tukey HSD; $P < 0,05$; $n = 20$). Nas colunas cinzentas, médias com letras maiúsculas (NO_3^-) ou minúsculas (NH_4^+) iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação, e asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos de N dentro de cada tratamento de inoculação (Tukey HSD; $P < 0,05$; $n = 10$).

Tabela 1. Variáveis bioquímicas de mudas de *Cecropia pachystachya*, *Heliocarpus popayanensis*, *Cariniana estrellensis* e *Cabralea canjerana* cultivadas com NO_3^- ou NH_4^+ . Os valores são médias \pm erros-padrão. Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos de N, de acordo com a ANOVA (teste F; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; $n = 15$ [metabólitos da seiva do xilema: $n = 9$]). ANR – atividade da nitrato redutase.

Variável	Fonte de N	
	NO_3^-	NH_4^+
<i>Cecropia pachystachya</i>		
[NO_3^-] seiva (mol %)	41,1 \pm 2,63 *	26,9 \pm 6,14
[NH_4^+] raiz (nmol g ⁻¹)	209 \pm 6,12	242 \pm 8,70 **
[aminoácidos] raiz ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	1,27 \pm 0,119 **	0,886 \pm 0,051
[proteínas] folhas (mg g ⁻¹)	2,05 \pm 0,199	2,79 \pm 0,229 *
ANR raiz (nmol min ⁻¹ g ⁻¹)	8,24 \pm 1,12 ***	1,67 \pm 0,041
ANR folhas (nmol min ⁻¹ g ⁻¹)	10,2 \pm 0,606 *	7,83 \pm 0,712
<i>Heliocarpus popayanensis</i>		
[NO_3^-] seiva (mol %)	7,78 \pm 1,99 **	1,81 \pm 0,424
[NO_3^-] folhas (nmol g ⁻¹)	138 \pm 20,7 ***	68,9 \pm 14,7
[aminoácidos] raiz ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	0,714 \pm 0,051	1,07 \pm 0,088 **
[aminoácidos] seiva (mol %)	75,8 \pm 1,93	86,4 \pm 1,16 ***
[aminoácidos] folhas ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	2,37 \pm 0,175	5,83 \pm 0,501 ***
[proteínas] folhas (mg g ⁻¹)	2,97 \pm 0,193 ***	1,41 \pm 0,125
ANR folhas (nmol min ⁻¹ g ⁻¹)	28,0 \pm 2,72 ***	4,18 \pm 0,251
<i>Cariniana estrellensis</i>		
[NO_3^-] raiz (nmol g ⁻¹)	1082 \pm 123 ***	511 \pm 77,7
[NO_3^-] folhas (nmol g ⁻¹)	101 \pm 14,1 ***	23,4 \pm 3,55
[aminoácidos] folhas ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	3,01 \pm 0,167	4,20 \pm 0,339 **
ANR raiz (nmol min ⁻¹ g ⁻¹)	1,50 \pm 0,223 ***	0,624 \pm 0,048
<i>Cabralea canjerana</i>		
[NO_3^-] raiz ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	36,0 \pm 4,17 ***	0,438 \pm 0,054
[NO_3^-] seiva (mol %)	31,6 \pm 4,91 ***	4,30 \pm 1,08
[NO_3^-] folhas ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	1,04 \pm 0,157 ***	0,111 \pm 0,020
[aminoácidos] seiva (mol %)	61,6 \pm 4,54	83,7 \pm 3,24 ***
[aminoácidos] folhas ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	8,43 \pm 0,320	14,1 \pm 0,829 ***
[proteínas] raiz (mg g ⁻¹)	3,51 \pm 0,122	5,87 \pm 0,177 ***
[proteínas] folhas (mg g ⁻¹)	15,8 \pm 0,358	22,3 \pm 0,743 ***

O cultivo com NH_4^+ provocou diminuição da concentração de NO_3^- na raiz e folhas e da ANR na raiz de mudas de *C. estrellensis*, em relação ao cultivo com NO_3^- (Tabela 1). Por outro lado, o teor de aminoácidos nas folhas foi maior no tratamento com NH_4^+ , comparado ao NO_3^- . A inoculação com Ab-V5 provocou aumento da concentração de NO_3^- na raiz e concentração relativa de NO_3^- na seiva das mudas desta espécie, em comparação com mudas Nin (Tabela 2). A concentração de aminoácidos nas folhas foi influenciada negativamente pela inoculação com ZK, em relação a plantas Nin ou inoculadas com Ab-V5. Já a ANR foliar foi maior em plantas inoculadas com ZK, comparadas a plantas Nin.

Houve interação dos dois fatores (N e inoculação) sobre a concentração de NH_4^+ na raiz e folhas (Tabela 3). Comparando-se mudas tratadas com NH_4^+ , verificou-se que as inoculadas com ZK apresentaram maior concentração deste cátion na raiz, em relação às mudas Nin ou inoculadas com Ab-V5. Quanto à concentração de NH_4^+ foliar, dentre as plantas tratadas com NH_4^+ , as inoculadas com Ab-V5 apresentaram maior concentração deste cátion, em relação às plantas Nin ou inoculadas com ZK.

Tabela 2. Variáveis bioquímicas de mudas de *Cecropia pachystachya*, *Heliocarpus popayanensis* e *Cariniana estrellensis* não inoculadas com bactérias (Nin), ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. Os valores são médias \pm erros-padrão. Médias com letras iguais nas linhas não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação (*Tukey HSD*; $P < 0,05$; $n = 10$ [metabólitos da seiva do xilema: $n = 6$]). ANR – atividade da nitrato redutase.

Variável	Inoculação		
	Nin	Ab-V5	ZK
<i>Cecropia pachystachya</i>			
[aminoácidos] raiz ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	1,27 \pm 0,164 a	0,860 \pm 0,079 b	1,10 \pm 0,102 ab
<i>Heliocarpus popayanensis</i>			
[NO_3^-] seiva (mol %)	2,43 \pm 1,00 b	8,26 \pm 2,76 a	3,70 \pm 1,71 ab
<i>Cariniana estrellensis</i>			
[NO_3^-] raiz (nmol g^{-1})	612 \pm 141 b	1041 \pm 153 a	737 \pm 167 ab
[NO_3^-] seiva (mol %)	11,3 \pm 1,81 b	18,7 \pm 2,39 a	12,5 \pm 2,14 ab
[aminoácidos] folhas ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	3,84 \pm 0,251 a	4,25 \pm 0,441 a	2,73 \pm 0,232 b
ANR folhas ($\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	11,4 \pm 2,10 b	17,2 \pm 2,49 ab	22,7 \pm 3,10 a

Mudas de *C. canjerana* tratadas com NH_4^+ apresentaram menor concentração de NO_3^- na raiz, seiva e folhas e aumento da porcentagem de aminoácidos na seiva e das concentrações de aminoácidos nas folhas e de proteínas na raiz e folhas, em comparação com mudas tratadas com NO_3^- (Tabela 1). O fator inoculação não teve efeito isolado sobre nenhuma das variáveis bioquímicas avaliadas nesta espécie, mas interagiu com as fontes de N, provocando efeitos em algumas variáveis (Tabela 3). Em mudas inoculadas com Ab-V5, a concentração de NH_4^+ nas folhas foi maior nas tratadas com NH_4^+ do que nas cultivadas com NO_3^- . Entre as plantas cultivadas com NH_4^+ , a concentração desse cátion nas folhas foi maior nas inoculadas com Ab-V5, em comparação com plantas Nin ou ZK. Dentro de cada nível de inoculação (Nin, Ab-V5 ou ZK), a ANR na raiz e nas folhas de *C. canjerana* foi maior nas plantas cultivadas com NO_3^- , em comparação com plantas cultivadas com NH_4^+ . Entre as mudas tratadas com NO_3^- , a ANR na raiz foi maior nas mudas Nin, em relação às inoculadas com BPCP, enquanto a atividade desta enzima nas folhas foi maior nas plantas inoculadas com ZK, em comparação com as Nin.

Tabela 3. Variáveis bioquímicas de mudas de *Cecropia pachystachya*, *Heliocarpus popayanensis*, *Cariniana estrellensis* e *Cabralea canjerana* cultivadas com NO_3^- ou NH_4^+ , não inoculadas com bactérias (Nin), ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. Os valores são médias \pm erros-padrão. Para cada variável, médias com letras minúsculas iguais nas colunas não diferem significativamente entre os tratamentos de N; e médias com letras maiúsculas iguais nas linhas não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação (Tukey HSD; $P < 0,05$; $n = 5$ [metabólitos da seiva do xilema: $n = 3$]). ANR – atividade da nitrato redutase.

Variável	Fonte de N	Inoculação		
		Nin	Ab-V5	ZK
<i>Cecropia pachystachya</i>				
[NH_4^+] folhas (nmol g ⁻¹)	NO_3^-	243 \pm 11,1 Aa	274 \pm 28,4 Aa	255 \pm 37,8 Ab
	NH_4^+	266 \pm 17,6 Ba	280 \pm 12,0 Ba	418 \pm 19,8 Aa
[aminoácidos] seiva (mol %)	NO_3^-	51,8 \pm 5,92 Aa	50,0 \pm 2,68 Ab	47,4 \pm 3,76 Aa
	NH_4^+	46,1 \pm 8,05 Ba	76,3 \pm 0,638 Aa	54,1 \pm 7,85 Ba
[aminoácidos] folhas ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	NO_3^-	1,60 \pm 0,137 Aa	1,80 \pm 0,106 Aa	1,74 \pm 0,063 Ab
	NH_4^+	1,53 \pm 0,048 Ba	1,70 \pm 0,149 Ba	3,46 \pm 0,545 Aa
<i>Heliocarpus popayanensis</i>				
[NO_3^-] raiz (nmol g ⁻¹)	NO_3^-	15,6 \pm 2,98 Ba	35,4 \pm 8,42 Aa	13,8 \pm 3,69 Ba
	NH_4^+	3,81 \pm 0,424 Ab	2,08 \pm 0,153 Ab	1,91 \pm 0,199 Ab
[NH_4^+] raiz (nmol g ⁻¹)	NO_3^-	549 \pm 42,4 Ab	667 \pm 58,0 Aa	440 \pm 25,6 Aa
	NH_4^+	1232 \pm 106 Aa	671 \pm 45,2 Ba	277 \pm 30,3 Ba
[NH_4^+] folhas (nmol g ⁻¹)	NO_3^-	382 \pm 14,8 Aa	369 \pm 10,5 Aa	329 \pm 50,9 Aa
	NH_4^+	285 \pm 35,6 Ba	517 \pm 41,4 Aa	566 \pm 112 Aa
<i>Cariniana estrellensis</i>				
[NH_4^+] raiz (nmol g ⁻¹)	NO_3^-	235 \pm 33,0 Aa	145 \pm 10,4 Aa	226 \pm 38,2 Aa
	NH_4^+	148 \pm 18,2 Ba	141 \pm 3,85 Ba	315 \pm 15,3 Aa
[NH_4^+] folhas (nmol g ⁻¹)	NO_3^-	245 \pm 29,0 Aa	235 \pm 18,5 Aa	282 \pm 31,7 Aa
	NH_4^+	190 \pm 4,55 Ba	351 \pm 68,3 Aa	189 \pm 34,0 Ba
<i>Cabralea canjerana</i>				
[NH_4^+] folhas (nmol g ⁻¹)	NO_3^-	465 \pm 23,1 Aa	478 \pm 50,7 Ab	546 \pm 39,1 Aa
	NH_4^+	530 \pm 61,5 Ba	693 \pm 71,7 Aa	457 \pm 63,8 Ba
ANR raiz (nmol min ⁻¹ g ⁻¹)	NO_3^-	27,2 \pm 2,44 Aa	17,0 \pm 2,60 Ba	17,6 \pm 0,727 Ba
	NH_4^+	5,08 \pm 0,250 Ab	6,52 \pm 0,263 Ab	5,43 \pm 0,169 Ab
ANR folhas (nmol min ⁻¹ g ⁻¹)	NO_3^-	13,7 \pm 1,80 Ba	16,2 \pm 1,12 ABa	34,5 \pm 2,00 Aa
	NH_4^+	2,62 \pm 0,283 Ab	4,07 \pm 1,09 Ab	4,87 \pm 0,941 Ab

4. Discussão

Neste estudo são exibidos os efeitos causados pelo cultivo com diferentes fontes inorgânicas de N (NO_3^- e NH_4^+) e inoculação com BPCP (Nin, Ab-V5 e ZK) sobre mudas de quatro espécies arbóreas da floresta estacional semidecidual do bioma Atlântico, duas intolerantes (*C. pachystachya* e *H. popayanensis*) e duas tolerantes à sombra (*C. estrellensis* e *C. canjerana*).

Comparando-se os tratamentos de N, verificou-se que as mudas de *C. pachystachya* apresentaram a mesma biomassa com ambas as fontes de N, mas tiveram maiores A_{max} e

g_s no cultivo com NH_4^+ , diferentemente do que foi verificado nesta mesma espécie por Oliveira et al. (2017a), estudo em que a massa seca da raiz, A_{max} e g_s das mudas foram maiores no cultivo com NO_3^- . Uma possível explicação para a diferença observada na A_{max} entre os tratamentos de N é a competição por redutores, nos cloroplastos, entre os processos de assimilação de CO_2 e NO_3^- , já que ambos requerem ferredoxina na forma reduzida, que é gerada pelo transporte de elétrons nestas organelas (Bloom et al., 2010). Dessa forma, a redução do NO_2^- a NH_4^+ , catalisada pela enzima nitrito redutase, atua como um dreno de elétrons (obtidos da ferredoxina), que não opera quando o NH_4^+ diretamente absorvido pelas raízes é assimilado. Uma maior assimilação de NO_3^- foi, de fato, verificada nas mudas de *C. pachystachya* quando cultivadas com este ânion, indicada pelo transporte de maior quantidade de NO_3^- pela seiva do xilema e pela maior atividade da ANR na raiz e folhas, em comparação com plantas cultivadas com NH_4^+ .

Surpreendentemente, as mudas de *C. pachystachya* cultivadas com NH_4^+ não mostraram sinais de alta assimilação deste cátion, como um aumento do teor de aminoácidos na raiz, seiva ou folhas, que foi observado nas outras espécies. Pelo contrário, verificou-se maior teor de aminoácidos na raiz das mudas tratadas com NO_3^- , em relação ao NH_4^+ . Esta espécie tampouco apresentou acúmulo de NH_4^+ em seus tecidos quando cultivada com este cátion. Esses resultados, em conjunto com os dados de crescimento, comprovam a tolerância de *C. pachystachya* ao NH_4^+ , característica incomum entre as intolerantes à sombra, provavelmente decorrente da adaptação desta espécie a ambientes hipóxicos em que há acúmulo de NH_4^+ (Oliveira et al., 2017a). Poucos efeitos da inoculação (ou da interação fonte de N x inoculação) sobre a assimilação do N foram observados nesta espécie. Entre eles, verificou-se que, nas folhas de mudas tratadas com NH_4^+ , a inoculação com ZK provocou o aumento da concentração de NH_4^+ e, conseqüentemente, aumento da sua assimilação em aminoácidos.

Em *H. popayanensis*, outra espécie intolerante à sombra, verificaram-se efeitos negativos do NH_4^+ sobre seu crescimento, especialmente nas mudas Nin. Em cultivo hidropônico com NH_4^+ , mudas dessa espécie também apresentaram crescimento reduzido, em relação ao cultivo com NO_3^- (Debiasi et al., 2019). A fotossíntese também foi afetada negativamente nas plantas Nin tratadas com NH_4^+ , que apresentaram diminuição da A_{max} e g_s . A nutrição com NH_4^+ provocou clorose nas folhas, independentemente da inoculação. A diminuição da fotossíntese, o crescimento reduzido e a clorose nas folhas são sintomas de toxicidade verificados em algumas espécies sensíveis ao NH_4^+ quando cultivadas com este cátion como fonte de N (Britto e Kronzucker, 2002; Guo et al., 2007; Andrews et al., 2013; Chen et al., 2013, Oliveira et al. 2017a; Debiasi et al., 2019). Apesar dos sintomas de

toxicidade, a F_v/F_m não foi influenciada pelos tratamentos, isto é, o transporte de elétrons voltado à atividade fotoquímica da fotossíntese foi preservado. Portanto, a diminuição da A_{max} nas mudas não inoculadas cultivadas com NH_4^+ pode ser devida, em parte, ao aumento da fotorrespiração, que é importante na proteção a danos oxidativos em espécies sensíveis ao NH_4^+ (Zhu et al., 2000; Zhou et al., 2011). Em espécies intolerantes ao NH_4^+ , a nutrição com este cátion pode levar à produção de espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, a limitações da fotossíntese, como a diminuição da F_v/F_m , A_{max} e g_s , e do crescimento (Zhou et al., 2011).

A diminuição da taxa fotossintética sofrida pelas mudas Nin tratadas com NH_4^+ em *H. popayanensis* pode ser um agravante dos efeitos negativos deste cátion, pois ocasiona a diminuição da alocação de carboidratos na raiz, que são importantes para gerar energia e servir de esqueleto de carbono na assimilação do NH_4^+ (Roosta e Schjoerring, 2008; Cruz et al., 2011), anabolismo importante para manter baixos os níveis de NH_4^+ na raiz e seu transporte para as folhas (Sarasketa et al., 2016).

Apesar dos sintomas observados nas mudas de *H. popayanensis*, foi notado efeito preventivo à toxicidade ao NH_4^+ pela inoculação com as BPCP. As mudas cultivadas com NH_4^+ e inoculadas com BPCP apresentaram a mesma A_{max} , g_s e massa seca radicial que as mudas cultivadas com NO_3^- . Um dos efeitos da nutrição com NH_4^+ é a diminuição da síntese de auxinas, que provoca diminuição do crescimento da raiz e do desenvolvimento de raízes laterais (Yang et al., 2014; Esteban et al., 2016b). Como as estirpes Ab-V5 e ZK são capazes de sintetizar auxinas (Goes et al., 2012; Fukami et al., 2018a), é possível que a síntese deste hormônio pelas BPCP tenha mantido o crescimento da raiz nas mudas de *H. popayanensis* cultivadas com NH_4^+ . A aplicação exógena de auxinas se mostrou eficaz no restabelecimento parcial do crescimento da raiz de plântulas de *Arabidopsis* cultivadas com NH_4^+ (Yang et al., 2014).

Entre as mudas de *H. popayanensis* cultivadas com NH_4^+ , ressalta-se o grande acúmulo deste cátion na raiz das plantas Nin, o que pode ter relação com a inibição pronunciada do crescimento que estas mudas sofreram, em comparação com as que foram inoculadas com as BPCP, que não acumularam NH_4^+ na raiz. Britto et al. (2001) propuseram que espécies sensíveis ao NH_4^+ são incapazes de regular os sistemas de influxo de NH_4^+ pela membrana, permitindo a entrada de altas concentrações deste cátion. Isso faz com que as plantas suscetíveis ao NH_4^+ despendam muita energia para promover a saída de NH_4^+ das células da raiz, o que desarranja a função celular e desencadeia outros eventos associados à toxicidade deste íon, como a depleção de carboidratos e o desequilíbrio de cátions (Britto et al., 2001). O acúmulo de NH_4^+ na raiz inibe a absorção de cátions (K^+ ,

Mg²⁺ e Ca²⁺) e causa acidificação da rizosfera, alterando a disponibilidade dos íons para as plantas (Britto e Kronzucker, 2002; Esteban et al. 2016a).

Um efeito da inoculação em *H. popayanensis*, que também foi observado em *C. estrellensis*, foi o aumento da concentração de NO₃⁻ na raiz (em *H. popayanensis*, apenas nas tratadas com NO₃⁻) e seiva do xilema, induzido pela inoculação com Ab-V5. Essa resposta pode ser indicativa do aumento da absorção de NO₃⁻ do substrato, estimulado pela estirpe Ab-V5. Como foi aplicado um inibidor de nitrificação no solo, é pouco provável que o aumento da concentração de NO₃⁻ na raiz e na seiva do xilema das duas espécies vegetais seja decorrente da atividade diazotrófica que a estirpe Ab-V5 possui, uma vez que o inibidor de nitrificação impediria uma possível conversão do N que havia sido fixado pelas bactérias em NO₃⁻ no substrato. Além disso, apesar do gênero *Azospirillum* ser conhecido por fixar N, frequentemente, apenas uma fração do N fixado pela bactéria é transferida para a planta, ou até mesmo é nula (Bashan et al., 1989). Porém, as BPCP podem aumentar a absorção de NO₃⁻ pela planta indiretamente pelo estímulo ao desenvolvimento de raízes laterais (pela síntese de auxinas) e diretamente pelo estímulo dos sistemas envolvidos na absorção dos íons (Mantelin e Touraine, 2004; Spaepen et al., 2007). Outra hipótese para o aumento observado da concentração de NO₃⁻ na raiz e seiva do xilema de *H. popayanensis* e *C. estrellensis* é a partir da síntese de óxido nítrico (NO) pela estirpe Ab-V5. Sob condições aeróbias, *A. brasilense* pode sintetizar NO (Creus et al., 2005; Molina-Favero et al., 2008), que é convertida a NO₃⁻ por uma hemoglobina não simbiótica vegetal (Gupta et al., 2011; Wang e Hargrove, 2013).

Apesar do benefício da estirpe Ab-V5 no aumento da concentração de NO₃⁻ na raiz e seiva, e de outras alterações no metabolismo do N, mudas de *C. estrellensis* não apresentaram alteração do crescimento. As mudas apresentaram A_{max} e g_s mais baixas no cultivo com NH₄⁺, em comparação com NO₃⁻, o que é incomum entre espécies tolerantes à sombra (Oliveira et al., 2017a). As alterações no metabolismo do N nesta espécie sugerem sua plasticidade na assimilação das duas fontes de N. Quando supridas com NO₃⁻, houve absorção e transporte deste ânion à parte aérea, porém, sua assimilação aumentou apenas na raiz, conforme verificado pela ANR neste órgão. Quando supridas com NH₄⁺, houve aumento da assimilação em aminoácidos nas folhas. Essa plasticidade também foi verificada em cultivo hidropônico de mudas de *C. estrellensis* com NO₃⁻ e NH₄⁺ (Debiasi et al., 2019). A ANR foliar não foi induzida pela maior presença de NO₃⁻ em plantas tratadas com NO₃⁻, mas houve estímulo da inoculação com ZK sobre a atividade desta enzima, em comparação com plantas Nin. A estirpe ZK também provocou diminuição da concentração

de aminoácidos nas folhas, independentemente da fonte de N. Esses resultados são indícios de um maior uso de NO_3^- , em relação ao NH_4^+ , por plantas inoculadas com ZK.

Nas mudas de *C. canjerana*, os parâmetros de trocas gasosas (A_{max} e g_s) e de crescimento não foram influenciados pelas diferentes fontes de N. Das espécies estudadas, *C. canjerana* foi a mais tolerante ao NH_4^+ e, inclusive, apresentou maior F_v/F_m quando cultivada com NH_4^+ , em relação ao NO_3^- , resultados similares aos observados por Zhou et al. (2011) em mudas de arroz, que são tolerantes ao NH_4^+ . *Cabralea canjerana*, além de apresentar maior eficiência fotoquímica do FSII, foi a única espécie capaz de incorporar a maior quantidade de aminoácidos livres, provenientes da rápida assimilação do NH_4^+ , em proteínas, resultando no aumento do teor proteico tanto na raiz, quanto nas folhas das plantas cultivadas com NH_4^+ , resposta importante à elevada suplementação de NH_4^+ (Singh e Srivastava, 1986). É necessário balancear a absorção de NH_4^+ com seu consumo, por exemplo, na assimilação em moléculas orgânicas, para evitar a toxicidade deste cátion (Bittsánszky et al., 2015).

A inoculação com BPCP também alterou alguns parâmetros das mudas de *C. canjerana*. A estirpe ZK influenciou positivamente as variáveis fotossintéticas (F_v/F_m , A_{max} e g_s) de suas mudas, em relação a mudas Nin, e atuou como promotora do crescimento nesta espécie, conforme verificado pelas análises de biomassa. A estirpe Ab-V5, apesar de não ter influenciado as variáveis fotossintéticas de *C. canjerana*, também promoveu incremento das massas secas da parte aérea e total de suas mudas, em relação a mudas Nin. Esses resultados apontam a capacidade das duas BPCP escolhidas para este estudo em aumentar o crescimento de mudas de *C. canjerana*.

