



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

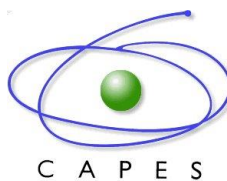
---

TATIANE VIEGAS DEBIASI

**ESTRATÉGIAS DE USO DE FONTES INORGÂNICAS DE  
NITROGÊNIO EM MUDAS DE ESPÉCIES ARBÓREAS  
NEOTROPICAIS DE DISTINTOS ESTÁGIOS SUCESSIONAIS**



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA



---

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Tatiane Viegas Debiasi

**ESTRATÉGIAS DE USO DE FONTES INORGÂNICAS DE  
NITROGÊNIO EM MUDAS DE ESPÉCIES ARBÓREAS  
NEOTROPICAIS DE DISTINTOS ESTÁGIOS SUCESSIONAIS**

---

Londrina - PR

2017

TATIANE VIEGAS DEBIASI

**ESTRATÉGIAS DE USO DE FONTES INORGÂNICAS DE  
NITROGÊNIO EM MUDAS DE ESPÉCIES ARBÓREAS  
NEOTROPICAIS DE DISTINTOS ESTÁGIOS SUCESSIONAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira

Londrina  
2017

TATIANE VIEGAS DEBIASI

**ESTRATÉGIAS DE USO DE FONTES INORGÂNICAS DE  
NITROGÊNIO EM MUDAS DE ESPÉCIES ARBÓREAS  
NEOTROPICAIS DE DISTINTOS ESTÁGIOS SUCESSIONAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos à obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

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

---

Prof. Dr. Werner Camargos Antunes  
Universidade Estadual de Maringá - UEM

---

Prof. Dr. Cristiano Medri (Suplente)  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Stolf Moreira (Suplente)  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 20 de fevereiro de 2017



CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS

*DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO*

Discente: Tatiane Viegas Debiasi

Título: "Estratégias de uso de fontes inorgânicas de nitrogênio em mudas de espécies arbóreas neotropicais de distintos estágios sucessionais"

Data da Defesa: 20 de fevereiro de 2017 as 14:00 horas. na sala da Pós-Graduação em Genética, desta Universidade.

**Banca Examinadora**

**Parecer**

Presidente:

Dr. Halley Caixeta de Oliveira

APROVADA

Titulares:

Dr. José Antonio Pimenta

APROVADA

Dr. Werner Camargos Antunes

APROVADA

Parecer Final APROVADA

Halley Caixeta de Oliveira

Dr. Halley Caixeta de Oliveira

Antonio Pimenta  
Dr. José Antonio Pimenta

werner c. antunes  
Dr. Werner Camargos Antunes

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Prescila e Milton, pelo apoio incondicional e paciência ao longo desses anos.

Ao meu irmão Leonardo, por todo carinho, hospitalidade e apoio.

Ao Anderson por todo amor, companheirismo, paciência e aprendizado.

Aos meus avós Aguinaldo, Narciza, Hermínia e Antônio, pelo exemplo de vida e perseverança.

Aos meus tios, Rita, Marcelo e Cidinha, por me receberem de braços abertos durante a temporada que fiquei em Campinas.

Ao professor Halley por sempre acreditar em mim e por todo o conhecimento transmitido.

Aos meus amigos de Bauru, que mesmo longe, sempre estiveram presentes.

Aos colegas de laboratório Mariana, Ligia, Angélica e Juliana, pela ajuda nas coletas, pela companhia nos congressos e por todos os momentos vividos.

Aos Profs. Drs. Renata Stolf Moreira, Edmilson Bianchini, José Antonio Pimenta pelo apoio e disponibilidade.

Ao Prof. Dr. Werner Camargo Antunes pela disposição à correção desta dissertação.

Aos funcionários do Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas (Labre), por toda ajuda para realização deste trabalho.

À Dr<sup>a</sup>. Cláudia Martinez, por disponibilizar seu laboratório para análises.

Aos professores Dr. Ladaslav Sodek e Dr. Marcos Aidar, por toda ajuda nas análises.

À CAPES, Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de estudos concedida.

À Universidade Estadual de Londrina, pela minha formação profissional.