A interpretação das variáveis analisadas demonstrou que as mudas de *C. pachystachya*, *C. estrellensis* e *C. canjerana* são capazes de ter êxito no crescimento tanto com NO_3^- , quanto com NH_4^+ como fontes únicas de N inorgânico. Das espécies analisadas neste estudo, a única que apresentou toxicidade ao NH_4^+ foi *H. popayanensis*, espécie intolerante à sombra. Nesta espécie, foi perceptível a importância da inoculação com BPCP no aumento da tolerância à toxicidade ao NH_4^+ , refletido na inalteração da fotossíntese e na manutenção parcial do crescimento de suas mudas. Mudas de *C. canjerana*, espécie tolerante à sombra, apresentaram influência positiva na fotossíntese e no crescimento pela inoculação com as BPCP. *Cecropia pachystachya* e *C. estrellensis* tiveram crescimento similar com a inoculação com as diferentes BPCP. No entanto, as quatro espécies arbóreas demonstraram algum grau de influência dos fatores (fonte de N e inoculação) sobre as variáveis avaliadas, especialmente as bioquímicas.

Não há apenas um mecanismo envolvido na promoção do crescimento pelas BPCP, mas uma combinação de vários mecanismos que interagem em cada caso específico de inoculação e geram um efeito final de ampla escala na planta (Bashan e de-Bashan, 2010). Os efeitos da inoculação com *Azospirillum* e *Bacillus* são frequentemente relacionados à produção de fitormônios, principalmente as auxinas, que alteram o metabolismo e a morfologia da raiz, proporcionando maior absorção de água e íons (Spaepen et al., 2007; Beneduzi et al., 2008; Bashan e de-Bashan, 2010; Cassán et al., 2014). Possivelmente, a síntese de auxinas pelas BPCP empregadas neste estudo tenha contribuído com o crescimento de algumas mudas.

Ao testar a interação do grupo ecológico (intolerante e tolerante à sombra) com os fatores fonte de N e inoculação, verificou-se interação significativa entre grupo ecológico x inoculação em apenas uma variável: a ANR foliar, que foi influenciada positivamente pela estirpe ZK apenas nas espécies tolerantes à sombra. Poderia se esperar que as espécies intolerantes à sombra, cujas taxas fotossintéticas maiores propiciam a produção de mais fotoassimilados para serem exsudados pela raiz, apresentassem maior colonização por BPCP (Lynch e Ho, 2005) e, conseqüentemente, se beneficiassem mais da associação do que as espécies tolerantes à sombra. Porém, a inoculação não se mostrou particularmente mais eficaz em algum grupo ecológico específico, visto que duas espécies de grupos distintos (*H. popayanensis* e *C. canjerana*) tiveram o crescimento favorecido pelas BPCP. Além disso, mais espécies vegetais deveriam ser incluídas no estudo para uma comparação mais concreta entre grupos ecológicos.

5. Conclusões

As análises demonstraram que mudas de árvores da floresta estacional semidecidual do bioma Atlântico apresentaram respostas distintas ao cultivo com NO_3^- ou NH_4^+ . Os resultados obtidos permitem afirmar concretamente que a inoculação com BPCP exerce influência sobre a fotossíntese, o crescimento e o metabolismo do N destas mudas, inclusive promovendo incremento de biomassa, como foi verificado em mudas de *C. canjerana*. Os efeitos que as BPCP exercem sobre as plantas variam de acordo com a fonte de N em que as mudas são cultivadas, o que foi verificado em todas as espécies, principalmente a partir das análises metabólicas. Destaca-se, ainda, na interação dos efeitos da fonte de N x inoculação, o importante efeito protetor contra a toxicidade causada pelo NH_4^+ na espécie intolerante à sombra, *H. popayanensis*. Portanto, ressalta-se que a inoculação com BPCP tem notável potencial para estimular o crescimento de plantas de espécies arbóreas do bioma Atlântico, que são utilizadas como mudas nos programas de

reflorestamentos, inclusive em situações não ótimas de crescimento, como no cultivo em ambientes onde a razão $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ é alta.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina (UEL), ao Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas da UEL por disponibilizarem as sementes utilizadas neste estudo e ao Núcleo de Pesquisa para o Desenvolvimento e Aplicação de Biofertilizantes da UEL por cederem as BPCP. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Financiamento

Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (445290/2014-5).

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Contribuições dos autores

RSM e JAP conceberam o estudo e planejaram o delineamento experimental. AKC adquiriu, analisou e interpretou os dados. AKC, RSM e JAP escreveram e revisaram criticamente o manuscrito e o aprovaram para ser submetido.

Referências

- Aidar, M.P.M., Schmidt, S., Moss, G., Stewart, G.R., Joly, C.A., 2003. Nitrogen use strategies of neotropical rainforest trees in threatened Atlantic Forest. *Plant Cell Environ.* 26, 389–399.
- Andrews, M., Raven, J., Lea, P.J., 2013. Do plants need nitrate? The mechanisms by which nitrogen form affects plants. *Ann. Appl. Biol.* 163, 174–199.
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M., 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 233–266.
- Bashan, Y., de-Bashan, L.E., 2010. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth – a critical assessment. *Adv. Agron.* 108, 77–136.
- Bashan, Y., Salazar, B., Moreno, M., Lopez, B.R., Linderman, R.G., 2012. Restoration of eroded soil in the Sonoran Desert with native leguminous trees using plant growth-promoting microorganisms and limited amounts of compost and water. *J. Environ. Manage.* 102, 26–36.
- Bashan, Y., Salazar, B., Puente, M.E., Bacilio, M., Linderman, R.G., 2009b. Enhanced establishment and growth of giant cardon cactus in an eroded field in the Sonoran Desert using native legume

- trees as nurse plants aided by plant growth-promoting microorganisms and compost. *Biol. Fert. Soils* 45, 585–594.
- Bashan, Y., Salazar, B., Puente, M.E., 2009a. Responses of native legume desert trees used for reforestation in the Sonoran Desert to plant growth-promoting microorganisms in screen house. *Biol. Fert. Soils* 45, 655–662.
- Bashan, Y., Singh, C.S., Levanony, H., 1989. Contribution of *Azospirillum brasilense* Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation. *Can. J. Bot.* 67, 2429–2434.
- Bauer, G.A., Bazzaz, F.A., Minocha, R., Long, S., Magill, A.H., Aber, J.D., Berntson, G.M., 2004. Effects of chronic N additions on tissue chemistry, photosynthetic capacity, and carbon sequestration potential of a red pine (*Pinus resinosa* Ait.) stand in the NE United States. *Forest Ecol. Manag.* 196, 173–186.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., Passaglia, L.M.P., 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet. Mol. Biol.* 35, 1044–1051.
- Beneduzi, A., Peres, D., Vargas, L.K., Bodanese-Zanettini, M.H., Passaglia, L.M.P., 2008. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. *Appl. Soil Ecol.* 39, 311–320.
- Berg, G., 2009. Plant microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl. Microbiol. Biotech.* 84, 11–18.
- Bittsánszky, A., Pilinszky, K., Gyulai, G., Komives, T., 2015. Overcoming ammonium toxicity. *Plant Sci.* 231, 184–190.
- Bloom, A.J., Burger, M., Asensio, J.S.R., Cousins, A.B., 2010. Carbon dioxide enrichment inhibits nitrate assimilation in wheat and *Arabidopsis*. *Science* 328, 899–903.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Britto, D.T., Kronzucker, H.J., 2002. NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. *J. Plant Physiol.* 159, 567–584.
- Britto, D.T., Kronzucker, H.J., 2013. Ecological significance and complexity of N source preference in plants. *Ann. Bot.* 112, 957–963.
- Britto, D.T., Siddiqi, M.Y., Glass, A.D.M., Kronzucker, H.J., 2001. Futile transmembrane NH_4^+ cycling: a cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. *PNAS* 98, 4255–4258.
- Calzavara, A.K., Paiva, P.H.G., Gabriel, L.C., Oliveira, A.L.M., Milani, K.S., Oliveira, H.C., Bianchini, E., Pimenta, J.A., Oliveira, M.C.N., Dias-Pereira, J., Stolf-Moreira, R., 2018. Associative bacteria influence maize (*Zea mays* L.) growth, physiology and root anatomy under different nitrogen levels. *Plant Biol.* 20, 870–878.
- Carvalho, L.C., Dennis, P.G., Fedoseyenko, D., Hajirezaei, M.R., Borriss, R., von Wirén, N., 2011. Root exudation of sugars, amino acids, and organic acids by maize as affected by nitrogen, phosphorus, potassium, and iron deficiency. *J. Plant Nutr. Soil Sc.* 174, 3–11.
- Cassán, F., Vanderleyden, J., Spaepen, S., 2014. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. *J. Plant Growth Regul.* 33, 440–459.
- Chen, G., Guo, S.W., Kronzucker, H.J., Shi, W.M., 2013. Nitrogen use efficiency (NUE) in rice links to NH_4^+ toxicity and futile NH_4^+ cycling in roots. *Plant Soil* 369, 351–363.
- Creus, C.M., Graziano, M., Casanovas, E.M., Pereyra M.A., Simontacchi, M.A., Puntarulo, S., Barassi, C.A., Lamattina, L., 2005. Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. *Planta* 221, 297–303.
- Cruz, C., Domínguez-Valdivia, M.D., Aparicio-Tejo, P.M., Lamsfus, C., Bio, A., Martins-Loução, M.A., Moran, J.F., 2011. Intra-specific variation in pea responses to ammonium nutrition leads to different degrees of tolerance. *Environ. Exp. Bot.* 70, 233–243.

- Debiasi, T.V., Calzavara, A.K., Silva, L.M., Silva, J.G., Bianchini, E., Pimenta, J.A., Stolf-Moreira, R., Aidar, M.P.M., Sodek, L., Oliveira, H.C., 2019. *Acta Physiol. Plant.* 41, 131.
- Dias, T., Clemente, A., Martins-Loução, M.A., Sheppard, L., Bobbink, R., Cruz, C., 2014. Ammonium as a driving force of plant diversity and ecosystem functioning: observations based on 5 years' manipulation of N dose and form in a Mediterranean ecosystem. *Plos One* 9, e92517.
- Esteban, R., Ariz, I., Moran, J.F., 2016a. Review: mechanisms of ammonium toxicity and the quest for tolerance. *Plant Sci.* 248, 92–101.
- Esteban, R., Royo, B., Urarte, E., Zamarreño, M., Garcia-Mina, J.M., Moran, J.F., 2016b. Both free indole-3-acetic acid and photosynthetic performance are important players in the response of *Medicago truncatula* to urea and ammonium nutrition under axenic conditions. *Front. Plant Sci.* 16, 140.
- Fukami, J., Abrantes, J.L.F., del Cerro, P., Nogueira, M.A., Ollero, F.J., Megías, M., Hungria, M., 2018a. Revealing strategies of quorum sensing in *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6. *Arch. Microbiol.* 200, 47–56.
- Fukami, J., Cerezini, P., Hungria, M., 2018b. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Expr.* 8: 73.
- Gerendás, J., Zhu, Z., Bendixen, R., Ratcliffe, G., Sattelmacher, B., 1997. Physiological and biochemical processes related to ammonium toxicity in higher plants. *J. Plant Nutr. Soil Sc.* 160, 239–251.
- Ginestet, P., Audic, J.M., Urbain, V.V., Block, J.C., 1998. Estimation of nitrifying bacterial activities by measuring oxygen uptake in the presence of the metabolic inhibitors allylthiourea and azide. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2266–2268.
- Glick, B.R., Cheng, Z., Czarny, J., Cheng, Z., Duan, J., 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 119, 329–339.
- Goes, K.C.G.P., Fisher, M.L.C., Cattelan, A.J., Nogueira, M.A., Carvalho, C.G.P., Oliveira, A.L.M., 2012. Biochemical and molecular characterization of high population density bacteria isolated from sunflower. *J. Microbiol. Biotechn.* 22, 437–447.
- Grayston, S.J., Vaughan, D., Jones, D., 1996. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Appl. Soil Ecol.* 5: 29–56.
- Guo, S., Zhou, Y., Shen, Q., Zhang, F., 2007. Effect of ammonium and nitrate nutrition on some physiological processes in higher plants – growth, photosynthesis, photorespiration, and water relations. *Plant Biol.* 9, 21–29.
- Gupta, K.J., Hebelstrup, K.H., Mur, L.A.J., Igamberdiev, A.U., 2011. Plant hemoglobins: Important players at the crossroads between oxygen and nitric oxide. *FEBS Lett.* 585, 3843–3849.
- Hageman, R.H., Reed, A.J., 1980. Nitrate reductase from higher plants. *Method. Enzymol.* 69, 270–280.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann. Microbiol.* 60, 579–598.
- Herridge, D.F., Peoples, M.B., Boddey, R.M., 2008. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil* 311, 1–18.
- Hungria, M., Campo, R.J., Souza, E.M., Pedrosa, F.O., 2010. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil* 331, 413–425.
- Kronzucker, H.J., Siddiqi, M.Y., Glass, A.M., 1997. Conifer root discrimination against soil nitrate and the ecology of forest succession. *Nature* 385, 59–61.

- Kronzucker, H.J., Siddiqi, M.Y., Glass, A.D.M., Britto, D.T., 2003. Root ammonium transport efficiency as a determinant in forest colonization patterns: an hypothesis. *Physiol. Plantarum* 117, 164–170.
- Kusano, M., Fukushima, A., Redestig, H., Saito, K., 2011. Metabolomic approaches toward understanding nitrogen metabolism in plants. *J. Exp. Bot.* 62, 1439–1453.
- Lynch, J.P., Ho, M.D., 2005. Rhizoeconomics: carbon costs of phosphorus acquisition. *Plant Soil* 269, 45–56.
- Mao, Q., Lu, X., Mo, H., Gundersen, P., Mo, J., 2018. Effects of simulated N deposition on foliar nutrient status, N metabolism and photosynthetic capacity of three dominant understory plant species in a mature tropical forest. *Sci. Total Environ.* 610–611, 555–562.
- Mantelin, S., Touraine, B., 2004. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *J. Exp. Bot.* 55, 27–34.
- McCullough, H., 1967. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clin. Chim. Acta* 17, 297–304.
- Miranda, K.M., Espey, M.G., Wink, D.A., 2001. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 5, 62–71.
- Molina-Favero, C., Creus, C.M., Simontacchi, M., Puntarulo, S., Lamattina, L., 2008. Aerobic nitric oxide production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and its influence on root architecture in tomato. *MPMI* 21, 1001–1009.
- Oliveira, A.L.M., Santos, O.J.A.P., Marcelino, P.R.F., Milani, K.M.L., Zuluaga, M.Y.A., Zucareli, C., Gonçalves, L.S.A., 2017b. Maize inoculation with *Azospirillum brasilense* Ab-V5 cells enriched with exopolysaccharides and polyhydroxybutyrate results in high productivity under low N fertilizer input. *Front. Microbiol.* 8, 1873.
- Oliveira, H.C., Sodek, L., 2013. Effect of oxygen deficiency on nitrogen assimilation and amino acid metabolism by soybean root segments. *Amino Acids* 44, 743–755.
- Oliveira, H.C., Silva, L.M.I., Freitas, L.D., Debiasi, T.V., Marchiori, N.M., Aidar, M.P.M., Bianchini, E., Pimenta, J.A., Stolf-Moreira, R., 2017a. Nitrogen use strategies of seedlings from neotropical tree species of distinct successional groups. *Plant Physiol. Bioch.* 114, 119–127.
- Ortíz-Castro, R., Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., López-Bucio, J., 2009. The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signal. Behav.* 4, 701–712.
- Probanza, A., Lucas-García, J.A., Ruiz-Palomino, M., Ramos, B., Gutiérrez-Mañero, F.J., 2002. *Pinus pinea* L. seedling growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR *Bacillus* (*B. licheniformis* CECT 5106 and *B. pumilus* CECT 5105). *Appl. Soil Ecol.* 20, 75–84.
- Rabbee, M. F., Ali, M.S., Choi, J., Hwang, B.S., Jeong, S.C., Baek, K., 2019. *Bacillus velezensis*: a valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules* 24, 1046.
- Roosta, H.R., Schjoerring, J.K., 2008. Root carbon enrichment alleviates ammonium toxicity in cucumber plants. *J. Plant Nutr.* 31, 941–958.
- Sarasketa, A., González-Moro, M.B., González-Murua, C., Marino, D., 2016. Nitrogen source and external medium pH interaction differentially affects root and shoot metabolism in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* 7, 29.
- Schimann, H., Ponton, S., Hattenschwiler, S., Ferry, B., Lensi, R., Domenach, A.M., Roggy, J.C., 2008. Differing nitrogen use strategies of two tropical rainforest late successional tree species in French Guiana evidence from ¹⁵N natural abundance and microbial activities. *Soil Biol. Biochem.* 40, 487–494.
- Schmidt, S., Stewart, G.R., 1998. Transport, storage and mobilization of nitrogen by trees and shrubs in the wet/dry tropics of northern Australia. *Tree Physiol.* 18, 403–410.
- Schmidt, S., Stewart, G.R., Turnbull, M.H., Erskine, P.D., Ashwath, N., 1998. Nitrogen relations of natural and disturbed communities in tropical Australia. *Oecologia* 117, 95–104.

- Shimizu, M., Ishida, A., Tange, T., Yagi, H., 2006. Leaf turnover and growth responses of shade-grown saplings of four *Shorea* rain forest species to a sudden increase in light. *Tree Physiol.* 26, 449–457.
- Siddique, I., Vieira, I.C., Schmidt, S., Lamb, D., Carvalho, C.J.R., Figueiredo, R.O., Blomberg, S., Davidson, E.A., 2010. Nitrogen and phosphorus additions negatively affect tree species diversity in tropical forest regrowth trajectories. *Ecology* 91, 2121–2131.
- Singh, R.P., Srivastava, H.S., 1986. Increase in glutamate synthase (NADH) activity in maize seedlings in response to nitrate and ammonium nitrogen. *Physiol. Plantarum* 66, 413–416.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R., 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 425–448.
- Stewart, G.R., Popp, M., Holzappel, I., Stewart, J.J., Dickie-Eskew, A., 1986. Localization of nitrate reduction in ferns and its relationship to environment and physiological characteristics. *New Phytol.* 104, 373–384.
- Tiepo, A.N., Hertel, M.F., Rocha, S.S., Calzavara, A.K., Oliveira, A.L.M., Pimenta, J.A., Oliveira, H.C., Bianchini, E., Stolf-Moreira, R., 2018. Enhanced drought tolerance in seedlings of Neotropical tree species inoculated with plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiol. Bioch.* 130, 277–288.
- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., Boyce, A.N., 2016. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability – a review. *Molecules* 21, 573.
- Vitousek, P.M., Matson, P.A., Cleve, K.V., 1989. Nitrogen availability and nitrification during succession: primary, secondary, and old-field series. *Plant Soil* 115, 229–239.
- Wang, X., Hargrove, M.S., 2013. Nitric oxide in plants: the roles of ascorbate and hemoglobin. *Plos one* 8, e82611.
- Yang, H., von der Fecht-Bartenbach, J., Friml, J., Lohmann, J.U., Neuhäuser, B., Ludewig, U., 2014. Auxin-modulated root growth inhibition in *Arabidopsis thaliana* seedlings with ammonium as the sole nitrogen source. *Funct. Plant Biol.* 2, 239–251.
- Yemm, E.W., Cocking, E.C., 1955. The determination of amino acid with ninhydrin. *Analyst* 80, 209–213.
- Zhou, Y., Zhang, Y.L., Wang, X., Cui, J., Xia, X., Shi, K., Yu, J., 2011. Effects of nitrogen form on growth, CO₂ assimilation, chlorophyll fluorescence, and photosynthetic electron allocation in cucumber and rice plants. *J. Zhejiang Univ.-Sci. B* 12, 126–134.
- Zhu, Z., Gerendás, J., Bendixen, R., Schinner, K., Tabrizi, H., Sattelmacher, B., Hansen, U.P., 2000. Different tolerance to light stress in NO₃⁻ and NH₄⁺-grown *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Biol.* 2, 558–570.

Tabela S1. Médias \pm erros-padrão de variáveis de mudas de *Cecropia pachystachya*, cultivadas com NO_3^- ou NH_4^+ , não inoculadas com bactérias (Nin), ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. $n = 5$ para as análises da F_v/F_m e bioquímicas (exceto para os metabólitos da seiva do xilema: $n = 3$); $n = 10$ para análises de crescimento (massas secas). A_{max} – assimilação líquida de CO_2 ; ANR – atividade da nitrato redutase; F_v/F_m – eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II; g_s – condutância estomática.

Variável	Fonte de N	Inoculação		
		Nin	Ab-V5	ZK
F_v/F_m	NO_3^-	0,693 \pm 0,008	0,684 \pm 0,009	0,694 \pm 0,012
	NH_4^+	0,689 \pm 0,015	0,710 \pm 0,005	0,690 \pm 0,009
A_{max} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	NO_3^-	5,78 \pm 0,206	6,19 \pm 0,299	5,61 \pm 0,175
	NH_4^+	7,09 \pm 0,192	7,54 \pm 0,213	5,97 \pm 0,200
g_s ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	NO_3^-	0,079 \pm 0,007	0,080 \pm 0,006	0,069 \pm 0,007
	NH_4^+	0,090 \pm 0,007	0,131 \pm 0,018	0,072 \pm 0,004
Massa seca da raiz (g)	NO_3^-	0,221 \pm 0,036	0,237 \pm 0,030	0,227 \pm 0,028
	NH_4^+	0,242 \pm 0,034	0,364 \pm 0,086	0,289 \pm 0,033
Massa seca da parte aérea (g)	NO_3^-	0,330 \pm 0,063	0,288 \pm 0,049	0,345 \pm 0,050
	NH_4^+	0,362 \pm 0,066	0,353 \pm 0,062	0,381 \pm 0,067
Massa seca total (g)	NO_3^-	0,551 \pm 0,056	0,526 \pm 0,040	0,572 \pm 0,044
	NH_4^+	0,604 \pm 0,086	0,717 \pm 0,101	0,671 \pm 0,075
[NO_3^-] raiz (nmol g^{-1})	NO_3^-	40,7 \pm 3,24	53,2 \pm 20,8	75,0 \pm 23,8
	NH_4^+	41,4 \pm 4,64	35,1 \pm 4,58	63,4 \pm 8,94
[NO_3^-] seiva (mol %)	NO_3^-	38,8 \pm 7,38	41,6 \pm 2,22	42,9 \pm 4,42
	NH_4^+	36,8 \pm 11,5	10,1 \pm 0,652	34,0 \pm 10,2
[NO_3^-] folhas (nmol g^{-1})	NO_3^-	30,6 \pm 5,69	61,6 \pm 7,88	29,5 \pm 5,47
	NH_4^+	59,9 \pm 9,97	39,9 \pm 8,19	46,0 \pm 12,7
[NH_4^+] raiz (nmol g^{-1})	NO_3^-	213 \pm 12,9	192 \pm 0,993	221 \pm 9,77
	NH_4^+	253 \pm 4,17	238 \pm 22,9	235 \pm 15,0
[NH_4^+] seiva (mol %)	NO_3^-	9,36 \pm 1,60	8,33 \pm 0,606	9,69 \pm 1,52
	NH_4^+	17,1 \pm 5,15	13,6 \pm 0,701	11,9 \pm 3,50
[NH_4^+] folhas (nmol g^{-1})	NO_3^-	243 \pm 11,1	274 \pm 28,4	255 \pm 37,8
	NH_4^+	266 \pm 17,6	280 \pm 12,0	418 \pm 19,8
[aminoácidos] raiz ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	NO_3^-	1,67 \pm 0,123	0,888 \pm 0,127	1,26 \pm 0,156
	NH_4^+	0,880 \pm 0,084	0,833 \pm 0,111	0,946 \pm 0,085
[aminoácidos] seiva (mol %)	NO_3^-	51,8 \pm 5,92	50,0 \pm 2,68	47,4 \pm 3,76
	NH_4^+	46,1 \pm 8,05	76,3 \pm 0,638	54,1 \pm 7,85
[aminoácidos] folhas ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	NO_3^-	1,60 \pm 0,137	1,80 \pm 0,106	1,74 \pm 0,063
	NH_4^+	1,53 \pm 0,048	1,69 \pm 0,149	3,46 \pm 0,545
[proteínas] raiz (mg g^{-1})	NO_3^-	0,521 \pm 0,046	0,449 \pm 0,043	0,498 \pm 0,018
	NH_4^+	0,588 \pm 0,051	0,438 \pm 0,050	0,503 \pm 0,071
[proteínas] folhas (mg g^{-1})	NO_3^-	1,52 \pm 0,203	2,38 \pm 0,388	2,25 \pm 0,319
	NH_4^+	2,41 \pm 0,456	2,91 \pm 0,373	3,05 \pm 0,395
ANR raiz ($\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	NO_3^-	10,6 \pm 2,21	9,77 \pm 0,981	4,39 \pm 0,692
	NH_4^+	1,63 \pm 0,075	1,70 \pm 0,094	1,68 \pm 0,061
ANR folhas ($\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	NO_3^-	10,5 \pm 0,222	9,09 \pm 0,904	10,8 \pm 1,61
	NH_4^+	6,06 \pm 1,40	9,97 \pm 0,571	7,48 \pm 0,833

Tabela S2. Médias \pm erros-padrão de variáveis de mudas de *Heliocarpus popayanensis*, cultivadas com NO_3^- ou NH_4^+ , não inoculadas com bactérias (Nin), ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. $n = 5$ para as análises da F_v/F_m e bioquímicas (exceto para os metabólitos da seiva do xilema: $n = 3$); $n = 10$ para análises de crescimento (massas secas). A_{max} – assimilação líquida de CO_2 ; ANR – atividade da nitrato redutase; F_v/F_m – eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II; g_s – condutância estomática.

Variável	Fonte de N	Inoculação		
		Nin	Ab-V5	ZK
F_v/F_m	NO_3^-	0,772 \pm 0,004	0,775 \pm 0,005	0,772 \pm 0,002
	NH_4^+	0,779 \pm 0,002	0,783 \pm 0,005	0,767 \pm 0,006
A_{max} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	NO_3^-	12,2 \pm 0,642	13,6 \pm 0,353	11,8 \pm 0,451
	NH_4^+	7,11 \pm 0,962	13,5 \pm 0,822	12,5 \pm 0,479
g_s ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	NO_3^-	0,257 \pm 0,031	0,252 \pm 0,015	0,237 \pm 0,024
	NH_4^+	0,133 \pm 0,027	0,268 \pm 0,026	0,209 \pm 0,018
Massa seca da raiz (g)	NO_3^-	0,309 \pm 0,028	0,317 \pm 0,033	0,368 \pm 0,026
	NH_4^+	0,107 \pm 0,028	0,227 \pm 0,031	0,254 \pm 0,033
Massa seca da parte aérea (g)	NO_3^-	0,327 \pm 0,044	0,385 \pm 0,064	0,439 \pm 0,040
	NH_4^+	0,084 \pm 0,015	0,139 \pm 0,022	0,173 \pm 0,027
Massa seca total (g)	NO_3^-	0,637 \pm 0,063	0,702 \pm 0,087	0,807 \pm 0,046
	NH_4^+	0,191 \pm 0,035	0,365 \pm 0,050	0,426 \pm 0,048
[NO_3^-] raiz (nmol g^{-1})	NO_3^-	15,6 \pm 2,98	35,4 \pm 8,42	13,8 \pm 3,69
	NH_4^+	3,81 \pm 0,424	2,08 \pm 0,153	1,91 \pm 0,199
[NO_3^-] seiva (mol %)	NO_3^-	3,75 \pm 1,78	13,6 \pm 3,06	6,02 \pm 2,98
	NH_4^+	1,12 \pm 0,444	2,94 \pm 0,723	1,38 \pm 0,683
[NO_3^-] folhas (nmol g^{-1})	NO_3^-	67,3 \pm 11,0	174 \pm 31,6	172 \pm 33,1
	NH_4^+	63,8 \pm 21,4	71,7 \pm 34,6	71,3 \pm 26,3
[NH_4^+] raiz (nmol g^{-1})	NO_3^-	549 \pm 42,4	667 \pm 58,0	440 \pm 25,6
	NH_4^+	1232 \pm 106	671 \pm 45,2	277 \pm 30,3
[NH_4^+] seiva (mol %)	NO_3^-	17,8 \pm 0,799	15,1 \pm 4,06	16,3 \pm 3,30
	NH_4^+	12,8 \pm 2,47	11,0 \pm 2,11	11,4 \pm 0,223
[NH_4^+] folhas (nmol g^{-1})	NO_3^-	382 \pm 14,8	369 \pm 10,5	329 \pm 50,9
	NH_4^+	285 \pm 35,6	517 \pm 41,4	566 \pm 112
[aminoácidos] raiz ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	NO_3^-	0,720 \pm 0,055	0,771 \pm 0,105	0,650 \pm 0,108
	NH_4^+	1,30 \pm 0,131	0,845 \pm 0,076	1,08 \pm 0,164
[aminoácidos] seiva (mol %)	NO_3^-	78,4 \pm 2,35	71,3 \pm 4,37	77,7 \pm 2,20
	NH_4^+	86,1 \pm 2,88	86,0 \pm 2,60	87,2 \pm 0,842
[aminoácidos] folhas ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	NO_3^-	1,83 \pm 0,215	2,54 \pm 0,337	2,72 \pm 0,168
	NH_4^+	7,19 \pm 0,693	4,51 \pm 0,783	5,78 \pm 0,681
[proteínas] raiz (mg g^{-1})	NO_3^-	1,58 \pm 0,095	1,60 \pm 0,098	1,77 \pm 0,136
	NH_4^+	1,85 \pm 0,103	1,61 \pm 0,092	1,93 \pm 0,162
[proteínas] folhas (mg g^{-1})	NO_3^-	2,79 \pm 0,245	3,18 \pm 0,467	2,94 \pm 0,325
	NH_4^+	1,65 \pm 0,190	1,28 \pm 0,282	1,31 \pm 0,172
ANR raiz ($\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	NO_3^-	2,52 \pm 0,566	2,43 \pm 0,370	2,84 \pm 0,436
	NH_4^+	2,22 \pm 0,331	2,26 \pm 0,297	2,09 \pm 0,374
ANR folhas ($\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	NO_3^-	26,0 \pm 3,43	29,2 \pm 7,01	29,0 \pm 4,29
	NH_4^+	3,80 \pm 0,305	3,65 \pm 0,183	5,08 \pm 0,392

Tabela S3. Médias \pm erros-padrão de variáveis de mudas de *Cariniana estrellensis*, cultivadas com NO_3^- ou NH_4^+ , não inoculadas com bactérias (Nin), ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. $n = 5$ para as análises da F_v/F_m e bioquímicas (exceto para os metabólitos da seiva do xilema: $n = 3$); $n = 10$ para análises de crescimento (massas secas). A_{max} – assimilação líquida de CO_2 ; ANR – atividade da nitrato redutase; F_v/F_m – eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II; g_s – condutância estomática.

Variável	Fonte de N	Inoculação		
		Nin	Ab-V5	ZK
F_v/F_m	NO_3^-	0,735 \pm 0,002	0,743 \pm 0,003	0,732 \pm 0,003
	NH_4^+	0,706 \pm 0,002	0,709 \pm 0,003	0,707 \pm 0,012
A_{max} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	NO_3^-	6,21 \pm 0,361	6,08 \pm 0,345	6,15 \pm 0,426
	NH_4^+	4,91 \pm 0,350	5,00 \pm 0,195	5,08 \pm 0,385
g_s ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	NO_3^-	0,055 \pm 0,007	0,049 \pm 0,004	0,052 \pm 0,007
	NH_4^+	0,039 \pm 0,004	0,035 \pm 0,004	0,037 \pm 0,005
Massa seca da raiz (g)	NO_3^-	0,327 \pm 0,044	0,510 \pm 0,048	0,510 \pm 0,040
	NH_4^+	0,470 \pm 0,048	0,466 \pm 0,048	0,481 \pm 0,062
Massa seca da parte aérea (g)	NO_3^-	0,345 \pm 0,023	0,378 \pm 0,026	0,327 \pm 0,019
	NH_4^+	0,349 \pm 0,029	0,328 \pm 0,022	0,410 \pm 0,015
Massa seca total (g)	NO_3^-	0,794 \pm 0,033	0,888 \pm 0,031	0,837 \pm 0,029
	NH_4^+	0,819 \pm 0,033	0,795 \pm 0,033	0,892 \pm 0,059
[NO_3^-] raiz (nmol g^{-1})	NO_3^-	944 \pm 125	1238 \pm 280	1064 \pm 240
	NH_4^+	280 \pm 58,0	843 \pm 66,8	410 \pm 21,3
[NO_3^-] seiva (mol %)	NO_3^-	16,5 \pm 3,12	19,0 \pm 4,41	10,9 \pm 2,17
	NH_4^+	6,07 \pm 1,58	18,4 \pm 6,15	14,0 \pm 6,50
[NO_3^-] folhas (nmol g^{-1})	NO_3^-	104 \pm 17,2	92,8 \pm 25,7	107 \pm 23,9
	NH_4^+	30,6 \pm 2,69	17,8 \pm 5,87	22 \pm 8,28
[NH_4^+] raiz (nmol g^{-1})	NO_3^-	235 \pm 33,0	145 \pm 10,4	226 \pm 38,2
	NH_4^+	148 \pm 18,2	141 \pm 3,85	315 \pm 15,3
[NH_4^+] seiva (mol %)	NO_3^-	16,5 \pm 0,784	12,6 \pm 1,28	12,7 \pm 2,22
	NH_4^+	17,8 \pm 2,18	14,4 \pm 3,64	12,9 \pm 0,668
[NH_4^+] folhas (nmol g^{-1})	NO_3^-	245 \pm 29,0	235 \pm 18,5	282 \pm 31,7
	NH_4^+	190 \pm 4,55	351 \pm 68,3	189 \pm 34,0
[aminoácidos] raiz ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	NO_3^-	2,50 \pm 0,237	2,65 \pm 0,122	2,51 \pm 0,200
	NH_4^+	3,01 \pm 0,385	2,83 \pm 0,512	1,70 \pm 0,225
[aminoácidos] seiva (mol %)	NO_3^-	66,9 \pm 3,55	68,4 \pm 3,95	76,3 \pm 4,39
	NH_4^+	76,2 \pm 3,47	67,1 \pm 9,51	73,2 \pm 7,11
[aminoácidos] folhas ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	NO_3^-	3,32 \pm 0,137	3,38 \pm 0,162	2,32 \pm 0,167
	NH_4^+	4,35 \pm 0,313	5,12 \pm 0,613	3,13 \pm 0,337
[proteínas] raiz (mg g^{-1})	NO_3^-	1,52 \pm 0,121	1,42 \pm 0,100	1,19 \pm 0,028
	NH_4^+	1,33 \pm 0,010	1,41 \pm 0,094	1,35 \pm 0,082
[proteínas] folhas (mg g^{-1})	NO_3^-	5,05 \pm 0,534	4,82 \pm 0,309	5,26 \pm 0,106
	NH_4^+	4,84 \pm 0,065	4,62 \pm 0,145	5,41 \pm 0,324
ANR raiz ($\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	NO_3^-	2,13 \pm 0,430	1,41 \pm 0,301	0,950 \pm 0,192
	NH_4^+	0,647 \pm 0,089	0,640 \pm 0,034	0,587 \pm 0,124
ANR folhas ($\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	NO_3^-	14,6 \pm 3,52	15,5 \pm 2,8	27,9 \pm 4,94
	NH_4^+	8,25 \pm 1,17	18,9 \pm 4,35	17,5 \pm 1,51

Tabela S4. Médias \pm erros-padrão de variáveis de mudas de *Cabralea canjerana*, cultivadas com NO_3^- ou NH_4^+ , não inoculadas com bactérias (Nin), ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. $n = 5$ para as análises da F_v/F_m e bioquímicas (exceto para os metabólitos da seiva do xilema: $n = 3$); $n = 10$ para análises de crescimento (massas secas). A_{max} – assimilação líquida de CO_2 ; ANR – atividade da nitrato redutase; F_v/F_m – eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II; g_s – condutância estomática.

Variável	Fonte de N	Inoculação		
		Nin	Ab-V5	ZK
F_v/F_m	NO_3^-	0,756 \pm 0,004	0,764 \pm 0,004	0,768 \pm 0,005
	NH_4^+	0,770 \pm 0,005	0,783 \pm 0,003	0,785 \pm 0,004
A_{max} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	NO_3^-	4,18 \pm 0,313	4,55 \pm 0,173	5,27 \pm 0,173
	NH_4^+	4,38 \pm 0,217	4,97 \pm 0,366	5,68 \pm 0,286
g_s ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	NO_3^-	0,065 \pm 0,009	0,081 \pm 0,008	0,123 \pm 0,008
	NH_4^+	0,089 \pm 0,011	0,090 \pm 0,009	0,103 \pm 0,011
Massa seca da raiz (g)	NO_3^-	0,392 \pm 0,027	0,486 \pm 0,021	0,532 \pm 0,034
	NH_4^+	0,479 \pm 0,032	0,456 \pm 0,022	0,528 \pm 0,037
Massa seca da parte aérea (g)	NO_3^-	0,467 \pm 0,029	0,550 \pm 0,032	0,561 \pm 0,023
	NH_4^+	0,492 \pm 0,019	0,572 \pm 0,020	0,556 \pm 0,038
Massa seca total (g)	NO_3^-	0,859 \pm 0,052	1,04 \pm 0,048	1,09 \pm 0,043
	NH_4^+	0,970 \pm 0,038	1,03 \pm 0,037	1,08 \pm 0,049
[NO_3^-] raiz (nmol g^{-1})	NO_3^-	28066 \pm 5118	44394 \pm 8731	35408 \pm 6659
	NH_4^+	341 \pm 32,0	357 \pm 101	617 \pm 72,4
[NO_3^-] seiva (mol %)	NO_3^-	39,4 \pm 13,3	21,6 \pm 3,48	33,8 \pm 4,13
	NH_4^+	3,60 \pm 1,85	5,33 \pm 2,56	3,98 \pm 1,96
[NO_3^-] folhas (nmol g^{-1})	NO_3^-	877 \pm 212	1087 \pm 299	1160 \pm 351
	NH_4^+	64,5 \pm 12,6	157 \pm 30,0	112 \pm 42,7
[NH_4^+] raiz (nmol g^{-1})	NO_3^-	1282 \pm 89,3	1478 \pm 95,2	1557 \pm 140
	NH_4^+	1197 \pm 270	1198 \pm 88,8	1194 \pm 177
[NH_4^+] seiva (mol %)	NO_3^-	5,75 \pm 0,741	8,21 \pm 0,205	6,50 \pm 0,939
	NH_4^+	9,19 \pm 0,793	10,7 \pm 5,21	16,1 \pm 5,03
[NH_4^+] folhas (nmol g^{-1})	NO_3^-	465 \pm 23,1	478 \pm 50,7	546 \pm 39,1
	NH_4^+	530 \pm 61,5	693 \pm 71,7	457 \pm 63,8
[aminoácidos] raiz ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	NO_3^-	8,31 \pm 0,804	9,22 \pm 1,36	11,0 \pm 0,395
	NH_4^+	10,3 \pm 0,638	10,7 \pm 0,595	10,2 \pm 0,648
[aminoácidos] seiva (mol %)	NO_3^-	54,9 \pm 12,6	70,2 \pm 3,62	59,8 \pm 3,82
	NH_4^+	87,2 \pm 2,22	84,0 \pm 7,67	80,0 \pm 6,98
[aminoácidos] folhas ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	NO_3^-	8,12 \pm 0,777	8,90 \pm 0,589	8,28 \pm 0,253
	NH_4^+	15,5 \pm 2,05	11,9 \pm 0,928	14,9 \pm 0,313
[proteínas] raiz (mg g^{-1})	NO_3^-	3,65 \pm 0,215	3,31 \pm 0,281	3,58 \pm 0,135
	NH_4^+	5,71 \pm 0,349	6,22 \pm 0,082	5,66 \pm 0,389
[proteínas] folhas (mg g^{-1})	NO_3^-	14,8 \pm 0,545	16,4 \pm 0,562	16,1 \pm 0,545
	NH_4^+	20,6 \pm 1,84	23,3 \pm 0,495	22,9 \pm 1,03
ANR raiz ($\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	NO_3^-	27,2 \pm 2,44	17,0 \pm 2,60	17,6 \pm 0,727
	NH_4^+	5,08 \pm 0,250	6,52 \pm 0,263	5,43 \pm 0,169
ANR folhas ($\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	NO_3^-	13,7 \pm 1,80	16,2 \pm 1,12	34,5 \pm 2,00
	NH_4^+	2,62 \pm 0,283	4,07 \pm 1,09	4,87 \pm 0,941

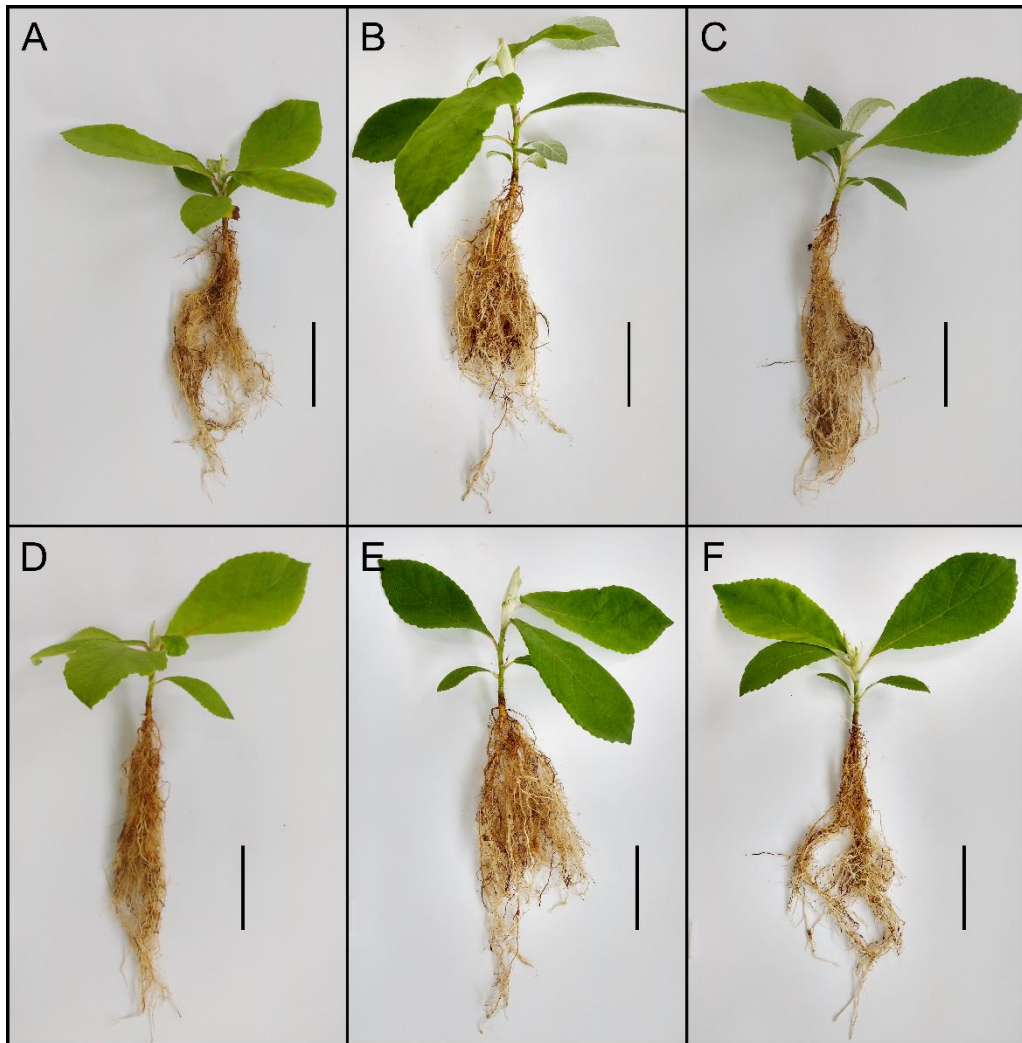


Fig. S1. Mudras de *Cecropia pachystachya* cultivadas com NO₃⁻ (A-C) ou NH₄⁺ (D-F), não inoculadas com bactérias (A e D), ou inoculadas com Ab-V5 (B e E) ou ZK (C e F). Escala = 5 cm.

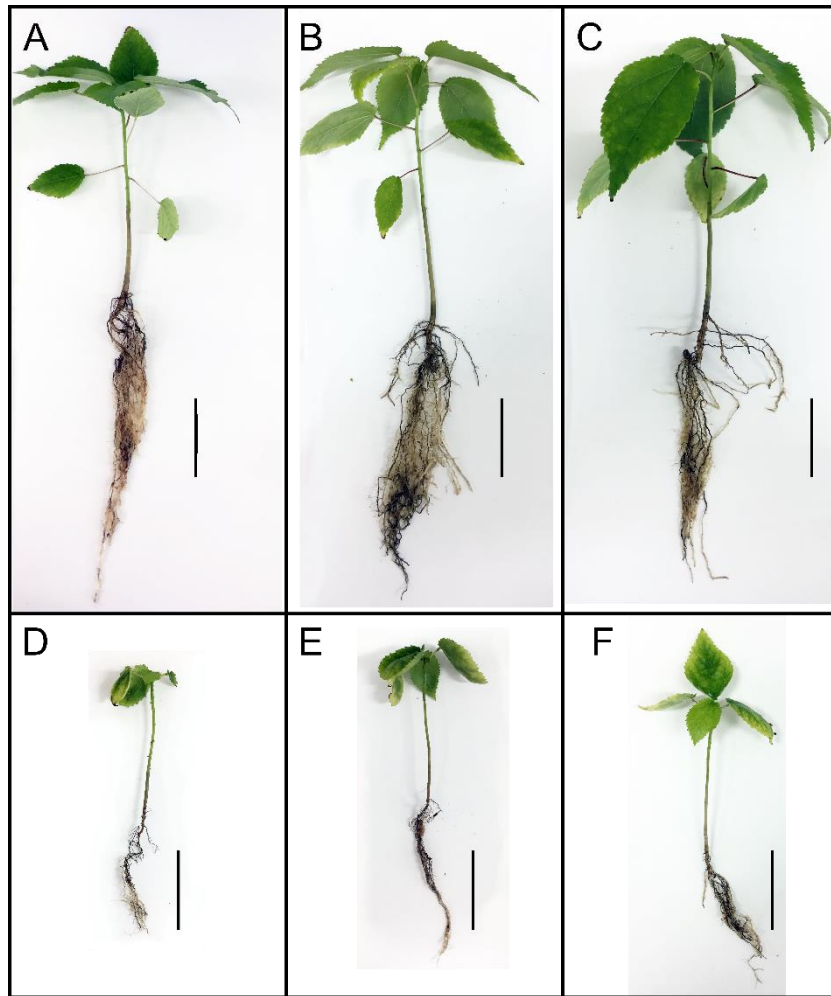


Fig. S2. Mudanças de *Heliocarpus popayanensis* cultivadas com NO_3^- (A-C) ou NH_4^+ (D-F), não inoculadas com bactérias (A e D), ou inoculadas com Ab-V5 (B e E) ou ZK (C e F). Escala = 5 cm.

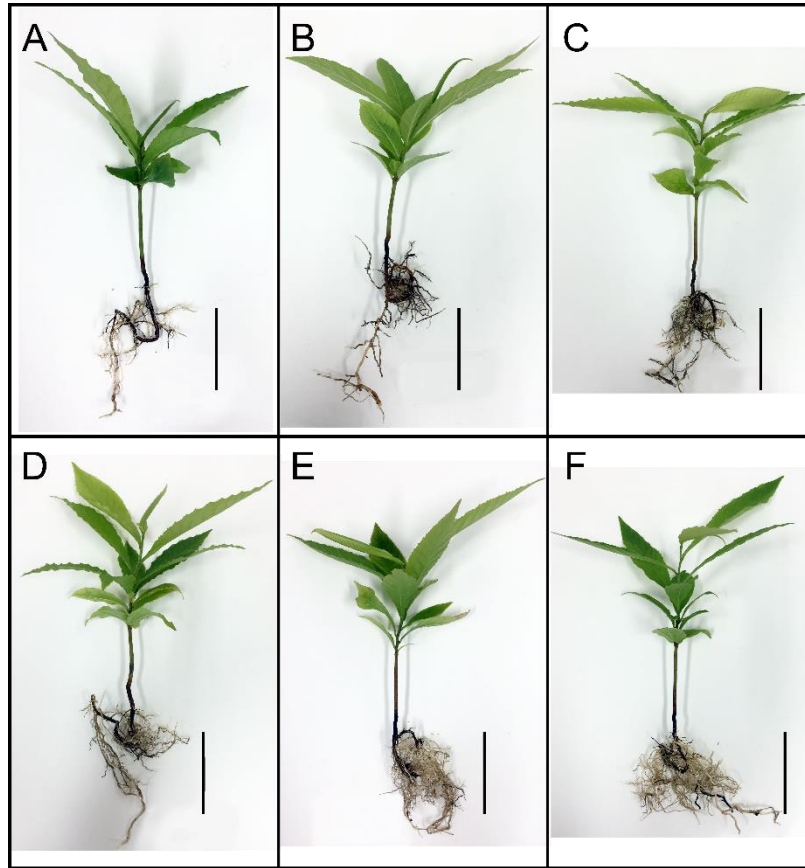


Fig. S3. Mudras de *Cariniana estrellensis* cultivadas com NO_3^- (A-C) ou NH_4^+ (D-F), não inoculadas com bactérias (A e D), ou inoculadas com Ab-V5 (B e E) ou ZK (C e F). Escala = 5 cm.