Debiasi, Tatiane Viegas. **Estratégias de uso de fontes inorgânicas de nitrogênio em mudas de espécies arbóreas neotropicais de distintos estágios sucessionais.** 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## RESUMO

As plantas absorvem o nitrogênio do solo principalmente a partir das fontes inorgânicas nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e amônio ( $\text{NH}_4^+$ ). Diferentes espécies vegetais podem apresentar padrões específicos quanto à fonte de nitrogênio mineral preferencialmente utilizada, o que pode ser uma importante resposta adaptativa ao ambiente onde vivem. Esse trabalho teve como objetivo analisar as estratégias de uso de diferentes fontes inorgânicas de nitrogênio ( $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ ) por mudas de espécies arbóreas neotropicais pioneiras e não pioneiras. Foram selecionadas quatro espécies: duas pioneiras (*Heliocarpus popayanensis* Kunth e *Trema micrantha* (L.) Blume) e duas não pioneiras (*Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze e *Eugenia brasiliensis* Lam.). Analisou-se o efeito do cultivo em hidroponia com  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  sobre o crescimento e metabolismo do nitrogênio (conteúdo endógeno de compostos nitrogenados, atividade da enzima nitrato redutase e taxa de absorção das duas fontes de nitrogênio) de mudas dessas espécies. Além disso, foi medida a incorporação de  $^{15}\text{N}$  em aminoácidos na raiz e folhas após a incubação com  $^{15}\text{NO}_3^-$  ou  $^{15}\text{NH}_4^+$ . Verificou-se que as espécies pioneiras tiveram uso majoritário do  $\text{NO}_3^-$ , apresentando alta taxa de absorção desse ânion da solução e assimilando-o principalmente na folha, conforme verificado pela alta atividade de enzima nitrato redutase foliar, pelos altos níveis de  $\text{NO}_3^-$  na seiva do xilema e pelo maior enriquecimento com  $^{15}\text{N}$  em aminoácidos nas folhas em relação à raiz. Quando cultivadas com  $\text{NH}_4^+$ , apresentaram sintomas de toxicidade e tiveram o crescimento reduzido. As espécies não pioneiras não foram sensíveis à toxicidade do  $\text{NH}_4^+$ . Inclusive, *C. estrellensis* foi beneficiada pelo cultivo com esse cátion. As mudas dessa espécie absorveram igualmente as duas fontes de N e a assimilação do  $\text{NO}_3^-$  ocorreu principalmente nas folhas, de forma similar às pioneiras. Já as mudas de *E. brasiliensis* absorveram preferencialmente  $\text{NH}_4^+$  e, diferentemente do que ocorreu nas demais espécies, assimilaram o  $\text{NO}_3^-$  principalmente na raiz. Em todas as espécies, a assimilação do  $\text{NH}_4^+$  ocorreu predominantemente na raiz. Observaram-se também variações na translocação de compostos nitrogenados na seiva do xilema e no metabolismo de aminoácidos na raiz e folhas entre as espécies do mesmo grupo sucessional. No entanto, verificou-se nas espécies pioneiras predomínio de asparagina na raiz e na seiva do xilema, enquanto nas não pioneiras a glutamina foi o aminoácido mais abundante na raiz e na seiva do xilema. As diferentes respostas entre os grupos funcionais devem estar relacionadas a adaptações às condições de luminosidade e disponibilidade de nitrogênio dos ambientes onde essas espécies são encontradas. Além disso, a diferença quanto ao uso do  $\text{NO}_3^-$  entre as não-pioneiras pode ter relação com o estrato que essas espécies atingem ao longo do seu ciclo de vida, já que, ao contrário de *E. brasiliensis* (subosque), *C. estrellensis* atinge o dossel, o que poderia favorecer o uso do  $\text{NO}_3^-$ .

**Palavras-chave:** Aminoácidos. Amônio. Metabolismo do nitrogênio. Nitrato. Nitrato redutase. Pioneira.

Debiasi, Tatiane Viegas. **Strategies of use of inorganic nitrogen sources in seedlings of Neotropical tree species of different successional stages.** 2017. Dissertation (Master's degree in Biological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## ABSTRACT