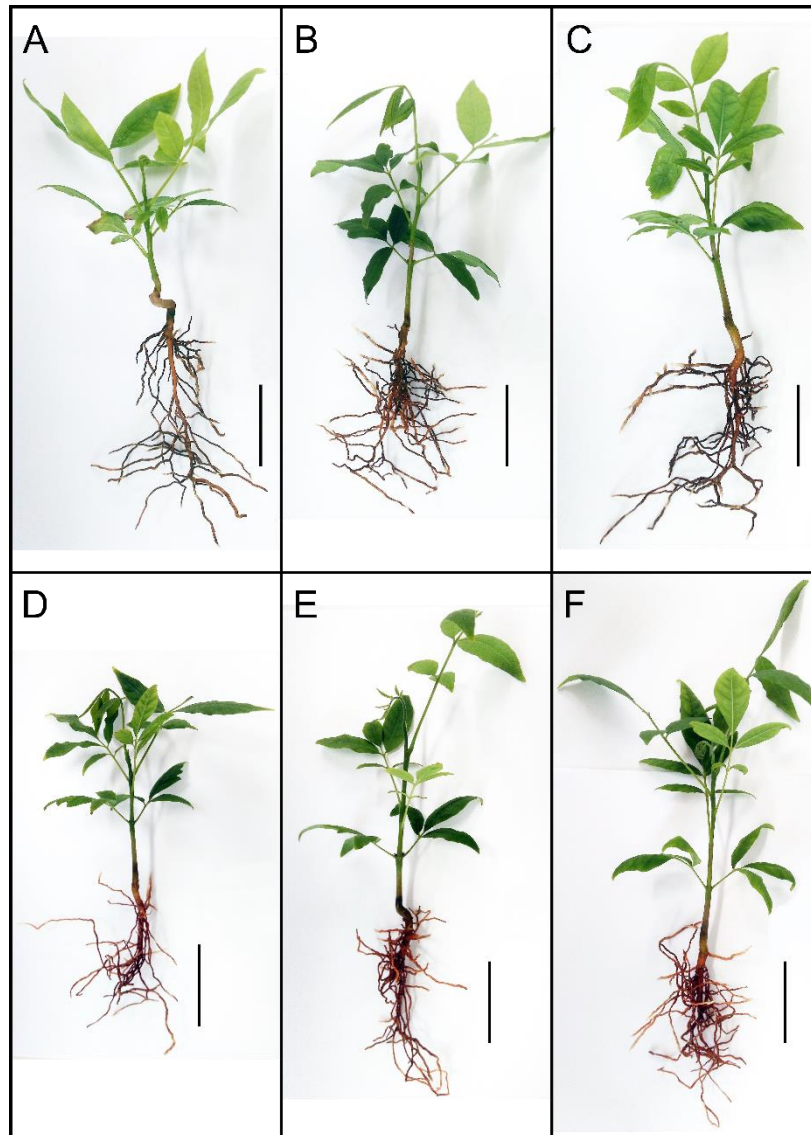


Fig. S4. Mudras de *Cabralea canjerana* cultivadas com NO_3^- (A-C) ou NH_4^+ (D-F), não inoculadas com bactérias (A e D), ou inoculadas com Ab-V5 (B e E) ou ZK (C e F). Escala = 5 cm.

Capítulo 2 – Mudanças de espécies arbóreas neotropicais inoculadas com bactérias associativas são mais tolerantes a condições de deficiência de nitrogênio?

Anderson Kikuchi Calzavara^{a,*}, Renata Stolf-Moreira^a, José Antonio Pimenta^a

^a*Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil*

**Autor Correspondente: Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid Km 380, Londrina, PR, 86057-970, Brasil*

E-mail: anderson.calzavara@hotmail.com

Artigo a ser submetido para publicação na revista *Environmental and Experimental Botany*.

Fator de impacto: 3,712.

<https://www.journals.elsevier.com/environmental-and-experimental-botany>

Destaques

- O metabolismo do N foi influenciado pela deficiência de N e pelas BPCP em todas as espécies vegetais.
- A inoculação com Ab-V5 aumentou o crescimento de mudas de *Cecropia pachystachya*, de forma mais expressiva quando suplementadas com N.
- As estirpes Ab-V5 e ZK promoveram o crescimento de mudas de *Cabralea canjerana*, independentemente da condição de N.

Abreviações

A_{max} , assimilação líquida de CO_2 ; AGS, atividade da enzima glutamina sintetase; ANR, atividade da enzima nitrato redutase; BPCP, bactérias promotoras do crescimento em plantas; C_i , concentração intercelular de CO_2 ; C_{tot} , concentração total de clorofilas; C_{tot}/Car , razão de concentração total de clorofilas/carotenoides; *EUA*, eficiência no uso da água; F_v/F_m M, eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II avaliada antes do amanhecer; F_v/F_m MD, eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II avaliada ao meio dia; GE, grupo ecológico; g_s , condutância estomática; N+, tratamento com suplementação de N; N-, tratamento sem suplementação de N; Nin, plantas não inoculadas com bactérias; R/PA, razão raiz/parte aérea.

1 Resumo

2 A deficiência de nitrogênio (N) influencia de maneira geral a fisiologia das plantas, alterando
3 o metabolismo do N e inibindo a fotossíntese e o crescimento vegetal. A associação com
4 bactérias promotoras do crescimento em plantas (BPCP) tem chamado atenção como
5 alternativa para mitigar diversos estresses ambientais, como a falta de N. No bioma
6 Atlântico, não há estudos que relacionam os efeitos da falta de N com os da inoculação
7 com BPCP sobre o metabolismo e crescimento de mudas de espécies arbóreas. Neste
8 estudo, objetivou-se verificar os efeitos da inoculação com BPCP sobre a tolerância de
9 mudas de espécies arbóreas submetidas à deficiência de N. Foram escolhidas quatro
10 espécies, sendo duas intolerantes à sombra – *Cecropia pachystachya* e *Heliocarpus*
11 *popayanensis* – e duas tolerantes à sombra – *Cariniana estrellensis* e *Cabralea canjerana*.
12 As estirpes Ab-V5, de *Azospirillum brasilense*, e ZK, de *Bacillus velezensis*, foram
13 selecionadas como BPCP para inoculação. Mudas das quatro espécies vegetais foram
14 cultivadas em solo misturado com areia com (N+) ou sem (N-) suplementação de N. As
15 mudas foram também inoculadas com as estirpes Ab-V5 ou ZK e, como controle, para cada
16 tratamento de N, parte das mudas não foi inoculada com BPCP (Nin). Dessa forma, foram
17 testados os efeitos da deficiência de N, da inoculação e da interação entre estes dois fatores
18 sobre variáveis do metabolismo do N, fotossintéticas e de crescimento das mudas. Todas
19 as espécies arbóreas tiveram a fotossíntese limitada pela deficiência de N, além de ter a
20 concentração de moléculas nitrogenadas e a atividade de enzimas do metabolismo do N
21 diminuídas por este estresse. O crescimento não foi inibido pela falta de N em apenas uma
22 espécie: *C. canjerana*. A inoculação com Ab-V5 levou ao aumento do crescimento de
23 mudas de *C. pachystachya*, que foi mais expressivo sob suplementação de N (N+). A
24 associação com BPCP provocou nas folhas diminuição da atividade da nitrato redutase e
25 aumento da glutamina sintetase, dentre outras alterações no metabolismo do N. As mudas
26 de *H. popayanensis* e *C. estrellensis* não tiveram o crescimento inibido pela inoculação,
27 mas foram influenciadas principalmente em variáveis metabólicas pela inoculação com ZK.
28 A fotossíntese aumentou com a inoculação com ZK em *H. popayanensis* e com Ab-V5 em
29 *C. estrellensis*. Em *C. canjerana*, ambas as BPCP promoveram o crescimento de suas
30 mudas. Os resultados indicam que a deficiência de N e a inoculação com BPCP influenciam
31 a fotossíntese, o crescimento e o metabolismo do N de mudas de espécies arbóreas que
32 ocorrem na floresta estacional semidecidual. Além disso, os efeitos da inoculação são
33 influenciados pela suplementação de N durante o cultivo das mudas. A inoculação de
34 mudas de espécies arbóreas do bioma Atlântico com BPCP tem potencial para estimular o
35 crescimento e desenvolvimento em condições ótimas de N e de aumentar a tolerância sob
36 deficiência de N no solo.

37
38 **Palavras chave:** *Azospirillum brasilense*, *Bacillus velezensis*, Mata Atlântica, metabolismo
39 do nitrogênio, sucessão ecológica, fotoinibição, trocas gasosas.

Abstract

Nitrogen (N) deficiency generally affects plant physiology, altering N metabolism and inhibiting photosynthesis and plant growth. The association with plant growth-promoting bacteria (PGPB) has drawn attention as an alternative to mitigate various environmental stresses, such as N deficiency. In the Atlantic biome, there are no studies correlating the effects of lack of N with those of inoculation with PGPB on the metabolism and growth of seedlings of tree species. This study aimed to verify the effects of inoculation with PGPB on the tolerance of seedlings of tree species submitted to N deficiency. Four species were chosen: two shade-intolerant – *Cecropia pachystachya* and *Heliocarpus popayanensis* – and two shade-tolerant – *Cariniana estrellensis* and *Cabralea canjerana*. The strains Ab-V5, of *Azospirillum brasilense*, and ZK, of *Bacillus velezensis*, were selected as PGPB for inoculation. Seedlings of the four plant species were grown in soil mixed with sand with (N+) or without (N-) N supplementation. The seedlings were also inoculated with Ab-V5 or ZK strains and, as a control, for each N treatment, part of the seedlings was not inoculated with PGPB (Nin). Thus, the effects of N deficiency, inoculation and the interaction between these two factors on N metabolism, photosynthetic and growth variables were tested. Nitrogen deficiency limited photosynthesis in all plant species, besides decreasing the concentration of nitrogen molecules and the activity of enzymes of N metabolism. Growth was not inhibited by the lack of N in only one species: *C. canjerana*. Inoculation with Ab-V5 led to increased growth of *C. pachystachya* seedlings, which was more pronounced under N supplementation (N+). The association with PGPB decreased nitrate reductase activity and increased glutamine synthetase activity in the leaves, among other changes in N metabolism. The growth of *H. popayanensis* and *C. estrellensis* seedlings was not affected by inoculation, but these species were mainly influenced in metabolic variables by inoculation with ZK. Photosynthesis increased with inoculation with ZK in *H. popayanensis* and with Ab-V5 in *C. estrellensis*. In *C. canjerana*, both PGPB promoted seedling growth. The results indicate that N deficiency and inoculation with PGPB influence photosynthesis, growth and N metabolism of seedlings of tree species that occur in the semideciduous seasonal forest. Moreover, the effects of inoculation are influenced by N supplementation during cultivation. Inoculation of seedlings of tree species of the Atlantic biome with PGPB has the potential to stimulate growth and development in optimal N conditions and increase tolerance to soil N deficiency.

Keywords: Atlantic Rainforest, *Azospirillum brasilense*, *Bacillus velezensis*, ecological succession, gas-exchange, photoinhibition.

1. Introdução

O nitrogênio (N) é um nutriente essencial para as plantas que constitui aminoácidos, proteínas, clorofilas, ácidos nucleicos, lipídeos e uma variedade de outros metabólitos (Kusano et al., 2011). Sua falta afeta de maneira geral a fisiologia das plantas, desde o metabolismo ao crescimento (Rubio-Wilhelmi et al., 2011). Um dos principais sintomas da deficiência de N nas plantas é a indução da senescência foliar, que leva à perda de pigmentos, à degradação de proteínas e, conseqüentemente, à inibição da fotossíntese e à redução do crescimento vegetal (Casano et al., 1994). Em alguns casos, danos oxidativos causados pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio causam limitações mais severas sobre esses processos (Rubio-Wilhelmi et al., 2011). Outras conseqüências comuns da falta de N envolvem o aumento da razão de biomassa raiz/parte aérea (Remans et al., 2006) e as diminuições da concentração de moléculas inorgânicas e orgânicas nitrogenadas, do teor total de N da planta e da atividade de enzimas do metabolismo do N (Lemaître et al., 2008; Rubio-Wilhelmi et al., 2011; Calzavara et al., 2018).

A associação com bactérias promotoras do crescimento em plantas (BPCP) tem chamado atenção como alternativa potencial para mitigar o estresse de plantas sob condições adversas, como a falta de nutrientes (Rosegrant et al., 2009). Esses microrganismos são capazes de colonizar a rizosfera e tecidos internos da planta e de promover alterações no metabolismo e crescimento das plantas (Ortíz-Castro et al., 2009). Por isso, são utilizadas e amplamente estudadas para melhorar o rendimento das culturas agrícolas (Herridge et al., 2008).

De forma direta, as BPCP podem prover benefícios para a planta hospedeira por diversos mecanismos, que incluem a fixação de N, o aumento da absorção de nutrientes e a síntese de reguladores de crescimento vegetal e enzimas (Vejan et al., 2016). Além de aumentar o crescimento de plantas, a inoculação com BPCP também pode acelerar a germinação e aumentar a taxa de emergência de plântulas (Souza et al., 2020). Em alguns casos a fixação de N por bactérias associativas não contribui em grande escala para o crescimento vegetal, mas tem sido mostrado que elas possuem potencial para diminuir parcialmente a necessidade de fertilização nitrogenada (Saikia et al. 2007; Bashan e de-Bashan, 2010, Hungria et al., 2010; Oliveira et al., 2017). Os benefícios para as plantas da fixação de N e demais efeitos da associação com BPCP sofrem interferência do teor de N no solo, pois na falta de N, pode haver o favorecimento de associações com estirpes diazotróficas (Oliveira et al., 2003; Carvalho et al., 2014).

As estirpes Ab-V5, de *Azospirillum brasilense*, e ZK, de *Bacillus velezensis*, são BPCP capazes de produzir auxinas (Goes et al., 2012; Fukami et al., 2018a). *Azospirillum*

brasiliense é fixadora de N, ao contrário de *B. velezensis*, que não é diazotrófica (Goes et al., 2012; Pankievicz et al. 2015). Há relatos de efeitos benéficos causados em plantas por ambas as estirpes, mesmo na ausência da fixação de N (Bashan et al., 1989; Hungria et al., 2010; Fukami et al., 2018b; Calzavara et al., 2018).

É notável que a falta de N durante o desenvolvimento vegetal provoca alterações no metabolismo e impõe limitações à fotossíntese e crescimento das plantas (Casano et al., 1994; Remans et al., 2006; Lemaître et al., 2008; Rubio-Wilhelmi et al., 2011; Calzavara et al., 2018). No entanto, a inoculação com BPCP tem potencial para reduzir os efeitos negativos da falta de N (Oliveira et al., 2003; Oliveira et al., 2017; Calzavara et al., 2018). Apesar de haver experimentos com espécies arbóreas em programas de reflorestamento de área desértica (Bashan et al., 2009a, b, 2012) e pesquisa com a inoculação de bactérias em mudas de árvores do Bioma Atlântico (Tiepo et al., 2018), que demonstram a eficiência das BPCP, não há estudos que relacionam os efeitos da falta de N com os da inoculação com BPCP sobre o metabolismo e crescimento de mudas de espécies arbóreas da Mata Atlântica potencialmente importantes para serem utilizadas em programas de regeneração florestal.

Este estudo objetivou verificar os efeitos da inoculação com BPCP sobre a fotossíntese, o crescimento e o metabolismo do N de mudas de espécies arbóreas do bioma Atlântico, cultivadas com ou sem suplementação de N, para responder a três questões: 1- A deficiência de N afeta negativamente a fotossíntese, o crescimento e o metabolismo do N destas mudas?; 2- Os efeitos das BPCP sobre as mudas variam de acordo com suplementação de N durante seu cultivo?; 3- As mudas de espécies arbóreas inoculadas com BPCP são mais tolerantes à deficiência de nitrogênio no solo?

2. Material e métodos

2.1. Material biológico

Foram escolhidas quatro espécies arbóreas utilizadas em programas de reflorestamento desenvolvidos pelo viveiro de mudas do Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas, da Universidade Estadual de Londrina (UEL), que forneceu as sementes. Das espécies escolhidas, duas são intolerantes à sombra – *Cecropia pachystachya* Trécul (Urticaceae) e *Heliocarpus popayanensis* Kunth (Malvaceae) – e duas são tolerantes à sombra – *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze (Lecythidaceae) e *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae).

Duas estirpes de bactérias, fornecidas pelo Núcleo de Pesquisa para o Desenvolvimento e Aplicação de Biofertilizantes da UEL, que apresentam alto potencial

como promotoras do crescimento vegetal, foram escolhidas para este estudo. *Azospirillum brasilense* (estirpe Ab-V5) foi isolada da rizosfera de plantas de milho e está registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil para uso em inoculantes comerciais (Hungria et al., 2010). A estirpe é diazotrófica, produz auxina, tem capacidade de solubilizar amido e proteína, além de ter alta atividade antagonista a fungos patogênicos. *Bacillus velezensis* (estirpe ZK) não apresenta registro de uso em inoculantes comerciais. A estirpe, isolada da rizosfera de plantas de girassol e caracterizada como BPCP por Goes et al. (2012) não é diazotrófica, mas tem capacidade de produzir auxina e sideróforos.

Os inoculantes foram preparados de acordo com Oliveira et al. (2017). Para a preparação do pré-inóculo, as espécies de BPCP foram inicialmente cultivadas em 5 mL de meio *Dygs*, em tubos mantidos sob agitação orbital (180 rpm, a 28 ± 2 °C), por 24 h. Posteriormente, 1 mL do pré-inóculo foi adicionado a 50 mL de meio de cultura *Form15*, em frascos que foram mantidos sob agitação orbital (180 rpm, a 28 ± 2 °C) por 48 h. Após este período de crescimento, a densidade das culturas foi normalizada para 1×10^9 células mL⁻¹, pela diluição em meio de cultura *Form15* esterilizado. Uma última diluição foi feita, em água destilada, para reduzir a densidade das bactérias para 1×10^6 células mL⁻¹. Essa diluição, que resultou no inoculante final, foi feita imediatamente antes da adição das BPCP ao substrato de cultivo das plantas.

2.2. Tratamentos

As sementes foram colocadas para germinar em bandejas (7,5 L de volume) com areia esterilizada, que foi umedecida com 2,5 L do inoculante final (Ab-V5 ou ZK), ou com água (não inoculadas [Nin]). Após a germinação e a completa expansão do primeiro eofilo, as mudas foram transferidas para sacos plásticos (1800 mL de volume) preenchidos com solo misturado com areia, na proporção de 1:1 (v/v). O teor de nutrientes do substrato foi dosado e foi feita suplementação de fósforo antes do início do experimento. Após a transferência das mudas, 50 mL do inoculante final (Ab-V5 ou ZK), ou água (controle), foram adicionados ao substrato, em cada saco de cultivo.

Após uma semana de aclimação das mudas, iniciaram-se os tratamentos de N. Metade das mudas foi cultivada em substrato com suplementação de N (50 mL de NH₄NO₃ 5mM em cada saco de cultivo) a cada 15 dias, constituindo o tratamento N-suplementado (N+). A outra metade foi cultivada em substrato sem suplementação de N, constituindo o tratamento N-deficiente (N-). Dessa forma, foram distinguidos seis tratamentos: i) cultivo com N, sem inoculação (N+/Nin); ii) cultivo com N e inoculação com Ab-V5 (N+/Ab-V5); iii) cultivo com N e inoculação com ZK (N+/ZK); iv) cultivo sem N, sem inoculação (N-/Nin); v)

cultivo sem N e inoculação com Ab-V5 (N-/Ab-V5); e vi) cultivo sem N e inoculação com ZK (N-/ZK). As plantas foram mantidas em casa de vegetação, sob condições naturais de umidade e temperatura e sob 45 % da intensidade luminosa total. A intensidade luminosa máxima em dias ensolarados foi de cerca de $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Após 90 dias do início dos tratamentos com N foram feitas as análises não destrutivas e a coleta do material vegetal.

2.3. Análises fotossintéticas

Analisou-se a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) em folhas intactas por meio de um fluorômetro *OS1p* (*Opti-Sciences*, Hudson, EUA), conforme descrito por Shimizu et al. (2006). As análises foram realizadas antes do amanhecer (F_v/F_m M) e ao meio dia (F_v/F_m MD), após 20 minutos de aclimação ao escuro, condição obtida com o uso de cliques foliares.

Análises de trocas gasosas foram realizadas ao término do experimento, entre 8 e 10 h, utilizando-se um analisador portátil de gás por infravermelho (Irga), modelo *LICOR 6400 XT* (*LiCor*, Lincoln, EUA), conectado a uma câmara de 6 cm^2 com fonte de luz artificial. Sob intensidade luminosa saturante ($1900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), foram medidas a assimilação líquida de CO_2 (A_{max}), a condutância estomática (g_s), a eficiência no uso da água ($EUA = A_{\text{max}}/\text{taxa de transpiração}$) e a concentração intercelular de CO_2 (C_i).

2.4. Análises de crescimento

Para avaliar o crescimento das mudas, foram medidas a área foliar e a massa seca total e calculada a razão de massa seca raiz/parte aérea, ao término do experimento. A área foliar foi obtida com um medidor *Li-3000C* (*LiCor*, Lincoln, EUA) e, para as análises de massa seca, as partes vegetativas foram secas a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 72 h e, depois, pesadas separadamente.

2.5. Análises bioquímicas (metabolismo do N)

Porções finas das ramificações da raiz primária e as últimas folhas desenvolvidas, completamente expandidas, foram coletadas para análises de atividades enzimáticas e de metabólitos. Porções de folhas também foram coletadas para análise dos teores de clorofilas e de nitrogênio total. Para as análises espectrofotométricas, as leituras das absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro *Shimadzu UV-1203* (*Shimadzu Co.*, Quioto, Japão) ou em leitor de microplacas *SpectraMax Plus 384* (*Molecular Devices*, Sunnyvale, EUA).

Para extrair os pigmentos, dosar o teor total de clorofilas (C_{tot}) e calcular a razão do teor total de clorofilas/carotenoides (C_{tot}/Car), as porções de folhas coletadas em N_2 líquido foram maceradas em tampão de acetona 80% (pH 7,8). Depois de extraídos, os teores de C_{tot} e Car foram determinados utilizando os coeficientes de extinção e equações de Lichtenthaler e Wellburn (1983).

As porções de raízes e folhas foram coletadas em N_2 líquido e armazenadas a -80 °C. Para extração dos metabólitos, as amostras foram maceradas em N_2 líquido até atingirem consistência de pó. Compostos de baixo peso molecular (NO_3^- , NH_4^+ e aminoácidos livres) foram extraídos com MCW (metanol/clorofórmio/água, 12/5/3, v/v/v), de acordo com Oliveira e Sodek (2013). Proteínas foram extraídas com NaOH 0,1 M, a partir do precipitado resultante da extração com MCW (Oliveira e Sodek, 2013).

Os metabólitos extraídos de raízes e folhas tiveram suas concentrações determinadas pelos seguintes métodos. A concentração de NO_3^- foi determinada após sua redução por VCl_3 (0,4 % em HCl 0,5 M) a 37° C por 30 minutos e subsequente dosagem do NO_2^- formado pela reação com o reagente de Griess, com leitura a 540 nm (Miranda et al., 2001). O teor de NH_4^+ foi determinado pelo método fenol-hipoclorito (McCullough, 1967), com modificações. Para isso, a amostra foi misturada com o reagente 1 (fenol 1 % e nitroprussiato de sódio 0,2 mM) e, subsequentemente, com o reagente 2 (NaOH 125 mM, Na_2HPO_4 150 mM e NaClO 0,12 %). Após reagir por 35 minutos a 37 °C, a absorbância foi lida a 625 nm. A concentração de aminoácidos livres foi quantificada pelo ensaio com ninhidrina (Yemm e Cocking, 1995). Para isso, a amostra, tampão citrato 0,2 mM (pH 5), ninhidrina (5 % em metilcelusolve) e KCN (10 mM em metilcelusolve) foram misturados e mantidos a 100 °C por 20 minutos. Depois, a mistura foi diluída em etanol 60 % e a absorbância foi lida a 570 nm. O teor de proteínas foi determinado pela reação do extrato com o reagente *Coomassie Brilliant Blue G-250* (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, EUA) e posterior leitura da absorbância a 595 nm (Bradford, 1976).

Segmentos de folhas também foram coletados, secos em estufa, triturados e submetidos à digestão sulfúrica. Posteriormente, foi feita a destilação com ácido cianídrico para determinar o teor total de N nas amostras foliares, pelo método de Kjeldahl (Embrapa, 2011).

A atividade da enzima nitrato redutase (ANR) na raiz e folhas foi determinada *in vivo*, imediatamente após a coleta de material vegetal fresco, com base no método de extração proposto por Stewart et al. (1986). Amostras de raízes e folhas foram transferidas para o meio de reação (K_2HPO_4 0,05 M, pH 7,5; propanol 1 % e KNO_3 0,05 M), submetidas à baixa pressão para infiltração do meio nos tecidos e, subsequentemente, mantidas no escuro por

40 minutos à temperatura ambiente. Uma alíquota foi coletada para dosagem de nitrito (NO_2^-), resultante da ANR, pela reação com o reagente de Griess e leitura da absorbância a 540 nm (Hageman e Reed, 1980).

Raízes e folhas coletadas em N_2 líquido também foram utilizadas para análise da atividade da enzima glutamina sintetase (AGS). Os extratos foram obtidos pela maceração do material vegetal a 4 °C em meio contendo tampão HEPES (pH 7,5), 2-mercaptoetanol 10 mM, polivinilpirrolidona 2%, EDTA 1 mM e MgCl_2 5 mM. O extrato foi centrifugado e a AGS foi determinada pelo método de biossíntese de Fe- γ -glutamil hidroxamato (GGH), de acordo com Ratajczak et al. (1981). O extrato foi colocado para reagir em meio com tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,5), 2-mercaptoetanol 10 mM, MgSO_4 40 mM, hidroxilamina 10 mM e ATP 10 mM. A mistura foi incubada a 30 °C e, após 20 minutos, a reação foi interrompida pela adição de solução contendo FeCl_3 0,37 M, HCl 0,37 M e TCA 0,2 M e foi feita leitura da absorbância a 540 nm.

2.6. Análises estatísticas

Nos experimentos, para cada espécie, foi adotado o delineamento inteiramente casualizado. Cinco réplicas biológicas foram utilizadas para as análises de F_v/F_m e bioquímicas, enquanto dez réplicas foram utilizadas para as análises de trocas gasosas (A_{max} e g_s) e de crescimento. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) fatorial e, quando houve efeito da interação (nitrogênio \times inoculação), as médias foram comparadas pelo teste de *Tukey HSD* ($P < 0,05$) dentro de cada nível dos fatores nitrogênio (N+ e N-) e inoculação (Nin, Ab-V5 e ZK). Em caso de interação não significativa, foram testados os efeitos, separadamente, do nitrogênio (teste *F*) e da inoculação (*Tukey HSD*, $P < 0,05$). As análises estatísticas foram feitas no programa *Statistica*, versão 12.0 (StatSoft, Tulsa, EUA).

3. Resultados

3.1. Análises fotossintéticas

As análises de F_v/F_m M, realizadas antes do amanhecer, não indicaram diferenças entre os tratamentos em nenhuma espécie vegetal (Fig. S1-S4). Porém, a F_v/F_m MD, medida ao meio dia, foi influenciada pela interação N \times inoculação. Em *C. estrellensis*, a deficiência de N (N-) provocou diminuição da F_v/F_m MD, exceto nas mudas inoculadas com ZK, que preveniram este efeito (Fig. 1 A). Em *C. canjerana*, a deficiência de N levou à redução da F_v/F_m MD apenas em mudas Nin, sendo que a inoculação com ambas as estirpes de BPCP manteve a F_v/F_m MD das mudas similar às das mudas N+ (Fig. 1 B).

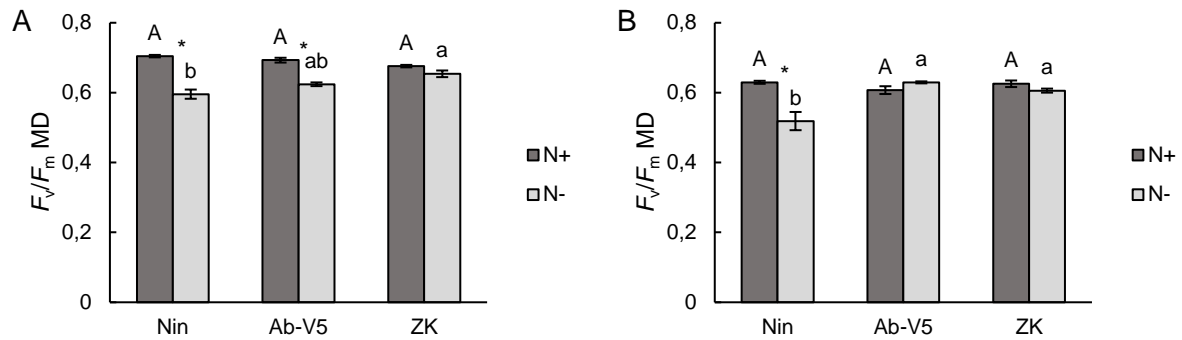


Fig. 1. Eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II, ao meio dia (F_v/F_m MD), de mudas de *Cariniana estrellensis* (A) e *Cabralea canjerana* (B) cultivadas com (N+) ou sem (N-) adição de N, não inoculadas com bactérias (Nin), ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. As barras são médias \pm erros-padrão. Nas colunas cinzentas, médias com letras maiúsculas (N+) ou minúsculas (N-) iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação. Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos de N dentro de cada tratamento de inoculação (Tukey HSD; $P < 0,05$; $n = 5$).

A deficiência de N levou à diminuição da A_{max} em todas as espécies (Fig. 2 A, D, H e L). Independentemente do tratamento de N, em *C. pachystachya*, a inoculação com ZK provocou diminuição da A_{max} , em relação a plantas inoculadas com Ab-V5. A inoculação com ZK em *H. popayanensis*, e com Ab-V5 em *C. estrellensis*, aumentou a A_{max} de suas mudas, em relação a plantas Nin. A g_s foi influenciada apenas pelo N: em *C. pachystachya* e *C. canjerana*, a deficiência de N diminuiu a g_s , mas o contrário foi observado nas mudas de *H. popayanensis* e *C. estrellensis* (Fig. 2 B, E, I e M). A EUA foi menor em mudas submetidas à falta de N em *C. pachystachya*, *H. popayanensis* e *C. estrellensis*, em relação às mudas suplementadas com N (Fig. 2 C, F e J). A insuficiência de N também levou a maiores C_i em mudas de *H. popayanensis* e *C. estrellensis*, em comparação com mudas N+ (Fig. 2 G e K).

3.2. Análises de crescimento

A falta de N provocou redução da área foliar e da massa seca total (Fig. 3 A e B) e aumento da razão de massa seca raiz/parte aérea (Fig. 3 C) em mudas de *C. pachystachya*. Em mudas N+, a estirpe Ab-V5 aumentou a área foliar e a massa seca total (70,4%), em relação a mudas Nin (Fig. 3 A e B). Em mudas N-, a inoculação com Ab-V5 provocou aumento da massa seca total (35,2%), em relação a mudas Nin, sem influência sobre a área foliar (Fig. 3 B).

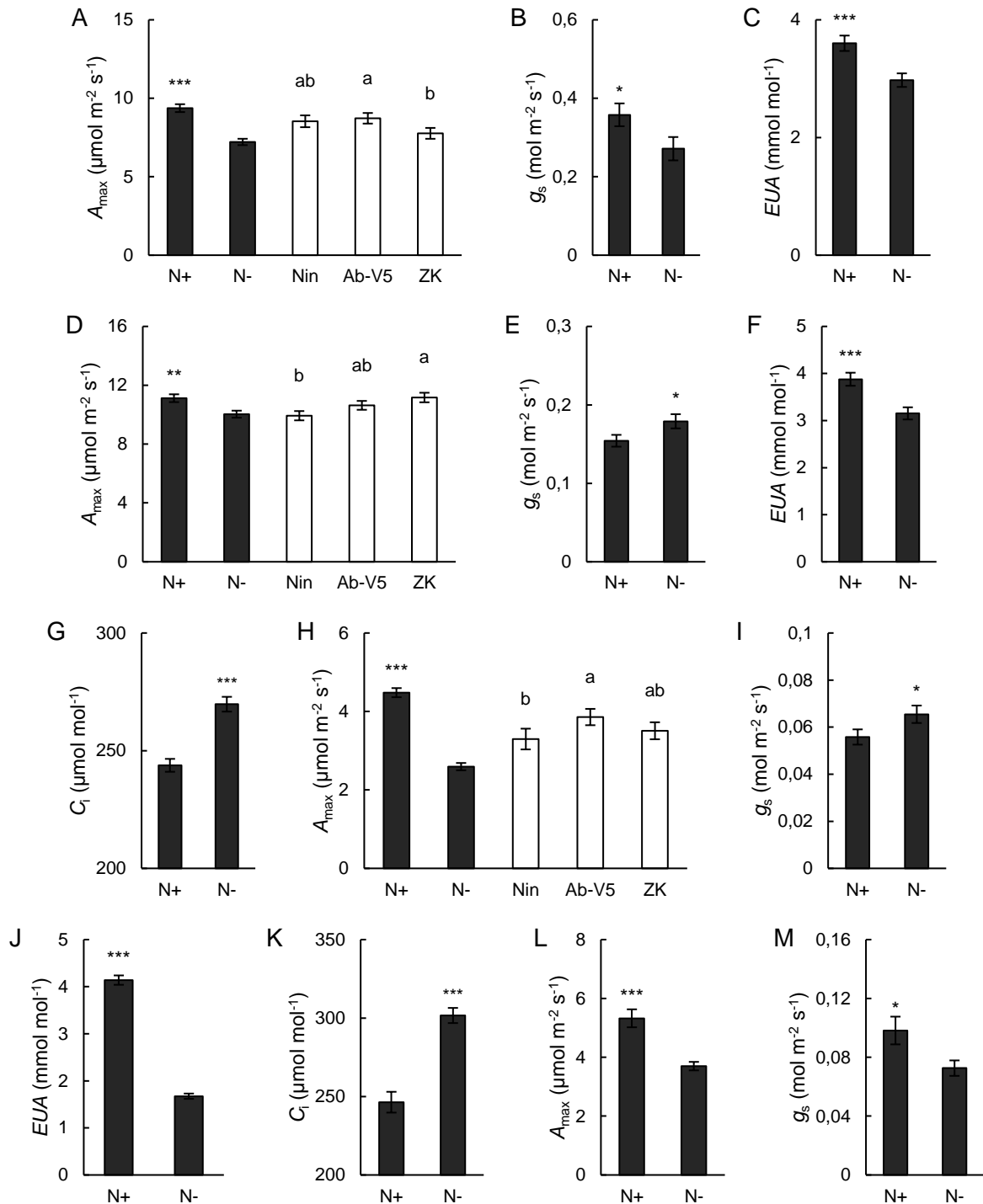


Fig. 2. Assimilação líquida de CO_2 (A_{max}), condutância estomática (g_s), eficiência no uso da água (EUA) e concentração intercelular de CO_2 (C_i) de mudas de *Cecropia pachystachya* (A-C), *Heliocarpus popayanensis* (E-G), *Cariniana estrellensis* (H-K) e *Cabralea canjerana* (L e M) cultivadas com (N+) ou sem (N-) adição de N, não inoculadas com bactérias (Nin), ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. As barras são médias \pm erros-padrão. Nas colunas pretas, asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos de N, de acordo com a ANOVA (teste F; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; $n = 30$). Nas colunas brancas, médias com letras iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação (Tukey HSD; $P < 0,05$; $n = 20$).

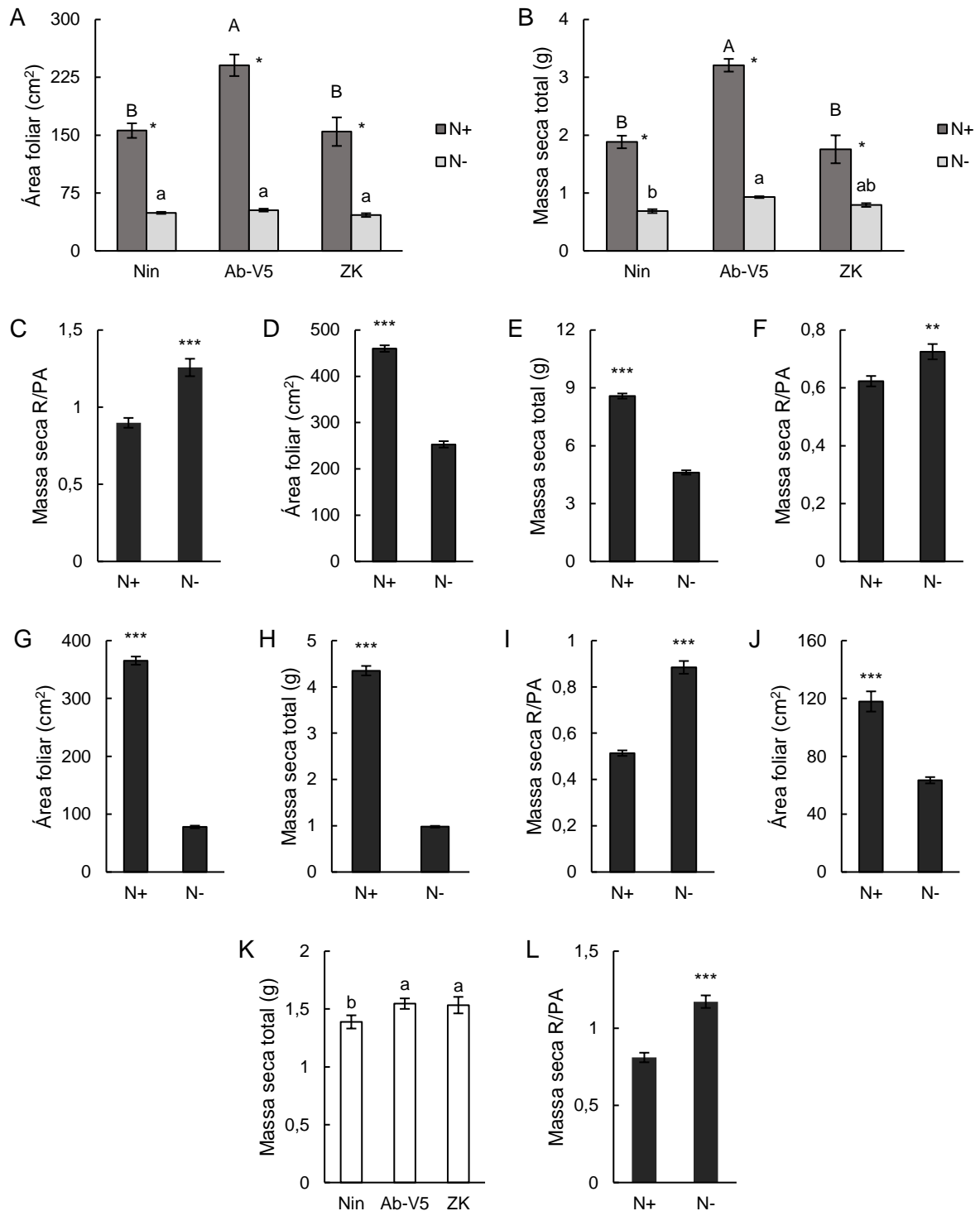


Fig. 3. Área foliar, massa seca total e razão de massa seca raiz/parte aérea (R/PA) de mudas de *Cecropia pachystachya* (A-C), *Heliocarpus popayanensis* (D-F), *Cariniana estrellensis* (G-I) e *Cabralea canjerana* (J-L) cultivadas com (N+) ou sem (N-) adição de N, não inoculadas com bactérias (Nin), ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. As barras são médias \pm erros-padrão. Nas colunas pretas, asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos de N, de acordo com a ANOVA (teste F; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; $n = 30$). Nas colunas brancas, médias com letras iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação (Tukey HSD; $P < 0,05$; $n = 20$). Nas colunas cinzentas, médias com letras maiúsculas (N+) ou minúsculas (N-) iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação, e asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos de N dentro de cada tratamento de inoculação (Tukey HSD; $P < 0,05$; $n = 10$).

Em *H. popayanensis* (Fig. 3 D-F) e *C. estrellensis* (Fig. 3 G-I), a deficiência de N levou à diminuição da área foliar e massa seca total de suas mudas e ao aumento da razão de massa seca raiz/parte aérea.

A menor disponibilidade de N provocou diminuição da área foliar (Fig. 3 J) em mudas de *C. canjerana*, mas não influenciou sua massa seca total. A inoculação com Ab-V5 e ZK promoveu o crescimento de suas mudas, aumentando a massa seca total, em comparação com mudas Nin (Fig. 3 K). A razão de massa seca raiz/parte aérea aumentou em plantas de *C. canjerana* sob deficiência de N, em relação às plantas N+ (Fig. 3 L).

3.3. Análises bioquímicas

Em mudas de *C. pachystachya* a deficiência de N causou diminuição da razão C_{tot}/C_{ar} e das concentrações de aminoácidos na raiz e folhas e de proteínas somente nas folhas (Tabela 1). Independentemente do tratamento de N, a inoculação com Ab-V5 levou ao aumento da concentração de NH_4^+ e da AGS nas folhas e à diminuição da ANR foliar, em relação a mudas Nin (Tabela 2). A inoculação com ZK causou aumento das concentrações de aminoácidos e proteínas na raiz e diminuição da concentração de aminoácidos nas folhas, em comparação com mudas Nin. Em mudas N+, a inoculação com ZK aumentou as concentrações de C_{tot} e de NO_3^- na raiz e folhas, em relação a mudas Nin ou inoculadas com Ab-V5 (Tabela 3). Também dentro do tratamento N+, a inoculação com Ab-V5 diminuiu o N_{tot} e aumentou a ANR radicial das mudas, em comparação com plantas Nin. Sob deficiência de N (N-), a inoculação com ZK aumentou a concentração de NH_4^+ na raiz, em relação a mudas Nin ou Ab-V5.

A falta de N, em mudas de *H. popayanensis*, aumentou a concentração de NH_4^+ , mas diminuiu as concentrações de C_{tot} , aminoácidos, proteínas e ANR nas folhas e de AGS na raiz (Tabela 1). A inoculação com Ab-V5 aumentou a concentração de NO_3^- na raiz, em comparação com mudas Nin, independentemente do tratamento de N (Tabela 2). A estirpe ZK promoveu aumento nas concentrações de NO_3^- nas folhas e de NH_4^+ na raiz de mudas de *H. popayanensis*, em relação a plantas Nin. Além disso, a inoculação com ZK aumentou as concentrações de C_{tot} e de proteínas na raiz das mudas desta espécie, em relação às mudas Nin e as inoculadas com Ab-V5 (Tabela 2). Não houve interação N x inoculação sobre nenhuma variável bioquímica analisada em *H. popayanensis*.

Tabela 1. Efeito do N sobre variáveis bioquímicas de mudas de *Cecropia pachystachya*, *Heliocarpus popayanensis*, *Cariniana estrellensis* e *Cabralea canjerana* cultivadas com (N+) ou sem (N-) adição de N. Os valores são médias \pm erros-padrão. Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos de N, de acordo com a ANOVA (teste F; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; $n = 15$). AGS – atividade da glutamina sintetase; ANR – atividade da nitrato redutase; C_{tot} – teor total de clorofilas; C_{tot}/Car – razão do teor total de clorofilas/carotenoides; N_{tot} – teor total de nitrogênio.

Variável	Nitrogênio	
	N+	N-
<i>Cecropia pachystachya</i>		
$[C_{tot}]/[Car]$ (mg mg ⁻¹)	6,76 \pm 0,116 ***	4,83 \pm 0,158
[aminoácidos] raiz (μ mol g ⁻¹)	1,24 \pm 0,182 ***	0,823 \pm 0,115
[aminoácidos] folhas (μ mol g ⁻¹)	4,51 \pm 0,270 ***	2,62 \pm 0,413
[proteínas] folhas (mg g ⁻¹)	3,80 \pm 0,181 ***	2,71 \pm 0,122
<i>Heliocarpus popayanensis</i>		
$[C_{tot}]$ (mg g ⁻¹)	2,05 \pm 0,061 ***	1,46 \pm 0,052
$[NH_4^+]$ folhas (nmol g ⁻¹)	1175 \pm 40,5	1346 \pm 46,2 **
[aminoácidos] folhas (μ mol g ⁻¹)	3,32 \pm 0,215 ***	2,25 \pm 0,099
[proteínas] folhas (mg g ⁻¹)	5,17 \pm 0,229 ***	3,34 \pm 0,209
ANR folhas (nmol NO ₂ ⁻ min ⁻¹ g ⁻¹)	17,5 \pm 1,73 **	11,5 \pm 1,09
AGS raiz (nmol GGH min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)	55,6 \pm 2,44*	47,0 \pm 3,80
<i>Cariniana estrellensis</i>		
$[C_{tot}]$ (mg g ⁻¹)	1,66 \pm 0,036 ***	0,971 \pm 0,034
$[C_{tot}]/[Car]$ (mg mg ⁻¹)	5,09 \pm 0,093 ***	3,38 \pm 0,092
$[NO_3^-]$ raiz (nmol g ⁻¹)	6004 \pm 781 ***	141 \pm 38,7
$[NO_3^-]$ folhas (nmol g ⁻¹)	416 \pm 88,6 ***	44,2 \pm 6,36
[aminoácidos] raiz (μ mol g ⁻¹)	5,95 \pm 0,411 ***	1,87 \pm 0,159
[aminoácidos] folhas (μ mol g ⁻¹)	3,74 \pm 0,116 ***	1,51 \pm 0,107
[proteínas] folhas (mg g ⁻¹)	1,69 \pm 0,076 ***	0,779 \pm 0,038
$[N_{tot}]$ folhas (g kg ⁻¹)	14,8 \pm 0,671 ***	8,4 \pm 0,503
ANR folhas (nmol NO ₂ ⁻ min ⁻¹ g ⁻¹)	10,4 \pm 0,891 ***	3,87 \pm 0,278
AGS folhas (nmol GGH min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)	103 \pm 13,3 *	71,6 \pm 7,21
<i>Cabralea canjerana</i>		
$[C_{tot}]/[Car]$ (mg mg ⁻¹)	4,54 \pm 0,134 ***	3,67 \pm 0,051
$[NO_3^-]$ raiz (nmol g ⁻¹)	43276 \pm 2351 ***	8738 \pm 2505
$[NO_3^-]$ folhas (nmol g ⁻¹)	6838 \pm 779 ***	41,7 \pm 19,6
$[NH_4^+]$ raiz (nmol g ⁻¹)	4403 \pm 230 **	3103 \pm 270
[aminoácidos] raiz (μ mol g ⁻¹)	20,0 \pm 1,36 *	13,6 \pm 2,75
[aminoácidos] folhas (μ mol g ⁻¹)	29,5 \pm 1,94 ***	5,93 \pm 0,875
[proteínas] raiz (mg g ⁻¹)	2,96 \pm 0,293 *	2,31 \pm 0,184
[proteínas] folhas (mg g ⁻¹)	14,3 \pm 0,460 ***	9,6 \pm 0,378
$[N_{tot}]$ folhas (g kg ⁻¹)	39,3 \pm 1,45 ***	18,2 \pm 1,87
ANR raiz (nmol NO ₂ ⁻ min ⁻¹ g ⁻¹)	14,0 \pm 1,66 *	10,5 \pm 1,00
ANR folhas (nmol NO ₂ ⁻ min ⁻¹ g ⁻¹)	11,8 \pm 1,26 *	8,9 \pm 0,712

Mudas de *C. estrellensis* sob deficiência de N apresentaram menores concentrações de C_{tot} , de NO_3^- e aminoácidos na raiz e folhas e de proteínas, N_{tot} , razão C_{tot}/Car , ANR e

AGS nas folhas, em relação a mudas supridas com N (Tabela 1). Independentemente do N, a inoculação com Ab-V5 e ZK promoveram aumentos das concentrações de NO_3^- e aminoácidos na raiz e da ANR foliar nas mudas de *C. estrellensis*, em comparação ao tratamento Nin (Tabela 2). A inoculação com ZK também aumentou as concentrações de C_{tot} , NO_3^- , aminoácidos, proteínas e N_{tot} nas folhas das mudas desta espécie, em relação a mudas Nin. Quanto à interação N \times inoculação, em plantas N+, as mudas apresentaram diminuições do teor de NH_4^+ foliar e da ANR na raiz quando inoculadas com as BPCP (Tabela 3). O teor de proteínas na raiz aumentou com a inoculação de Ab-V5 em mudas N+ e com a inoculação de ZK em mudas N- em relação a mudas Nin. Sob deficiência de N, a AGS foi maior em mudas inoculadas com ZK em relação a mudas Nin ou Ab-V5.