Plants absorb nitrogen from soil mainly from the inorganic sources nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) and ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ). Different plant species may present specific patterns regarding the mineral nitrogen source preferentially used, which may be an important adaptive response to the environment where they live. This study aimed to analyze the strategies of use of different nitrogen inorganic sources ( $\text{NO}_3^-$  or  $\text{NH}_4^+$ ) by saplings of pioneer and non-pioneer neotropical tree species. Four species were selected: two pioneers (*Heliocarpus popayanensis* Kunth and *Trema micrantha* (L.) Blume) and two non-pioneers (*Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze and *Eugenia brasiliensis* Lam.). We analyzed the effect of cultivation in hydroponics with  $\text{NO}_3^-$  or  $\text{NH}_4^+$  on growth and nitrogen metabolism (content of endogenous nitrogen compounds, activity of nitrate reductase enzyme and absorption rate of the two nitrogen sources) of the seedlings of these species. Furthermore, we measured the incorporation of  $^{15}\text{N}$  into amino acids in the root and leaves after incubation with  $^{15}\text{NO}_3^-$  or  $^{15}\text{NH}_4^+$ . It was found that the pioneer species had preference for the use of  $\text{NO}_3^-$ , showing high absorption rate of this ion from the solution and assimilating it mainly in leaves, as verified by the high activity of leaf nitrate reductase, by the high levels of  $\text{NO}_3^-$  in xylem sap and by the higher  $^{15}\text{N}$  enrichment into amino acids in leaves in relation to the root. When grown with  $\text{NH}_4^+$ , they showed toxicity symptoms and reduced growth. On the other hand, non-pioneer species were not susceptible to  $\text{NH}_4^+$  toxicity. In fact, *C. estrellensis* was benefited by the cultivation with this cation. The seedlings of this species absorbed the two N sources equally, and the assimilation of  $\text{NO}_3^-$  occurred mainly in leaves, similarly to pioneers. *E. brasiliensis* seedlings absorbed preferentially  $\text{NH}_4^+$  and, unlike the other species, assimilated  $\text{NO}_3^-$  mainly in the root. In all studied species,  $\text{NH}_4^+$  assimilation occurred predominantly in the root. Variations in the translocation of nitrogen compounds in xylem sap, and in amino acid metabolism in roots and leaves, among species of the same successional group were also observed. However, it was found the prevalence of asparagine in the root and xylem sap in of the pioneer species, whereas in non-pioneers glutamine was the most abundant amino acid in the root and xylem sap. The different responses observed between the functional groups should be related to adaptations to light conditions and nitrogen availability of the environments where these species are found. Furthermore, the difference in  $\text{NO}_3^-$  use between non-pioneers may be related to the stratum that these species reach throughout their life cycle, since unlike *E. brasiliensis* (understory), *C. estrellensis* reaches the canopy, which could favor the use of  $\text{NO}_3^-$ .

**Keywords:** Amino acids. Ammonium. Nitrogen metabolism. Nitrate. nitrate reductase. Pioneer.

## LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1** Visão geral da absorção e assimilação de nitrogênio em plantas. Baseado em Hawkesford et al. (2012) ..... 2
- Fig. 2** Reações esquematizadas da assimilação de nitrogênio em plantas. Baseado em Bloom (2010). Ferredoxina (FdR), glutamina (Gln), ácido glutâmico (Glu) e asparagina (Asn) ..... 3

## ARTIGO

- Fig. 1** Mudas de *Heliocarpus popayanensis* (A), *Trema micrantha* (B), *Cariniana estrellensis* (C) e *Eugenia brasiliensis* (D) cultivadas com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup> como fonte de nitrogênio. Escala = 10 cm..... 28
- Fig. 2** Atividade da enzima nitrato redutase (NR) na raiz e folhas de mudas de *Heliocarpus popayanensis* (Hp), *Trema micrantha* (Tm), *Cariniana estrellensis* (Ce) e *Eugenia brasiliensis* (Eb) cultivadas com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> como fonte de nitrogênio. Os dados são médias ± erros-padrão (n = 4). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os órgãos e as espécies (ANOVA de dois fatores seguida de teste de Tukey; p < 0,05) ..... 29
- Fig. 3** Conteúdo total de aminoácidos (A e B) e proteínas (C e D) na raiz e folhas de mudas de *Heliocarpus popayanensis* (Hp), *Trema micrantha* (Tm), *Cariniana estrellensis* (Ce) e *Eugenia brasiliensis* (Eb) cultivadas com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup> como fonte de nitrogênio. Os dados são médias ± erros-padrão (n = 4). Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos de nitrogênio, para cada espécie, pelo teste F (ANOVA; p < 0,05) ..... 30
- Fig. 4** Conteúdo relativo de aminoácidos (mol%) presentes na seiva do xilema de mudas de *Heliocarpus popayanensis* (Hp), *Trema micrantha* (Tm), *Cariniana estrellensis* (Ce) e *Eugenia brasiliensis* (Eb) cultivadas com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup> como fonte de nitrogênio. Os dados são médias (n = 4). Asteriscos indicam diferenças significativas no conteúdo de cada aminoácido entre os tratamentos de N, para cada espécie, pelo teste F (ANOVA; p < 0,05). Apenas os aminoácidos que apresentaram uma quantidade em mol% superior a 3% são mostrados: Ala (alanina), Arg