Tabela 2. Variáveis bioquímicas de mudas de *Cecropia pachystachya*, *Heliocarpus popayanensis* e *Cariniana estrellensis* não inoculadas com bactérias (Nin), ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. Os valores são médias \pm erros-padrão. Médias com letras iguais nas linhas não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação (*Tukey HSD*; $P < 0,05$; $n = 10$). AGS – atividade da glutamina sintetase; ANR – atividade da nitrato redutase; C_{tot} – teor total de clorofilas; N_{tot} – teor total de nitrogênio.

Variável	Inoculação		
	Nin	Ab-V5	ZK
<i>Cecropia pachystachya</i>			
[NH_4^+] folhas (nmol g^{-1})	355 \pm 11,3 b	469 \pm 18,0 a	399 \pm 21,6 b
[aminoácidos] raiz ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	0,672 \pm 0,071 b	0,700 \pm 0,085 b	1,72 \pm 0,174 a
[aminoácidos] folhas ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	4,46 \pm 0,519 a	3,38 \pm 0,473 ab	2,85 \pm 0,504 b
[proteínas] raiz (mg g^{-1})	0,691 \pm 0,051 b	0,834 \pm 0,051 ab	0,904 \pm 0,068 a
ANR folhas ($\text{nmol NO}_2^- \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$)	19,9 \pm 2,41 a	9,51 \pm 0,728 b	18,6 \pm 1,67 a
AGS folhas ($\text{nmol GGH min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$)	75,0 \pm 11,9 b	280 \pm 34,1 a	106 \pm 25,8 b
<i>Heliocarpus popayanensis</i>			
[C_{tot}] (mg g^{-1})	1,68 \pm 0,087 b	1,70 \pm 0,132 b	1,91 \pm 0,130 a
[NO_3^-] raiz (nmol g^{-1})	28,2 \pm 6,45 b	52,8 \pm 7,69 a	39,2 \pm 9,11 ab
[NO_3^-] folhas (nmol g^{-1})	124 \pm 12,8 b	192 \pm 24,3 ab	202 \pm 21,5 a
[NH_4^+] raiz (nmol g^{-1})	512 \pm 14,9 b	545 \pm 23,0 ab	628 \pm 34,9 a
[proteínas] raiz (mg g^{-1})	0,613 \pm 0,036 b	0,608 \pm 0,041 b	0,745 \pm 0,027 a
<i>Cariniana estrellensis</i>			
[C_{tot}] (mg g^{-1})	1,25 \pm 0,132 b	1,28 \pm 0,113 ab	1,41 \pm 0,115 a
[NO_3^-] raiz (nmol g^{-1})	1902 \pm 608 c	2709 \pm 1107 b	3537 \pm 1157 a
[NO_3^-] folhas (nmol g^{-1})	190 \pm 56,7 b	149 \pm 57,7 b	351 \pm 144 a
[aminoácidos] raiz ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	3,07 \pm 0,649 b	4,24 \pm 0,907 a	4,43 \pm 0,692 a
[aminoácidos] folhas ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	2,37 \pm 0,437 b	2,61 \pm 0,397 ab	2,90 \pm 0,334 a
[proteínas] folhas (mg g^{-1})	1,10 \pm 0,126 b	1,28 \pm 0,197 ab	1,32 \pm 0,166 a
[N_{tot}] folhas (g kg^{-1})	10,7 \pm 1,43 b	11,5 \pm 1,15 ab	13,0 \pm 1,20 a
ANR folhas ($\text{nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$)	5,34 \pm 1,14 b	8,30 \pm 1,47 a	7,72 \pm 1,24 a
<i>Cabralea canjerana</i>			
[NH_4^+] folhas (nmol g^{-1})	468 \pm 38,6 b	659 \pm 56,2 a	685 \pm 68,0 a

Em *C. canjerana* a deficiência de N diminuiu as concentrações de NO_3^- , aminoácidos e proteínas na raiz e folhas e de NH_4^+ na raiz, além de reduzir a razão $C_{\text{tot}}/\text{Car}$, o N_{tot} e a ANR na raiz e folhas (Tabela 1). Mudanças inoculadas com ambas as BPCP apresentaram aumento da concentração de NH_4^+ nas folhas, independentemente do tratamento de N (Tabela 2). Entre as mudas submetidas à deficiência de N, as inoculadas com ZK apresentaram maior C_{tot} , em relação a plantas Nin ou inoculadas com Ab-V5 (Tabela 3).

Tabela 3. Variáveis bioquímicas de mudas de *Cecropia pachystachya*, *Cariniana estrellensis* e *Cabralea canjerana* cultivadas com (N+) ou sem (N-) adição de N, não inoculadas com bactérias (Nin), ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. Os valores são médias \pm erros-padrão. Para cada variável, médias com letras minúsculas iguais nas colunas não diferem significativamente entre os tratamentos de N; e médias com letras maiúsculas iguais nas linhas não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação (*Tukey HSD*; $P < 0,05$; $n = 5$). AGS – atividade da glutamina sintetase; ANR – atividade da nitrato redutase; C_{tot} – teor total de clorofilas; N_{tot} – teor total de nitrogênio.

Variável	Nitrogênio	Inoculação		
		Nin	Ab-V5	ZK
<i>Cecropia pachystachya</i>				
[C_{tot}] (mg g^{-1})	N+	2,25 \pm 0,051 Ba	2,03 \pm 0,059 Ba	2,71 \pm 0,218 Aa
	N-	1,10 \pm 0,037 Ab	1,07 \pm 0,127 Ab	0,940 \pm 0,097 Ab
[NO_3^-] raiz (nmol g^{-1})	N+	6962 \pm 1176 Ba	4809 \pm 1447 Ba	11910 \pm 1785 Aa
	N-	900 \pm 339 Aa	42,7 \pm 17,6 Aa	1397 \pm 424 Ab
[NO_3^-] folhas (nmol g^{-1})	N+	2586 \pm 116 Ba	652 \pm 14,9 Ba	15290 \pm 3300 Aa
	N-	72,9 \pm 4,78 Aa	119 \pm 39,1 Aa	45,1 \pm 10,9 Ab
[NH_4^+] raiz (nmol g^{-1})	N+	129 \pm 12,9 Aa	102 \pm 16,9 Aa	255 \pm 24,5 Ab
	N-	116 \pm 11,5 Ba	89,9 \pm 4,79 Ba	527 \pm 81,6 Aa
[N_{tot}] folhas (g kg^{-1})	N+	24,6 \pm 0,625 Aa	19,0 \pm 0,769 Ba	25,5 \pm 0,717 Aa
	N-	10,2 \pm 0,066 Ab	9,6 \pm 1,01 Ab	8,7 \pm 0,994 Ab
ANR raiz ($\text{nmol NO}_2^- \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$)	N+	2,90 \pm 0,195 Ba	4,16 \pm 0,331 Aa	3,19 \pm 0,191 Ba
	N-	0,917 \pm 0,066 Ab	1,06 \pm 0,139 Ab	1,11 \pm 0,079 Ab
<i>Cariniana estrellensis</i>				
[NH_4^+] folhas (nmol g^{-1})	N+	1046 \pm 168 Aa	745 \pm 27,5 Ba	765 \pm 96,8 Ba
	N-	646 \pm 31,9 Ab	818 \pm 67,2 Aa	901 \pm 60,9 Aa
[proteínas] raiz (mg g^{-1})	N+	0,838 \pm 0,046 Ba	1,16 \pm 0,076 Aa	0,966 \pm 0,055 Aba
	N-	0,669 \pm 0,061 Ba	0,739 \pm 0,012 ABb	0,951 \pm 0,016 Aa
ANR raiz ($\text{nmol NO}_2^- \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$)	N+	2,25 \pm 0,153 Aa	0,673 \pm 0,059 Ba	0,515 \pm 0,067 Ba
	N-	1,20 \pm 0,138 Ab	1,13 \pm 0,118 Aa	0,918 \pm 0,090 Aa
AGS raiz ($\text{nmol GGH min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$)	N+	15,6 \pm 1,07 Aa	20,1 \pm 1,66 Aa	14,7 \pm 1,74 Ab
	N-	20,5 \pm 3,43 Ba	20,0 \pm 1,11 Ba	27,3 \pm 2,47 Aa
<i>Cabralea canjerana</i>				
[C_{tot}] (mg g^{-1})	N+	2,46 \pm 0,152 Aa	2,59 \pm 0,083 Aa	2,17 \pm 0,036 Aa
	N-	1,22 \pm 0,061 Bb	1,33 \pm 0,067 Bb	1,79 \pm 0,134 Aa

4. Discussão

As análises da F_v/F_m M (Tabelas S1-S4), realizadas antes do amanhecer, indicam que a deficiência de N não provocou fotoinibição crônica nas mudas de nenhuma das espécies estudadas. No entanto, a falta de N reduziu a A_{max} em todas elas. Esses resultados demonstram que a queda da A_{max} não foi causada por danos oxidativos decorrentes do estresse pela falta de N. A diminuição da taxa fotossintética também não pode ser atribuída à limitação estomática e à insuficiência de CO_2 , já que nas espécies em que a deficiência de N levou à queda da g_s (*C. pachystachya* e *C. canjerana*) a C_i não foi alterada, e nas espécies em que a falta de N provocou aumento da g_s (*H. popayanensis* e *C. estrellensis*), houve aumento concomitante da C_i , em comparação com o tratamento N+. A incapacidade de *H. popayanensis* e *C. estrellensis* de controlar a g_s e, conseqüentemente, a taxa de transpiração, sob baixa assimilação de CO_2 (deficiência de N) causou diminuição da eficiência no uso da água (*EUA*), especialmente em *C. estrellensis*. A perda do controle da transpiração e a conseqüente diminuição da *EUA* foi uma das mudanças que levaram à inibição do crescimento em plantas de girassol submetidas à privação de N (Ciompi et al., 1996).

A limitação da fotossíntese sob deficiência de N pode estar relacionada à diminuição da concentração de Rubisco e de outras enzimas envolvidas no ciclo C_3 e, conseqüentemente, da eficiência de carboxilação (Terashima e Evans, 1988; Huang et al., 2004). O teor total de N foliar, forte indicativo da concentração de Rubisco (Evans, 1989), diminuiu em mudas submetidas à deficiência de N, exceto em *H. popayanensis*. Outro fator que pode estar envolvido na diminuição da A_{max} das mudas sob privação de N é a regulação negativa da fotossíntese pelo acúmulo de carboidratos. Como a falta de N limita a atividade dreno em toda a planta, devido ao baixo crescimento, carboidratos acumulam na parte aérea e na raiz, inibindo a fotossíntese (Paul e Foyer, 2001; Adams et al., 2013). De fato, a diminuição do crescimento (massa seca total) foi verificada nas plantas submetidas à deficiência de N, em relação ao tratamento N+, com exceção de *C. canjerana*.

Outras conseqüências da falta de N, verificadas nas quatro espécies, foram o aumento da razão de massa seca raiz/parte aérea e a diminuição da área foliar total. O primeiro efeito é frequentemente observado quando nutrientes minerais, como íons nitrogenados, são escassos, provocando uma maior alocação de biomassa e crescimento do sistema radicial, em relação à parte aérea (Scheible et al., 2004; Remans et al., 2006). Já a redução da área foliar pode ser conseqüência da senescência foliar induzida pela falta de N, que leva à perda de pigmentos e proteínas (incluindo enzimas fotossintéticas) e à diminuição da fotossíntese e do crescimento (Casano et al., 1994; Rubio-Wilhelmi et al.,

2011). O teor de proteínas foliar diminuiu em todas as espécies submetidas à deficiência de N, reforçando a hipótese de que a diminuição da taxa fotossintética se deve, pelo menos parcialmente, à menor concentração de Rubisco nas folhas das plantas N-, enzima que representa aproximadamente 50% das proteínas foliares (Evans et al., 1989). Huang et al. (2004) demonstraram que a deficiência de N induz a senescência foliar em plantas de arroz, resultando na diminuição da concentração de proteínas foliares e na degradação de pigmentos fotossintéticos.

A concentração total de clorofilas sofreu redução apenas em *H. popayanensis* e *C. estrellensis*, indicando que, nestas espécies, a diminuição da absorção de luz deve representar um mecanismo importante que ajuda a evitar danos oxidativos sob condições adversas de crescimento. Outro mecanismo envolvido na diminuição da fotoinibição em condições ambientais estressantes é o investimento em maiores proporções de carotenoides (que abrangem xantofilas capazes de dissipar o excesso de energia na forma de calor) em relação às clorofilas. Menor razão C_{tot}/Car , verificada em *C. pachystachya*, *C. estrellensis* e *C. canjerana* sob deficiência de N, indica menor aproveitamento da luz (menor absorção de luz e maior dissipação de energia) incidente sobre as folhas (Logan et al., 1999; Boussadia et al., 2010).

Além da influência sobre a concentração de pigmentos, a deficiência de N diminuiu a concentração de outras moléculas nitrogenadas orgânicas e inorgânicas nas quatro espécies vegetais, além de diminuir a atividade de enzimas envolvidas na assimilação do N (ANR e AGS) (Tabela 1). Similarmente, em *Arabidopsis* a limitação de N causou diminuição nas concentrações de NO_3^- , aminoácidos e N total e diminuição na ANR, sem interferir no teor de NH_4^+ (Lemaître et al., 2008). No entanto, os autores verificaram aumento na AGS, resultante da remobilização de N (que libera NH_4^+) induzida pela deficiência deste nutriente.

Embora efeitos de fotoinibição crônica não tenham sido observados como consequência da deficiência de N, verificou-se que a F_v/F_m MD diminuiu em mudas Nin nas duas espécies intolerantes à sombra (*C. estrellensis* e *C. canjerana*), em comparação com mudas N+. Essa diminuição temporária da eficiência fotoquímica do FSII (fotoinibição dinâmica) pode ser resultado de uma maior dissipação de energia absorvida, relacionada ao ciclo da xantofila, que contribui com a proteção dos sistemas de transporte de elétrons e pigmentos fotossintéticos contra danos oxidativos (Bertamini e Nedunchezian, 2003). A inoculação com ZK em *C. estrellensis* e com Ab-V5 e ZK em *C. canjerana* diminuiu a necessidade dessa dissipação de energia, conforme verificado pela manutenção da F_v/F_m MD em valores similares aos das plantas suplementadas com N.

Em *C. pachystachya*, verificou-se expressivo aumento de biomassa com a inoculação com Ab-V5. A estirpe provocou aumento de 70,4% e 35,2% na massa seca total das mudas suplementadas (N+) e não suplementadas (N-) com N, respectivamente, em comparação com mudas Nin. Porém, os efeitos da inoculação com Ab-V5 não foram refletidos em aumentos da eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) ou da assimilação líquida de CO_2 (A_{max}). Sob suplementação de N, o aumento do crescimento ocorreu conjuntamente ao da área foliar nas mudas inoculadas com Ab-V5, o que deve ter contribuído para o significativo ganho de carbono e biomassa destas mudas. Em contrapartida, essas mudas apresentaram menor teor total de N em suas folhas, sugerindo que a elevada taxa de crescimento também foi dependente da aplicação exógena de N. Possivelmente, por essa razão, as mudas inoculadas com Ab-V5 e não suplementadas com N apresentaram um aumento de crescimento menos expressivo do que as que receberam N. O N tem papel fundamental no estabelecimento da associação entre plantas e bactérias e a sua concentração no solo influencia a magnitude dos benefícios da associação, pois moléculas nitrogenadas, como NO_3^- , NH_4^+ e compostos orgânicos regulam processos metabólicos tanto das plantas quanto das bactérias (Carvalho et al., 2014). Embora a deficiência de N possa favorecer a fixação de N por bactérias diazotróficas e a associação das plantas com essas estirpes (Oliveira et al., 2003), esse estresse também pode diminuir a liberação de exsudatos pela raiz, o que inibe a atração e o estabelecimento da associação com as BPCP (Carvalhais et al., 2011).

O aumento do crescimento das mudas de *C. pachystachya* inoculadas com Ab-V5 também pode ser parcialmente atribuído a uma germinação mais precoce de suas sementes. Embora não tenha sido mensurado, perceptivelmente, as sementes de *C. pachystachya* inoculadas com Ab-V5 tiveram uma germinação mais rápida e as mudas apresentaram um crescimento inicial mais acelerado em relação a mudas Nin ou ZK. Em testes de germinação com essa espécie, Souza et al. (2020) demonstraram que a inoculação com Ab-V5 (e também com ZK) reduziu o tempo de germinação e aumentou o índice de vigor de plântulas de *C. pachystachya*, indicando maior expansão da raiz e da parte aérea.

A estirpe Ab-V5 também alterou o metabolismo do N de *C. pachystachya*, conforme verificado nas folhas pela diminuição da ANR e aumento da AGS e da concentração de NH_4^+ , substrato da glutamina sintetase. Esse resultado pode ser indício da ocorrência de fixação de N por essa estirpe, que é diazotrófica, contribuindo também para o crescimento de mudas de *C. pachystachya*. Em plantas de milho inoculadas com a estirpe Sp-29, de *A. brasilense*, Saikia et al. (2007) verificaram aumento da AGS foliar, em relação às plantas

não inoculadas, decorrente da fixação de N pelas bactérias na raiz. Em função dos efeitos benéficos da fixação de N pelas BPCP, os autores também verificaram aumento da área foliar e da biomassa das plantas inoculadas, de forma similar ao observado em mudas de *C. pachystachya* inoculadas com Ab-V5 neste estudo.

Independentemente do tratamento de N, as BPCP provocaram aumento da A_{max} nas mudas de *H. popayanensis* inoculadas com ZK e de *C. estrellensis* inoculadas com Ab-V5, em relação a mudas N_{in} . Porém, esses aumentos não resultaram no incremento de biomassa. Diferentemente, as mudas de *C. canjerana*, que não tiveram a A_{max} influenciada pelas BPCP, apresentaram maior massa seca total quando inoculadas com Ab-V5 e ZK. Como ambas as estirpes são capazes de sintetizar auxinas (Goes et al., 2012; Fukami et al., 2018a), é possível que a síntese deste hormônio pelas BPCP tenha contribuído para o crescimento de mudas de *C. canjerana*. A produção de auxinas por bactérias associativas de fato tem potencial de alterar o metabolismo e a morfologia da raiz, proporcionando maior absorção de água e íons (Spaepen et al., 2007; Beneduzi et al., 2008; Bashan e de-Bashan, 2010; Cassán et al., 2014). O aumento de biomassa em *C. canjerana*, resultante da inoculação com BPCP, também foi observado em mudas inoculadas com as mesmas estirpes bacterianas e tratadas com NO_3^- ou NH_4^+ (Capítulo 1), o que reforça o potencial que a inoculação com BPCP tem para promover o crescimento de mudas de espécies arbóreas.

O metabolismo do N foi influenciado pela inoculação com ZK em todas as espécies estudadas, especialmente em *C. estrellensis* (Tabela 2). O aumento das concentrações de clorofilas, NO_3^- , aminoácidos e proteínas, nesta espécie, resultaram em maior teor de N total nas folhas de mudas inoculadas com esta BPCP. Além disso, a ANR foliar aumentou com a inoculação com ZK e também com Ab-V5. Apesar dessas alterações, a inoculação com ZK não promoveu aumento do crescimento ou da fotossíntese das mudas de *C. estrellensis*. Em *H. popayanensis*, a inoculação com ZK também teve efeito positivo sobre o metabolismo do N, provocando aumentos nos teores de C_{tot} e NO_3^- nas folhas e de NH_4^+ e proteínas na raiz. Apesar da concentração de N_{tot} não ter sido influenciada pela BPCP, a fotossíntese aumentou com a inoculação com ZK, em relação a mudas N_{in} . Mudas de *C. pachystachya* também tiveram as concentrações de proteínas e aminoácidos na raiz aumentadas pela inoculação com ZK. Nessa espécie, os teores de C_{tot} e de NO_3^- (raiz e folhas) também aumentaram com a inoculação com ZK, porém, apenas em plantas supridas com N. Por ZK ser uma bactéria não diazotrófica, é possível que os aumentos observados na concentração de metabólitos nitrogenados e de enzimas do metabolismo do N sejam resultantes do aumento da absorção de N. O ganho em absorção geralmente é

associado com o aumento da área de superfície da raiz, resultante do aumento da densidade de pelos, do número de raízes laterais e/ou do comprimento da raiz (Carvalho et al. 2014). As BPCP são capazes de aumentar a absorção de N pela planta indiretamente por essas alterações morfológicas na raiz, estimuladas pela síntese de auxinas, e também diretamente pelo estímulo dos sistemas envolvidos na absorção dos íons (Mantelin e Touraine, 2004; Spaepen et al., 2007).

As espécies vegetais foram agregadas em grupos ecológicos (intolerante e tolerante à sombra) para avaliar diferenças nas respostas ao N e à inoculação entre os dois grupos. Foram verificadas interações significativas grupo ecológico \times N em três variáveis. A A_{max} e EUA foram maiores nas espécies intolerantes à sombra, e ambas as variáveis foram afetadas negativamente pela deficiência de N nos dois grupos ecológicos. A razão de massa seca raiz/parte aérea sofreu aumento mais expressivo com a deficiência de N nas tolerantes à sombra, indicando maior plasticidade das espécies deste grupo ecológico em investir no crescimento de raiz, em detrimento da parte aérea, sob deficiência de N, em comparação com as intolerantes à sombra. Verificou-se interação grupo ecológico \times inoculação apenas sobre a AGS foliar. A atividade desta enzima aumentou nas folhas de espécies intolerantes à sombra com a inoculação com Ab-V5, indicando uma influência relevante no metabolismo do N nas mudas deste grupo ecológico, que não ocorreu nas espécies tolerantes à sombra. Porém, ressalta-se que esse resultado foi influenciado principalmente pela resposta que mudas de *C. pachystachya* tiveram à inoculação com Ab-V5, que aumentou a AGS foliar, resultando, inclusive, no crescimento de suas mudas. Houve também interação grupo ecológico \times N \times inoculação em duas variáveis. A F_v/F_m MD diminuiu com a deficiência de N apenas nas espécies tolerantes à sombra não inoculadas (N_{in}), indicando um possível papel das BPCP em diminuir a necessidade de dissipar o excesso de energia nas mudas deste grupo ecológico. Por fim, a inoculação com ZK aumentou a C_{tot} nas mudas de espécies intolerantes à sombra, apenas sob suplementação com N ($N+$), em relação às plantas N_{in} ou inoculadas com Ab-V5.

Em relação ao estudo realizado com as mesmas espécies arbóreas cultivadas com NO_3^- ou NH_4^+ e inoculadas com Ab-V5 e ZK (Capítulo 1), observou-se que, em geral, a associação com as BPCP foi benéfica às plantas em ambos os estudos. As estirpes Ab-V5 e ZK promoveram o crescimento de mudas de *C. canjerana* nos dois estudos, independentemente do tratamento de N. Porém, mudas de *C. pachystachya* tiveram o crescimento influenciado pelas BPCP apenas neste estudo. É importante ressaltar que a suplementação nitrogenada diferiu nos experimentos: neste, as mudas $N+$ foram nutridas com NH_4NO_3 , enquanto nos experimentos do Capítulo 1 as mudas foram cultivadas com

NO_3^- ou NH_4^+ como fonte de N. Moléculas nitrogenadas, como NO_3^- , NH_4^+ e compostos orgânicos regulam processos metabólicos tanto das plantas quanto das bactérias. Conseqüentemente, a forma nitrogenada com a qual as plantas são nutridas tem papel fundamental no estabelecimento da associação entre plantas e bactérias (Carvalho et al., 2014). Além disso, a combinação mais adequada de planta e microrganismo e o estabelecimento da associação variam de acordo com o tipo de solo (Johnston-Monje et al., 2014). Por isso, outro aspecto a ser considerado é o substrato de cultivo nos dois estudos. Enquanto os experimentos do presente estudo foram realizados com solo misturado com areia, no Capítulo 1 as mudas foram cultivadas em areia esterilizada.