	(arginina), Asn (aparagina), Asp (ácido aspártico), Cit (citrulina), Gln (glutamina), Glu (ácido glutâmico), GABA (ácido $\gamma$ -aminobutírico), Pro (prolina), Ser (serina) e Thr (treonina) .....	32
<b>Fig. 5</b>	Conteúdo de aminoácidos (mol%) presentes na raiz de mudas de <i>Heliocarpus popayanensis</i> (Hp), <i>Trema micrantha</i> (Tm), <i>Cariniana estrellensis</i> (Ce) e <i>Eugenia brasiliensis</i> (Eb) cultivadas com NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ou NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> como fonte de nitrogênio. Os dados são médias (n = 3). Asteriscos indicam diferenças significativas no conteúdo de cada aminoácido entre os tratamentos de N, para cada espécie, pelo teste F (ANOVA; p < 0,05). Os aminoácidos mostrados são Ala (alanina), Asn (aparagina), Asp (ácido aspártico), Gln (glutamina), Glu (ácido glutâmico), GABA (ácido $\gamma$ -aminobutírico), Pro (prolina), Ser (serina) e Thr (treonina). Os aminoácidos inclusos em “Outros” são Arg (arginina), Gly (glicina), Ile (isoleucina), Leu (leucina), Lys (lisina), Met (metionina), Phe (fenilalanina), Tyr (tirosina), His (histidina) e Val (valina). .....	36
<b>Fig. 6</b>	Conteúdo de aminoácidos (mol%) presentes nas folhas de mudas de <i>Heliocarpus popayanensis</i> (Hp), <i>Trema micrantha</i> (Tm), <i>Cariniana estrellensis</i> (Ce) e <i>Eugenia brasiliensis</i> (Eb) cultivadas com NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ou NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> como fonte de nitrogênio. Os dados são médias (n = 3). Asteriscos indicam diferenças significativas no conteúdo de cada aminoácido entre os tratamentos de N, para cada espécie, pelo teste F (ANOVA; p < 0,05). Os aminoácidos mostrados são Ala (alanina), Asn (aparagina), Asp (ácido aspártico), Gln (glutamina), Glu (ácido glutâmico), GABA (ácido $\gamma$ -aminobutírico), Pro (prolina), Ser (serina) e Thr (treonina). Os aminoácidos inclusos em “Outros” são Arg (arginina), Gly (glicina), Ile (isoleucina), Leu (leucina), Lys (lisina), Met (metionina), Phe (fenilalanina), Tyr (tirosina), His (histidina) e Val (valina) .....	38

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO

<b>Tabela 1</b>	Composição da solução nutritiva com as diferentes fontes de nitrogênio e suas concentrações finais ..... 21
<b>Tabela 2</b>	Área foliar e matéria seca da raiz e parte aérea de mudas de <i>Heliocarpus popayanensis</i> (Hp), <i>Trema micrantha</i> (Tm), <i>Cariniana estrellensis</i> (Ce) e <i>Eugenia brasiliensis</i> (Eb) cultivadas com NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ou NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> como fonte de nitrogênio. Os dados são médias ± erros-padrão (n = 9). Letras diferentes, nas colunas, indicam diferença significativa entre os tratamentos de nitrogênio, para cada espécie, pelo teste F (ANOVA; p < 0,05)..... 28
<b>Tabela 3</b>	Conteúdo relativo (em mol%) de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> e aminoácidos na seiva do xilema de mudas de <i>Heliocarpus popayanensis</i> (Hp), <i>Trema micrantha</i> (Tm), <i>Cariniana estrellensis</i> (Ce) e <i>Eugenia brasiliensis</i> (Eb) cultivadas com NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ou NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> como fonte de nitrogênio. Os dados são médias ± erros-padrão (n = 4). Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos de N, para cada espécie, pelo teste F (ANOVA; p < 0,05).....
<b>Tabela 4</b>	Taxa de absorção de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> e NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> e razão de absorção de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> por mudas de <i>Heliocarpus popayanensis</i> (Hp), <i>Trema micrantha</i> (Tm), <i>Cariniana estrellensis</i> (Ce) e <i>Eugenia brasiliensis</i> (Eb) cultivadas com NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ou NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> como fonte de N. Os dados são médias ± erros-padrão (n = 4). Asteriscos indicam diferenças significativas entre a absorção de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> e NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , para cada espécie, pelo teste F (ANOVA; p < 0,05) ..... 31
<b>Tabela 5</b>	Enriquecimento médio de 15N (%) em aminoácidos em raízes e folhas de mudas de <i>Heliocarpus popayanensis</i> (Hp), <i>Trema micrantha</i> (Tm), <i>Cariniana estrellensis</i> (Ce) e <i>Eugenia brasiliensis</i> (Eb) cultivadas com 15NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ou