5. Conclusões

Os resultados permitem afirmar que a deficiência de N influencia a fotossíntese, o crescimento e o metabolismo do N de mudas de espécies arbóreas da floresta estacional semidecidual. Todas as espécies tiveram o metabolismo do N alterado e a fotossíntese afetada negativamente pela falta de N, e o crescimento não foi inibido pela falta de N apenas em *C. canjerana*. A inoculação com BPCP foi positiva para a fotossíntese em duas espécies vegetais: ZK em *H. popayanensis* e Ab-V5 em *C. estrellensis*. Além disso, houve promoção do crescimento em mudas de *C. canjerana* com a inoculação com ambas as estirpes de BPCP, de forma similar ao verificado em cultivo com diferentes fontes nitrogenadas (Capítulo 1). Quanto ao metabolismo do N, a inoculação com ZK teve grande influência em três espécies vegetais (*C. pachystachya*, *H. popayanensis* e *C. estrellensis*), promovendo aumento da concentração de moléculas nitrogenadas nas mudas. A suplementação de N durante o cultivo das mudas influenciou os efeitos da inoculação. A interação dos dois fatores (N × inoculação) foi particularmente notável no crescimento de mudas de *C. pachystachya*, espécie que teve a biomassa aumentada pela inoculação com Ab-V5. Porém, o efeito positivo sobre o crescimento foi maior quando as mudas foram suplementadas com N. Com a inclusão do grupo ecológico nas análises estatísticas, notou-se que as espécies intolerantes à sombra foram mais influenciadas pela deficiência de N (A_{max} , E_{UA} e razão de massa seca raiz/parte aérea). Este grupo ecológico também apresentou diminuição da F_v/F_m MD sob deficiência de N, mas a inoculação com Ab-V5 e ZK preveniu este efeito negativo, demonstrando o potencial das BPCP em evitar a fotoinibição em mudas de espécies tolerantes à sombra. No entanto, para uma comparação mais apropriada entre grupos ecológicos, mais espécies vegetais de cada grupo deveriam ser incluídas no estudo.

Tendo em vista os efeitos provocados pela falta de N e pela inoculação com Ab-V5 e ZK, ressalta-se o potencial que a inoculação com BPCP tem para estimular a fisiologia e o crescimento de espécies arbóreas do bioma Atlântico, mesmo sob deficiência de N. Os benefícios provenientes da inoculação podem ter utilidade, por exemplo, na produção em viveiro e no plantio em campo de mudas com fins de reflorestamento, até mesmo com destinação para locais onde a quantidade de N é baixa, podendo auxiliar no estabelecimento das mudas e na viabilidade ecológica e financeira da regeneração florestal.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina (UEL), ao Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas da UEL por disponibilizarem as sementes utilizadas neste estudo e ao Núcleo de Pesquisa para o Desenvolvimento e Aplicação de Biofertilizantes da UEL por cederem as BPCP. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (445290/2014-5).

Financiamento

Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (445290/2014-5).

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Contribuições dos autores

RSM e JAP conceberam o estudo e planejaram o delineamento experimental. AKC adquiriu, analisou e interpretou os dados. AKC, RSM e JAP escreveram e revisaram criticamente o manuscrito e o aprovaram para ser submetido.

Referências

- Adams, W.W. III, Muller, O., Cohu, C.M., Demmig-Adams, B., 2013. May photoinhibition be a consequence, rather than a cause, of limited plant productivity? *Photosynth. Res.* 117, 31–44.
- Bashan, Y., de-Bashan, L.E., 2010. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth – a critical assessment. *Adv. Agron.* 108, 77–136.

- Bashan, Y., Salazar, B., Moreno, M., Lopez, B.R., Linderman, R.G., 2012. Restoration of eroded soil in the Sonoran Desert with native leguminous trees using plant growth-promoting microorganisms and limited amounts of compost and water. *J. Environ. Manage.* 102, 26–36.
- Bashan, Y., Salazar, B., Puente, M.E., Bacilio, M., Linderman, R.G., 2009b. Enhanced establishment and growth of giant cardon cactus in an eroded field in the Sonoran Desert using native legume trees as nurse plants aided by plant growth-promoting microorganisms and compost. *Biol. Fert. Soils* 45, 585–594.
- Bashan, Y., Salazar, B., Puente, M.E., 2009a. Responses of native legume desert trees used for reforestation in the Sonoran Desert to plant growth-promoting microorganisms in screen house. *Biol. Fert. Soils* 45, 655–662.
- Bashan, Y., Singh, C.S., Levanony, H., 1989. Contribution of *Azospirillum brasilense* Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation. *Can. J. Bot.* 67, 2429–2434.
- Beneduzi, A., Peres, D., Vargas, L.K., Bodanese-Zanettini, M.H., Passaglia, L.M.P., 2008. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. *Appl. Soil Ecol.* 39, 311–320.
- Bertamini, M., Nedunchezian, N., 2003. Photoinhibition of photosynthesis in mature and young leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Sci.* 164, 635–644.
- Boussadia, O., Steppe, K., Zgallai, H., Hadj, S.B.E., Braham, M., Lemeur, R., van Labeke, M.C., 2010. Effects of nitrogen deficiency on leaf photosynthesis, carbohydrate status and biomass production in two olive cultivars 'Meski' and 'Koroneiki'. *Sci. Hortic.* 123, 336–342.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Calzavara, A.K., Paiva, P.H.G., Gabriel, L.C., Oliveira, A.L.M., Milani, K.S., Oliveira, H.C., Bianchini, E., Pimenta, J.A., Oliveira, M.C.N., Dias-Pereira, J., Stolf-Moreira, R., 2018. Associative bacteria influence maize (*Zea mays* L.) growth, physiology and root anatomy under different nitrogen levels. *Plant Biol.* 20, 870–878.
- Carvalho, L.C., Dennis, P.G., Fedoseyenko, D., Hajirezaei, M.R., Borriss, R., von Wirén, N., 2011. Root exudation of sugars, amino acids, and organic acids by maize as affected by nitrogen, phosphorus, potassium, and iron deficiency. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 174: 3–11.
- Carvalho, T.L.G., Balsemão-Pires, E., Saraiva, R.M., Ferreira, P.C.G., Hemerly, A.S., 2014. Nitrogen signaling in plant interactions with associative diazotrophic bacteria. *J. Exp. Bot.* 65, 5631–5642.
- Casano, L.M., Martin, M., Sabater, B., 1994. Sensitivity of superoxide dismutase transcript levels and activities of oxidative stress is lower in mature-senescent than in young barley leaves. *Plant Physiol.* 106, 1033–1039.
- Cassán, F., Vanderleyden, J., Spaepen, S., 2014. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. *J. Plant Growth Regul.* 33, 440–459.
- Ciampi, S., Gentili, E., Guidi, L., Soldatini, G.F., 1996. The effect of nitrogen deficiency on leaf gas exchange and chlorophyll fluorescence parameters in sunflower. *Plant Sci.* 118, 177–184.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), 2011. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Embrapa Solos, Rio de Janeiro.
- Evans, J.R., 1989. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C₃ plants. *Oecologia* 78, 9–19.
- Fukami, J., Abrantes, J.L.F., del Cerro, P., Nogueira, M.A., Ollero, F.J., Megías, M., Hungria, M., 2018b. Revealing strategies of quorum sensing in *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6. *Arch. Microbiol.* 200, 47–56.
- Fukami, J., Cerezini, P., Hungria, M., 2018a. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Express* 8, 73.

- Goes, K.C.G.P., Fisher, M.L.C., Cattelan, A.J., Nogueira, M.A., Carvalho, C.G.P., Oliveira, A.L.M., 2012. Biochemical and molecular characterization of high population density bacteria isolated from sunflower. *J. Microbiol. Biotechn.* 22, 437–447.
- Hageman, R.H., Reed, A.J., 1980. Nitrate reductase from higher plants. *Method. Enzymol.* 69, 270–280.
- Herridge, D.F., Peoples, M.B., Boddey, R.M., 2008. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil* 311, 1–18.
- Huang, Z.A., Jiang, D.A., Yang, Y., Sun, J.W., Jin, S.H., 2004. Effects of nitrogen deficiency on gas exchange, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzymes in leaves of rice plants. *Photosynthetica* 42, 357–364.
- Hungria, M., Campo, R.J., Souza, E.M., Pedrosa, F.O., 2010. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil* 331, 413–425.
- Johnston-Monje, D., Mousa, W., Lazarovits, G., Raizada, M.N., 2014. Impact of swapping soils on the endophytic bacterial communities of pre-domesticated, ancient and modern maize. *BMC Plant Biol.* 14, 233.
- Kusano, M., Fukushima, A., Redestig, H., Saito, K., 2011. Metabolomic approaches toward understanding nitrogen metabolism in plants. *J. Exp. Bot.* 62, 1439–1453.
- Lemaître, T., Gaufichon, L., Boutet-Mercey, S., Christ, A., Masclaux-Daubresse, C., 2008. Enzymatic and metabolic diagnostic of nitrogen deficiency in *Arabidopsis thaliana* Wassilewskija accession. *Plant Cell Physiol.* 49, 1056–1065.
- Lichtenthaler, H.K., Wellburn, A.R., 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. T.* 11, 591–592.
- Logan, B.A., Demmig-Adams, B., Rosenstiel, T.N., Adams, W.W. III., 1999. Effect of nitrogen limitation on foliar antioxidants in relationship to other metabolic characteristics. *Planta* 209, 213–220.
- Mantelin, S., Touraine, B., 2004. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *J. Exp. Bot.* 55, 27–34.
- McCullough, H., 1967. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clin. Chim. Acta* 17, 297–304.
- Miranda, K.M., Espey, M.G., Wink, D.A., 2001. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 5, 62–71.
- Oliveira, A.L.M., Canuto, E.L., Reis, V.M., Baldani, J.I., 2003. Response of micropropagated sugarcane varieties to inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. *Braz. J. Microbiol.* 34, 59–61.
- Oliveira, A.L.M., Santos, O.J.A.P., Marcelino, P.R.F., Milani, K.M.L., Zuluaga, M.Y.A., Zucareli, C., Gonçalves, L.S.A., 2017. Maize inoculation with *Azospirillum brasilense* Ab-V5 cells enriched with exopolysaccharides and polyhydroxybutyrate results in high productivity under low N fertilizer input. *Front. Microbiol.* 8, 1873.
- Oliveira, H.C., Sodek, L., 2013. Effect of oxygen deficiency on nitrogen assimilation and amino acid metabolism by soybean root segments. *Amino Acids* 44, 743–755.
- Ortíz-Castro, R., Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., López-Bucio, J., 2009. The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signal. Behav.* 4, 701–712.
- Paul, M.J., Foyer, C.H., 2001. Sink regulation of photosynthesis. *J. Exp. Bot.* 52, 1383–1400.
- Panvievicz, V.C.S., Amaral, F.P., Santos, K.F.D.N., Agtuca, B., Xu, Y., Schueller, M.J., Arisi, A.C.M., Steffens, M.B.R., Souza, E.M., Pedrosa, F.O., Stacey, G., Ferrieri, R.A., 2015. Robust biological nitrogen fixation in a model grass-bacteria association. *Plant J.* 81, 907–919.

- Ratajczak, L., Ratajczak, W., Mazurowa, H., 1981. The effect of different carbon and nitrogen sources on the activity of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in lupine embryonic axes. *Physiol. Plant* 51, 277–280.
- Remans, T., Nacry, P., Pervent, M., Girin, T., Tillard, P., Lepetit, M., Gojon, A., 2006. A central role for the nitrate transporter NRT2.1 in the integrated morphological and physiological responses of the root system to nitrogen limitation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 140, 909–921.
- Rosegrant, M.W., Ringler, C., Zhu, T., 2009. Water for agriculture: maintaining food security under growing scarcity. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 34, 205–222.
- Rubio-Wilhemi, M.M., Sanchez-Roriguez, E., Rosales, M.A., Begoña, B., Rios, J.J., Romero, L., Blumwald, E., Ruiz, J.M., 2011. Effect of cytokinins on oxidative stress in tobacco plants under nitrogen deficiency. *Environ. Exp. Bot.* 72, 167–173.
- Saikia, S.P., Jain, V., Khetarpal, S., Aravind, S., 2007. Dinitrogen fixation activity of *Azospirillum brasilense* in maize (*Zea mays*). *Curr. Sci.* 93, 1296–1300.
- Scheible, W.R., Morcuende, R., Czechowski, T., Fritz, C., Osuna, D., Palacios-Rojas, N., Schindelasch, D., Thimm, O., Udvardi, M.K., Stitt, M., 2004. Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *Plant Physiol.* 136, 2483–2499.
- Shimizu, M., Ishida, A., Tange, T., Yagi, H., 2006. Leaf turnover and growth responses of shade-grown saplings of four *Shorea* rainforest species to a sudden increase in light. *Tree Physiol.* 26, 449–457.
- Souza, N.L., Rocha, S.S., Narezzi, N.T., Tiepo, N.A., Oliveira, A.L.M., Oliveira, H.C., Bianchini, E., Pimenta, J.A., Stolf-Moreira, R., 2019. Differential impacts of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on seeds of neotropical tree species with contrasting tolerance to shade. *Trees* 34, 121–132.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R., 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 425–448.
- Stewart, G.R., Popp, M., Holzapfel, I., Stewart, J.J., Dickie-Eskew, A., 1986. Localization of nitrate reduction in ferns and its relationship to environment and physiological characteristics. *New Phytol.* 104, 373–384.
- Terashima, I., Evans, J.R., 1988. Effects of light and nitrogen nutrition on the organization of the photosynthetic apparatus in spinach. *Plant Cell Physiol.* 29, 143–155.
- Tiepo, A.N., Hertel, M.F., Rocha, S.S., Calzavara, A.K., Oliveira, A.L.M., Pimenta, J.A., Oliveira, H.C., Bianchini, E., Stolf-Moreira, R., 2018. Enhanced drought tolerance in seedlings of Neotropical tree species inoculated with plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiol. Bioch.* 130, 277–288.
- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., Boyce, A.N., 2016. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability – a review. *Molecules* 21, 573.
- Yemm, E.W., Cocking, E.C., 1955. The determination of amino acid with ninhydrin. *Analyst* 80, 209–213.

Tabela S1. Médias \pm erros-padrão de variáveis de mudas de *Cecropia pachystachya*, cultivadas com (N+) ou sem (N-) adição de N, não inoculadas com bactérias (Nin), ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. $n = 5$ para as análises da F_v/F_m e bioquímicas; $n = 10$ para análises da A_{max} , g_s e de crescimento (massas secas). AGS – atividade da glutamina sintetase; A_{max} – assimilação líquida de CO_2 ; ANR – atividade da nitrato redutase; C_i – concentração intercelular de CO_2 ; C_{tot} – teor total de clorofilas; C_{tot}/Car – razão do teor total de clorofilas/carotenoides; EUA – eficiência no uso da água; F_v/F_m M – eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II antes do amanhecer; F_v/F_m MD – eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II ao meio dia; g_s – condutância estomática; N_{tot} – teor total de nitrogênio.

Variável	Nitrogênio	Inoculação		
		Nin	Ab-V5	ZK
F_v/F_m M	N+	0,770 \pm 0,0135	0,795 \pm 0,007	0,779 \pm 0,006
	N-	0,778 \pm 0,006	0,790 \pm 0,005	0,789 \pm 0,003
F_v/F_m MD	N+	0,717 \pm 0,008	0,728 \pm 0,015	0,751 \pm 0,007
	N-	0,730 \pm 0,006	0,714 \pm 0,006	0,723 \pm 0,005
A_{max} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	N+	9,87 \pm 0,258	9,80 \pm 0,393	8,44 \pm 0,511
	N-	7,54 \pm 0,419	7,55 \pm 0,270	6,55 \pm 0,282
g_s ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	N+	0,404 \pm 0,050	0,341 \pm 0,053	0,328 \pm 0,050
	N-	0,269 \pm 0,062	0,283 \pm 0,056	0,262 \pm 0,039
EUA (mmol mol^{-1})	N+	3,71 \pm 0,194	3,87 \pm 0,159	3,22 \pm 0,283
	N-	3,01 \pm 0,228	3,25 \pm 0,172	2,66 \pm 0,169
C_i ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)	N+	345 \pm 3,83	330 \pm 5,66	329 \pm 11,0
	N-	313 \pm 12,7	323 \pm 12,5	337 \pm 8,18
Área foliar (cm^2)	N+	156 \pm 9,45	241 \pm 14,0	155 \pm 18,5
	N-	49,3 \pm 1,32	52,8 \pm 1,84	46,4 \pm 2,40
Massa seca total (g)	N+	1,88 \pm 0,108	3,21 \pm 0,110	1,76 \pm 0,242
	N-	0,717 \pm 0,042	0,929 \pm 0,015	0,792 \pm 0,032
Massa seca raiz/parte aérea	N+	0,941 \pm 0,055	0,871 \pm 0,050	0,883 \pm 0,062
	N-	1,11 \pm 0,129	1,18 \pm 0,049	1,48 \pm 0,062
$[C_{tot}]$ (mg g^{-1})	N+	2,25 \pm 0,051	2,03 \pm 0,059	2,71 \pm 0,218
	N-	1,10 \pm 0,037	1,07 \pm 0,127	0,940 \pm 0,097
$[C_{tot}]/[Car]$ (mg mg^{-1})	N+	6,77 \pm 0,112	6,82 \pm 0,221	6,68 \pm 0,278
	N-	5,02 \pm 0,136	4,70 \pm 0,276	4,81 \pm 0,357
$[NO_3^-]$ raiz (nmol g^{-1})	N+	6962 \pm 1176	4809 \pm 1447	11910 \pm 1785
	N-	900 \pm 339	42,7 \pm 17,6	1397 \pm 424
$[NO_3^-]$ folhas (nmol g^{-1})	N+	2586 \pm 116	652 \pm 14,9	15290 \pm 3300
	N-	72,9 \pm 4,78	119 \pm 39,1	45,1 \pm 10,9
$[NH_4^+]$ raiz (nmol g^{-1})	N+	129 \pm 12,9	102 \pm 16,9	255 \pm 24,5
	N-	116 \pm 11,5	89,9 \pm 4,79	527 \pm 81,6
$[NH_4^+]$ folhas (nmol g^{-1})	N+	355 \pm 15,5	508 \pm 19,3	377 \pm 32,1
	N-	396 \pm 10,8	430 \pm 18,0	445 \pm 25,6
[aminoácidos] raiz ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	N+	0,787 \pm 0,114	0,878 \pm 0,113	2,05 \pm 0,267
	N-	0,556 \pm 0,058	0,521 \pm 0,063	1,39 \pm 0,102
[aminoácidos] folhas ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	N+	5,14 \pm 0,197	4,34 \pm 0,577	4,17 \pm 0,442
	N-	3,92 \pm 0,884	2,41 \pm 0,452	1,54 \pm 0,280
[proteínas] raiz (mg g^{-1})	N+	0,661 \pm 0,047	0,892 \pm 0,085	0,995 \pm 0,105
	N-	0,714 \pm 0,087	0,776 \pm 0,062	0,813 \pm 0,075
[proteínas] folhas (mg g^{-1})	N+	3,71 \pm 0,370	4,04 \pm 0,236	3,64 \pm 0,356
	N-	2,95 \pm 0,010	2,64 \pm 0,220	2,63 \pm 0,240
$[N_{tot}]$ folhas (g kg^{-1})	N+	24,6 \pm 0,625	19,0 \pm 0,769	25,5 \pm 0,717
	N-	10,2 \pm 0,066	9,6 \pm 1,01	8,7 \pm 0,994
ANR raiz ($\text{nmol NO}_2^- \text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	N+	2,90 \pm 0,195	4,16 \pm 0,331	3,19 \pm 0,191
	N-	0,917 \pm 0,066	1,06 \pm 0,139	1,11 \pm 0,079
ANR folhas ($\text{nmol NO}_2^- \text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	N+	19,0 \pm 3,46	9,25 \pm 1,04	18,1 \pm 1,96
	N-	20,9 \pm 3,71	9,77 \pm 1,12	19,0 \pm 2,93
AGS raiz ($\text{nmol GGH min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$)	N+	12,6 \pm 0,726	14,0 \pm 1,53	14,4 \pm 0,548
	N-	15,4 \pm 2,25	11,7 \pm 0,860	11,4 \pm 1,23
AGS folhas ($\text{nmol GGH min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$)	N+	53,6 \pm 10,6	316 \pm 48,2	77,1 \pm 35,4
	N-	96,5 \pm 17,3	219 \pm 14,1	154 \pm 12,3

Tabela S2. Médias \pm erros-padrão de variáveis de mudas de *Heliocarpus popayanensis*, cultivadas com (N+) ou sem (N-) adição de N, não inoculadas com bactérias (Nin), ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. $n = 5$ para as análises da F_v/F_m e bioquímicas; $n = 10$ para análises da A_{max} , g_s e de crescimento (massas secas). AGS – atividade da glutamina sintetase; A_{max} – assimilação líquida de CO_2 ; ANR – atividade da nitrato redutase; C_i – concentração intercelular de CO_2 ; C_{tot} – teor total de clorofilas; C_{tot}/Car – razão do teor total de clorofilas/carotenoides; EUA – eficiência no uso da água; F_v/F_m M – eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II antes do amanhecer; F_v/F_m MD – eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II ao meio dia; g_s – condutância estomática; N_{tot} – teor total de nitrogênio.