	15NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> como fonte de nitrogênio, ambas enriquecidas com 20% de 15N. Os dados são médias ± erros-padrão (n = 3). Asteriscos indicam diferenças significativas no enriquecimento médio do 15N em aminoácidos entre raiz e folha, para cada fonte de N, pelo teste F (ANOVA; p < 0,05) .....	37
<b>Tabela Suplementar S1</b>	Enriquecimento em 15N (%) de aminoácidos em raízes e folhas de mudas de <i>H. popayanensis</i> cultivadas com NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ou NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> como fonte de N, ambas enriquecidas com 20% de 15N. Os dados são médias ± erros-padrão (n = 3). Asteriscos indicam diferenças significativas no enriquecimento do aminoácido em 15N entre raiz e folha, para cada fonte de N, pelo teste F (ANOVA; p < 0,05). Ala (alanina), Asn (aparagina), Asp (ácido aspártico), Gln (glutamina), Glu (ácido glutâmico), GABA (ácido γ-aminobutírico), Ser (serina) e Thr (treonina) .....	35
<b>Tabela Suplementar S2</b>	Enriquecimento em 15N (%) de aminoácidos em raízes e folhas de mudas de <i>T. micrantha</i> cultivadas com NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ou NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> como fonte de N, ambas enriquecidas com 20% de 15N. Os dados são médias ± erros-padrão (n = 3). Asteriscos indicam diferenças significativas no enriquecimento do aminoácido em 15N entre raiz e folha, para cada fonte de N, pelo teste F (ANOVA; p < 0,05). Ala (alanina), Asn (aparagina), Asp (ácido aspártico), Gln (glutamina), Glu (ácido glutâmico), GABA (ácido γ-aminobutírico), Ser (serina) .....	37
<b>Tabela Suplementar S3</b>	Enriquecimento em 15N (%) de aminoácidos em raízes e folhas de mudas de <i>C. estrellensis</i> cultivadas com NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ou NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> como fonte de N, ambas enriquecidas com 20% de 15N. Os dados são médias ± erros-padrão (n = 3). Asteriscos indicam diferenças significativas no enriquecimento do aminoácido em 15N entre raiz e folha, para cada fonte de N, pelo teste F (ANOVA; p < 0,05). Ala (alanina), Asp (ácido aspártico), Gln (glutamina), Glu	

(ácido glutâmico), GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico), Pro (prolina), Ser (serina) e Thr (treonina)..... 39

**Tabela Suplementar S4** Enriquecimento em 15N (%) de aminoácidos em raízes e folhas de mudas de *E. brasiliensis* cultivadas com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup> como fonte de N, ambas enriquecidas com 20% de 15N. Os dados são médias  $\pm$  erros-padrão (n = 3). Asteriscos indicam diferenças significativas no enriquecimento do aminoácido em 15N entre raiz e folha, para cada fonte de N, pelo teste F (ANOVA; p < 0,05). Ala (alanina), Asp (ácido aspártico), Gln (glutamina), Glu (ácido glutâmico), GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico), Ser (serina) ..... 40

## SUMÁRIO

RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	ii
LISTA DE FIGURAS .....	iii
LISTA DE TABELAS .....	v
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>7</b>
Estratégias de uso de fontes inorgânicas de nitrogênio em mudas de espécies arbóreas neotropicais de distintos estágios sucessionais.....	15
Resumo.....	16
Abstract .....	17
Introdução .....	18
Material e Métodos .....	20
<i>Local</i> .....	20
<i>Material vegetal</i> .....	20
<i>Experimento 1</i> .....	21
<i>Germinação</i> .....	21
<i>Cultivo das mudas sob adição controlada de nitrogênio inorgânico</i> .....	21
<i>Análise de crescimento</i> .....	21
<i>Extração dos metabólitos primários</i> .....	22
<i>Análise dos metabólitos primários</i> .....	22
<i>Determinação da atividade da enzima nitrato redutase</i> .....	23
<i>Coleta e análise da seiva do xilema</i> .....	23
<i>Experimento 2</i> .....	24
<i>Germinação e crescimento</i> .....	24
<i>Exposição às fontes enriquecidas em <sup>15</sup>N</i> .....	24
<i>Absorção das fontes de N</i> .....	24
<i>Determinação da incorporação do <sup>15</sup>N em aminoácidos</i> .....	25
<i>Análise estatística</i> .....	25
Resultados .....	26
<i>Crescimento das mudas</i> .....	26