Variável	Nitrogênio	Inoculação		
		Nin	Ab-V5	ZK
F_v/F_m M	N+	0,770 \pm 0,008	0,759 \pm 0,006	0,763 \pm 0,006
	N-	0,762 \pm 0,004	0,761 \pm 0,005	0,762 \pm 0,005
F_v/F_m MD	N+	0,693 \pm 0,005	0,700 \pm 0,002	0,696 \pm 0,005
	N-	0,668 \pm 0,007	0,696 \pm 0,005	0,676 \pm 0,009
A_{max} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	N+	10,5 \pm 0,519	11,3 \pm 0,360	11,5 \pm 0,471
	N-	9,43 \pm 0,335	9,96 \pm 0,417	10,8 \pm 0,432
g_s ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	N+	0,141 \pm 0,011	0,151 \pm 0,011	0,170 \pm 0,016
	N-	0,175 \pm 0,017	0,180 \pm 0,014	0,182 \pm 0,016
EUA (mmol mol^{-1})	N+	3,91 \pm 0,227	3,99 \pm 0,279	3,72 \pm 0,222
	N-	3,08 \pm 0,252	3,06 \pm 0,197	3,33 \pm 0,229
C_i ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)	N+	243 \pm 4,17	241 \pm 4,40	246 \pm 5,65
	N-	273 \pm 6,03	272 \pm 5,36	264 \pm 4,86
Área foliar (cm^2)	N+	453 \pm 11,6	467 \pm 14,1	460 \pm 11,4
	N-	233 \pm 13,1	253 \pm 8,15	273 \pm 11,8
Massa seca total (g)	N+	8,51 \pm 0,191	8,64 \pm 0,243	8,59 \pm 0,271
	N-	4,33 \pm 0,195	4,83 \pm 0,146	4,68 \pm 0,210
Massa seca raiz/parte aérea	N+	0,614 \pm 0,024	0,608 \pm 0,036	0,648 \pm 0,004
	N-	0,708 \pm 0,043	0,744 \pm 0,026	0,724 \pm 0,065
$[C_{tot}]$ (mg g^{-1})	N+	1,86 \pm 0,055	2,00 \pm 0,106	2,28 \pm 0,058
	N-	1,50 \pm 0,120	1,32 \pm 0,008	1,54 \pm 0,068
$[C_{tot}]/[Car]$ (mg mg^{-1})	N+	4,08 \pm 0,064	4,27 \pm 0,114	4,33 \pm 0,076
	N-	4,20 \pm 0,145	3,94 \pm 0,062	4,07 \pm 0,067
$[NO_3^-]$ raiz (nmol g^{-1})	N+	41,0 \pm 7,43	62,2 \pm 7,54	31,3 \pm 10,2
	N-	15,4 \pm 7,86	43,4 \pm 12,9	47,1 \pm 15,4
$[NO_3^-]$ folhas (nmol g^{-1})	N+	115 \pm 17,6	214 \pm 24,8	186 \pm 24,0
	N-	133 \pm 19,6	171 \pm 42,6	218 \pm 37,2
$[NH_4^+]$ raiz (nmol g^{-1})	N+	519 \pm 27,5	558 \pm 36,3	657 \pm 63,6
	N-	502 \pm 4,05	533 \pm 31,2	598 \pm 31,7
$[NH_4^+]$ folhas (nmol g^{-1})	N+	1074 \pm 88,3	1183 \pm 59,1	1267 \pm 35,6
	N-	1235 \pm 61,9	1407 \pm 71,2	1397 \pm 93,8
[aminoácidos] raiz ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	N+	0,830 \pm 0,129	0,918 \pm 0,141	0,858 \pm 0,093
	N-	0,862 \pm 0,063	0,730 \pm 0,097	0,936 \pm 0,075
[aminoácidos] folhas ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	N+	2,90 \pm 0,146	3,09 \pm 0,437	3,98 \pm 0,327
	N-	2,07 \pm 0,131	2,36 \pm 0,0113	2,32 \pm 0,249
[proteínas] raiz (mg g^{-1})	N+	0,676 \pm 0,047	0,591 \pm 0,066	0,787 \pm 0,054
	N-	0,535 \pm 0,022	0,624 \pm 0,055	0,711 \pm 0,015
[proteínas] folhas (mg g^{-1})	N+	4,83 \pm 0,432	5,00 \pm 0,209	5,66 \pm 0,474
	N-	2,75 \pm 0,479	3,75 \pm 0,283	3,54 \pm 0,087
$[N_{tot}]$ folhas (g kg^{-1})	N+	11,3 \pm 1,11	16,1 \pm 1,91	17,6 \pm 3,48
	N-	11,6 \pm 2,40	16,1 \pm 2,20	13,9 \pm 1,03
ANR raiz ($\text{nmol NO}_2^- \text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	N+	3,49 \pm 0,582	3,92 \pm 0,532	4,04 \pm 0,419
	N-	3,56 \pm 0,415	4,49 \pm 0,500	4,52 \pm 0,047
ANR folhas ($\text{nmol NO}_2^- \text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	N+	16,2 \pm 2,21	22,8 \pm 3,53	13,4 \pm 1,67
	N-	12,3 \pm 1,41	9,74 \pm 2,67	12,4 \pm 1,52
AGS raiz ($\text{nmol GGH min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$)	N+	49,8 \pm 3,01	61,2 \pm 4,90	55,8 \pm 3,61
	N-	51,7 \pm 5,50	34,2 \pm 4,87	55,1 \pm 5,92
AGS folhas ($\text{nmol GGH min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$)	N+	27,4 \pm 3,86	24,6 \pm 2,05	43,0 \pm 12,5
	N-	35,3 \pm 3,16	50,4 \pm 10,4	45,3 \pm 7,16

Tabela S3. Médias \pm erros-padrão de variáveis de mudas de *Cariniana estrellensis*, cultivadas com (N+) ou sem (N-) adição de N, não inoculadas com bactérias (Nin), ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. $n = 5$ para as análises da F_v/F_m e bioquímicas; $n = 10$ para análises da A_{max} , g_s e de crescimento (massas secas). AGS – atividade da glutamina sintetase; A_{max} – assimilação líquida de CO_2 ; ANR – atividade da nitrato redutase; C_i – concentração intercelular de CO_2 ; C_{tot} – teor total de clorofilas; C_{tot}/Car – razão do teor total de clorofilas/carotenoides; EUA – eficiência no uso da água; F_v/F_m M – eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II antes do amanhecer; F_v/F_m MD – eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II ao meio dia; g_s – condutância estomática; N_{tot} – teor total de nitrogênio.

Variável	Nitrogênio	Inoculação		
		Nin	Ab-V5	ZK
F_v/F_m M	N+	0,797 \pm 0,002	0,797 \pm 0,002	0,785 \pm 0,002
	N-	0,751 \pm 0,002	0,751 \pm 0,004	0,763 \pm 0,002
F_v/F_m MD	N+	0,704 \pm 0,003	0,693 \pm 0,007	0,676 \pm 0,003
	N-	0,596 \pm 0,013	0,062 \pm 0,005	0,654 \pm 0,009
A_{max} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	N+	4,34 \pm 0,253	4,73 \pm 0,119	4,37 \pm 0,204
	N-	2,25 \pm 0,175	2,91 \pm 0,102	2,64 \pm 0,141
g_s ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	N+	0,048 \pm 0,005	0,063 \pm 0,005	0,057 \pm 0,006
	N-	0,061 \pm 0,006	0,072 \pm 0,006	0,064 \pm 0,005
EUA (mmol mol^{-1})	N+	4,31 \pm 0,117	4,11 \pm 0,233	3,99 \pm 0,147
	N-	1,49 \pm 0,073	1,71 \pm 0,060	1,82 \pm 0,122
C_i ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)	N+	230 \pm 12,7	259 \pm 9,84	251 \pm 10,9
	N-	307 \pm 8,05	296 \pm 10,4	301 \pm 7,13
Área foliar (cm^2)	N+	376 \pm 4,96	350 \pm 16,5	370 \pm 12,2
	N-	79,7 \pm 4,89	75,3 \pm 2,75	78,5 \pm 4,19
Massa seca total (g)	N+	4,49 \pm 0,129	4,21 \pm 0,203	4,35 \pm 0,198
	N-	1,01 \pm 0,047	0,967 \pm 0,015	0,950 \pm 0,015
Massa seca raiz/parte aérea	N+	0,498 \pm 0,017	0,527 \pm 0,023	0,516 \pm 0,022
	N-	0,986 \pm 0,093	0,828 \pm 0,040	0,838 \pm 0,054
$[C_{tot}]$ (mg g^{-1})	N+	1,63 \pm 0,046	1,60 \pm 0,059	1,73 \pm 0,077
	N-	0,868 \pm 0,051	0,965 \pm 0,055	1,08 \pm 0,033
$[C_{tot}]/[Car]$ (mg mg^{-1})	N+	4,89 \pm 0,043	5,22 \pm 0,241	5,20 \pm 0,161
	N-	3,32 \pm 0,100	3,42 \pm 0,156	3,40 \pm 0,230
$[NO_3^-]$ raiz (nmol g^{-1})	N+	4103 \pm 314	7168 \pm 205	6828 \pm 1692
	N-	142 \pm 53,0	33,8 \pm 13,8	247 \pm 83,7
$[NO_3^-]$ folhas (nmol g^{-1})	N+	332 \pm 67,0	276 \pm 82,8	641 \pm 228
	N-	49,3 \pm 3,14	21,8 \pm 8,77	61,4 \pm 11,5
$[NH_4^+]$ raiz (nmol g^{-1})	N+	362 \pm 16,7	450 \pm 42,8	423 \pm 5,44
	N-	369 \pm 30,9	416 \pm 19,8	403 \pm 42,8
$[NH_4^+]$ folhas (nmol g^{-1})	N+	1046 \pm 168	745 \pm 27,5	765 \pm 96,8
	N-	646 \pm 31,9	818 \pm 67,2	901 \pm 60,9
[aminoácidos] raiz ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	N+	4,77 \pm 0,655	6,82 \pm 0,577	6,28 \pm 0,671
	N-	1,36 \pm 0,132	1,65 \pm 0,193	2,59 \pm 0,078
[aminoácidos] folhas ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	N+	3,61 \pm 0,277	3,77 \pm 0,151	3,85 \pm 0,188
	N-	1,12 \pm 0,100	1,44 \pm 0,079	1,95 \pm 0,132
[proteínas] raiz (mg g^{-1})	N+	0,838 \pm 0,046	1,16 \pm 0,076	0,966 \pm 0,055
	N-	0,669 \pm 0,061	0,739 \pm 0,012	0,951 \pm 0,016
[proteínas] folhas (mg g^{-1})	N+	1,44 \pm 0,063	1,81 \pm 0,165	1,80 \pm 0,084
	N-	0,757 \pm 0,091	0,747 \pm 0,075	0,833 \pm 0,018
$[N_{tot}]$ folhas (g kg^{-1})	N+	14,4 \pm 1,26	14,3 \pm 0,389	15,7 \pm 1,64
	N-	6,98 \pm 0,798	10,2 \pm 0,377	7,95 \pm 0,377
ANR raiz ($\text{nmol NO}_2^- \text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	N+	2,25 \pm 0,153	0,673 \pm 0,059	0,515 \pm 0,067
	N-	1,20 \pm 0,138	1,13 \pm 0,118	0,918 \pm 0,090
ANR folhas ($\text{nmol NO}_2^- \text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	N+	7,63 \pm 1,76	12,5 \pm 0,926	11,0 \pm 1,14
	N-	3,05 \pm 0,352	4,12 \pm 0,185	4,45 \pm 0,518
AGS raiz ($\text{nmol GGH min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$)	N+	15,6 \pm 1,07	20,1 \pm 1,66	14,7 \pm 1,74
	N-	20,5 \pm 3,43	20,0 \pm 1,11	27,3 \pm 2,47
AGS folhas ($\text{nmol GGH min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$)	N+	94,5 \pm 5,21	78,3 \pm 6,78	135 \pm 33,5
	N-	71,3 \pm 6,98	85,8 \pm 19,3	57,8 \pm 5,04

Tabela S4. Médias \pm erros-padrão de variáveis de mudas de *Cabralea canjerana*, cultivadas com (N+) ou sem (N-) adição de N, não inoculadas com bactérias (Nin), ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. $n = 5$ para as análises da F_v/F_m e bioquímicas; $n = 10$ para análises da A_{max} , g_s e de crescimento (massas secas). AGS – atividade da glutamina sintetase; A_{max} – assimilação líquida de CO_2 ; ANR – atividade da nitrato redutase; C_i – concentração intercelular de CO_2 ; C_{tot} – teor total de clorofilas; C_{tot}/Car – razão do teor total de clorofilas/carotenoides; EUA – eficiência no uso da água; F_v/F_m M – eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II antes do amanhecer; F_v/F_m MD – eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II ao meio dia; g_s – condutância estomática; N_{tot} – teor total de nitrogênio.

Variável	Nitrogênio	Inoculação		
		Nin	Ab-V5	ZK
F_v/F_m M	N+	0,747 \pm 0,007	0,763 \pm 0,007	0,749 \pm 0,001
	N-	0,745 \pm 0,004	0,746 \pm 0,001	0,747 \pm 0,003
F_v/F_m MD	N+	0,630 \pm 0,004	0,607 \pm 0,011	0,625 \pm 0,009
	N-	0,519 \pm 0,026	0,629 \pm 0,003	0,606 \pm 0,006
A_{max} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	N+	5,78 \pm 0,652	5,64 \pm 0,457	4,64 \pm 0,479
	N-	3,60 \pm 0,264	3,64 \pm 0,305	3,87 \pm 0,182
g_s ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	N+	0,109 \pm 0,022	0,102 \pm 0,012	0,085 \pm 0,016
	N-	0,073 \pm 0,008	0,086 \pm 0,011	0,060 \pm 0,007
EUA (mmol mol^{-1})	N+	1,73 \pm 0,231	1,60 \pm 0,148	1,68 \pm 0,226
	N-	1,43 \pm 0,135	1,23 \pm 0,128	1,75 \pm 0,149
C_i ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)	N+	283 \pm 11,9	287 \pm 10,0	275 \pm 13,4
	N-	303 \pm 7,42	312 \pm 7,42	275 \pm 8,03
Área foliar (cm^2)	N+	108 \pm 10,4	111 \pm 9,30	134 \pm 15,2
	N-	60,2 \pm 2,61	71,1 \pm 4,99	59,1 \pm 2,13
Massa seca total (g)	N+	1,41 \pm 0,107	1,57 \pm 0,084	1,69 \pm 0,121
	N-	1,37 \pm 0,047	1,53 \pm 0,038	1,38 \pm 0,040
Massa seca raiz/parte aérea	N+	0,851 \pm 0,049	0,739 \pm 0,052	0,845 \pm 0,058
	N-	1,16 \pm 0,052	1,37 \pm 0,077	1,01 \pm 0,025
$[C_{tot}]$ (mg g^{-1})	N+	2,46 \pm 0,152	2,59 \pm 0,083	2,17 \pm 0,036
	N-	1,22 \pm 0,061	1,33 \pm 0,067	1,79 \pm 0,134
$[C_{tot}]/[Car]$ (mg mg^{-1})	N+	4,55 \pm 0,252	4,44 \pm 0,200	4,65 \pm 0,300
	N-	3,63 \pm 0,102	3,58 \pm 0,043	3,82 \pm 0,083
$[NO_3^-]$ raiz (nmol g^{-1})	N+	45341 \pm 4049	42278 \pm 4937	41496 \pm 1336
	N-	6749 \pm 2346	8766 \pm 6485	10701 \pm 4044
$[NO_3^-]$ folhas (nmol g^{-1})	N+	7367 \pm 1852	6362 \pm 1364	6784 \pm 976
	N-	33,5 \pm 21,9	6,97 \pm 3,87	84,6 \pm 52,1
$[NH_4^+]$ raiz (nmol g^{-1})	N+	4815 \pm 426	4263 \pm 160	4131 \pm 535
	N-	3427 \pm 292	2823 \pm 683	3061 \pm 412
$[NH_4^+]$ folhas (nmol g^{-1})	N+	419 \pm 59,9	714 \pm 99,3	696 \pm 60,5
	N-	518 \pm 43,6	605 \pm 53,5	673 \pm 112
[aminoácidos] raiz ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	N+	23,1 \pm 2,39	17,9 \pm 1,19	18,9 \pm 1,91
	N-	10,7 \pm 1,65	16,7 \pm 8,15	13,3 \pm 2,38
[aminoácidos] folhas ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	N+	32,3 \pm 2,37	25,8 \pm 3,36	30,4 \pm 4,13
	N-	5,44 \pm 0,137	5,03 \pm 1,12	7,12 \pm 2,03
[proteínas] raiz (mg g^{-1})	N+	2,91 \pm 0,447	2,57 \pm 0,575	3,40 \pm 0,533
	N-	2,01 \pm 0,146	2,86 \pm 0,446	2,07 \pm 0,151
[proteínas] folhas (mg g^{-1})	N+	14,3 \pm 0,460	13,7 \pm 0,686	15,8 \pm 0,630
	N-	8,76 \pm 0,396	10,4 \pm 0,396	9,66 \pm 0,583
$[N_{tot}]$ folhas (g kg^{-1})	N+	37,8 \pm 1,40	37,6 \pm 3,28	42,6 \pm 2,36
	N-	16,4 \pm 2,27	21,3 \pm 4,67	16,8 \pm 2,48
ANR raiz ($\text{nmol NO}_2^- \text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	N+	14,8 \pm 2,95	13,0 \pm 2,83	14,1 \pm 3,46
	N-	12,8 \pm 1,04	5,69 \pm 0,322	12,2 \pm 1,16
ANR folhas ($\text{nmol NO}_2^- \text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	N+	13,9 \pm 2,84	11,4 \pm 2,38	10,4 \pm 1,55
	N-	9,85 \pm 1,17	9,59 \pm 1,38	7,29 \pm 1,03
AGS raiz ($\text{nmol GGH min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$)	N+	18,6 \pm 1,59	29,0 \pm 4,89	21,6 \pm 2,83
	N-	24,2 \pm 2,11	20,1 \pm 0,208	22,5 \pm 2,19
AGS folhas ($\text{nmol GGH min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$)	N+	26,3 \pm 3,67	20,2 \pm 2,71	26,8 \pm 4,05
	N-	20,4 \pm 0,663	22,5 \pm 2,52	26,6 \pm 3,96

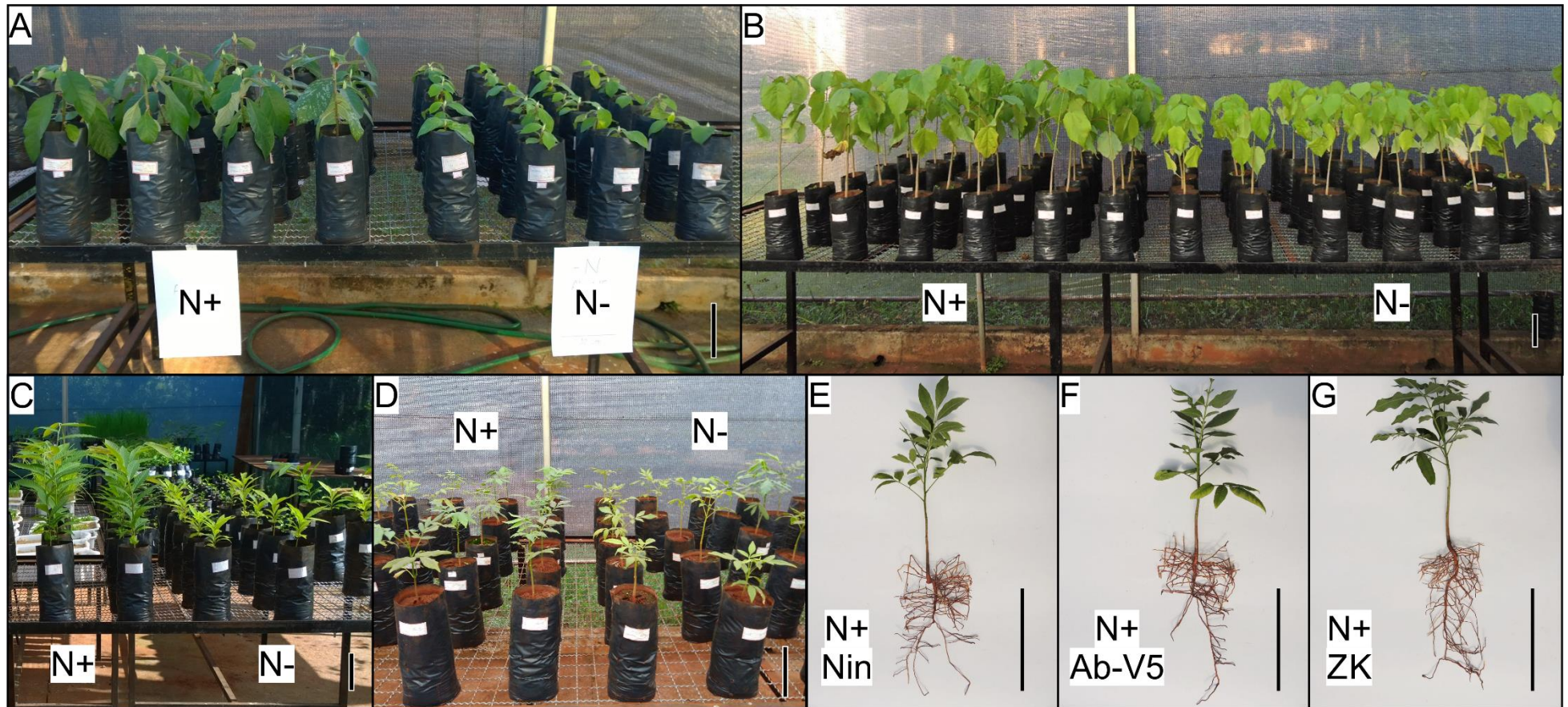


Fig. S1. Mudas de *Cecropia pachystachya* (A), *Heliocarpus popayanensis* (B), *Cariniana estrellensis* (C) e *Cabralea canjerana* (D) cultivadas com (N+) ou sem (N-) adição de N. O delineamento amostral adotado durante os experimentos foi o inteiramente casualizado, mas as mudas foram agrupadas em cada tratamento para a desmontagem do experimento, conforme as imagens (A-D). Mudas de *C. canjerana* N+ não inoculadas (E) ou inoculadas com Ab-V5 (F) ou ZK (G). Escala = 10 cm.

2 CONCLUSÃO GERAL

Com as análises realizadas nos dois capítulos desta tese, conclui-se que a inoculação com bactérias associativas tem potencial para aumentar a tolerância à toxicidade de amônio e à deficiência do nitrogênio em plantas de espécies arbóreas da Mata Atlântica de diferentes grupos ecológicos. Os efeitos de toxicidade ao NH_4^+ exibidos por uma espécie intolerante à sombra, *Heliocarpus popayanensis*, foram amenizados pela inoculação com as duas estirpes de BPCP utilizadas no estudo. Sob deficiência de N, mudas de *Cecropia pachystachya* inoculadas com Ab-V5 tiveram o crescimento menos inibido por este estresse, em relação a mudas não inoculadas. Além disso, independentemente do tratamento de nitrogênio, em ambos os estudos se verificou que as estirpes Ab-V5 e ZK promoveram o crescimento de mudas de *Cabralea canjerana*, o que ressalta o potencial que estes microrganismos têm de beneficiar o desenvolvimento vegetal.

Embora o estudo explore os efeitos das BPCP sobre mudas em condições de casa de vegetação, há possibilidade de que os resultados se estendam para o campo. Porém, é provável que a influência das bactérias sobre o desenvolvimento vegetal sofra grande variação das condições bióticas e abióticas de cada local, principalmente do solo. Dessa forma, os efeitos da associação planta-microrganismo, no contexto da regeneração ambiental, devem ser investigados em estudos pósteros, para que se faça viável a aplicação de BPCP com esta finalidade no futuro.

ANEXOS

ANEXO A

Normas da revista Environmental and Experimental Botany

Article structure

1. Manuscripts should be written in English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any

future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

• **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding. If no funding has been provided for the research, please include the following sentence: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Authors and Editor(s) are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.

All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

For chemical nomenclature, the conventions of the International Union of Pure and Applied Chemistry and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.

Math Formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible. In principle, variables are to be presented in italics.

Number consecutively any equations that have to be displayed separate from the text (if referred to explicitly in the text).

Subscripts and superscripts should be clear.

Greek letters and other non-Roman or handwritten symbols should be explained in the margin where they are first used. Take special care to show clearly the difference between zero (0) and the letter O, and between one (1) and the letter l.

Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.

Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.

The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Also powers of e are often more conveniently denoted by exp.

Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are: *P < 0.05, **P < 0.01 and ***P < 0.001.

In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g., Ca²⁺, not as Ca⁺⁺. Isotope numbers should precede the symbols, e.g., ¹⁸O.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.

- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either

'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software](#).

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/environmental-and-experimental-botany>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged.

The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference

Note: Authors are strongly encouraged to check the accuracy of each reference against its original source.

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed - if necessary - by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer,1989, pp. 12-16)".

3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.

4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on authors' names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates -- publications of the same author with one co-author -- publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1994a, 1994b, etc.

5. Use the following system for arranging your references, please note the proper position of the punctuation:

a. *For periodicals* Chettri, M.K., Sawidis, T., Zachariadis, G.A., Stratis, J.A., 1997. Uptake of heavy metals by living and dead *Cladonia thalli*. *Environ. Exp. Bot.*37, 39-42.

b. *For edited symposia, special issues, etc., published in a periodical* Rice, K., 1992. Theory and conceptual issues. In: Gall, G.A.E., Staton, M. (Eds.), *Integrating Conservation Biology and Agricultural Production. Agriculture, Ecosystems and Environment* 42, 9-26.

c. *For books* Gaugh, Jr., H.G., 1992. *Statistical Analysis of Regional Field Trials*. Elsevier, Amsterdam.

d. *For multi-author books* DeLacy, I.H., Cooper, M., Lawrence, P.K., 1990. Pattern analysis over years of regional variety trials: relationship among sites. In: Kang, M.S. (Ed.), *Genotype by Environment Interaction and Plant Breeding*. Louisiana State University, Baton Rouge, LA, pp. 189-213.

6. Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references according to the *Bibliographic Guide for Editors and Authors* (The Chemical Abstracts Service, The Ohio State University, Columbus, OH 43210, USA).

7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Roman alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.

8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".

9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
 2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
 3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.
- Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.
 Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999).... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon.* 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references according to the *Bibliographic Guide for Editors and Authors* (The Chemical Abstracts Service, The Ohio State University, Columbus, OH 43210, USA).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with

a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file.

Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 600 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

MethodsX

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple MethodsX articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. MethodsX, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible.

Authors are encouraged to submit their MethodsX article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in MethodsX. Full details can be found on the [MethodsX website](#). Please use [this template](#) to prepare your MethodsX article.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).