<i>Metabolismo do nitrogênio na raiz e folhas das mudas</i> .....	27
<i>Translocação dos compostos nitrogenados pela seiva do xilema</i> .....	30
<i>Quantificação e identificação dos aminoácidos presentes na seiva do xilema</i> .....	31
<i>Absorção de <math>\text{NO}_3^-</math> e <math>\text{NH}_4^+</math> pelas raízes</i> .....	33
<i>Assimilação de <math>^{15}\text{NO}_3^-</math> e <math>^{15}\text{NH}_4^+</math> pela raiz e folha</i> .....	33
Discussão .....	40
Conclusões .....	47
Referências bibliográficas .....	48

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

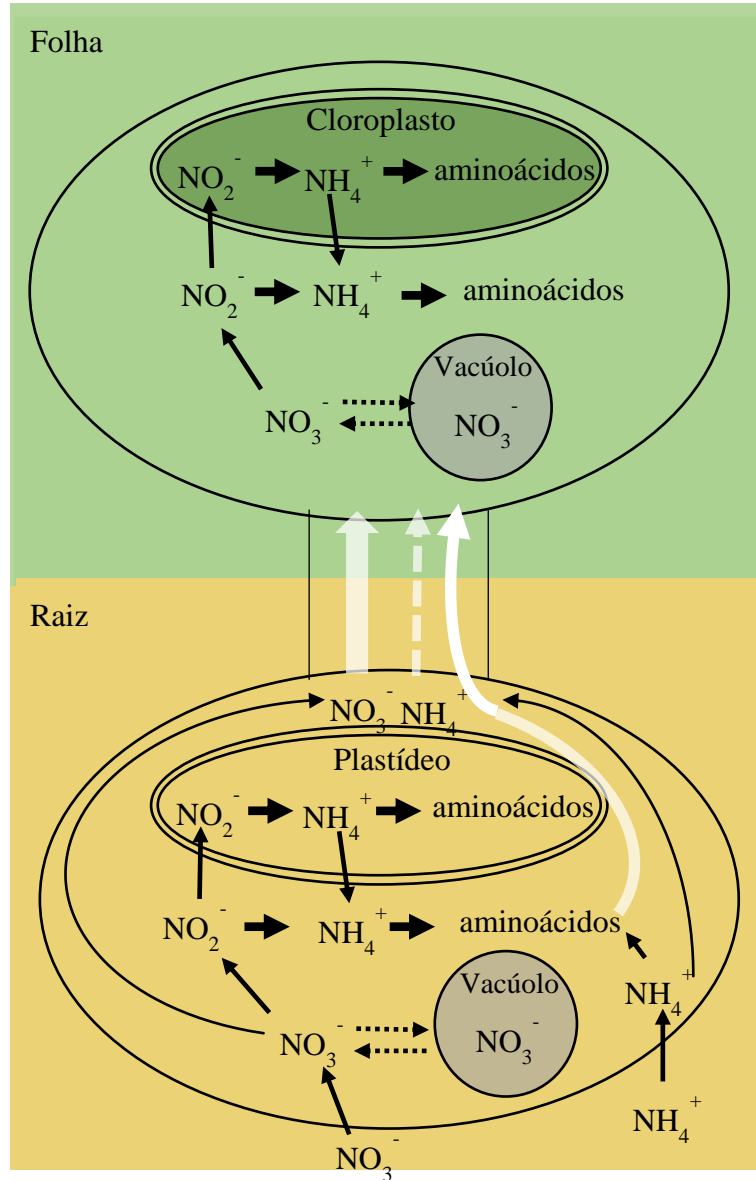
Em pouco mais de 500 anos, cerca de 93% da área da Mata Atlântica foi desmatada (SOS Mata Atlântica 2006) e, apesar da sua intensa destruição, continua sendo uma das florestas mais ricas em biodiversidade do planeta, sendo considerada um “hotspot” para a conservação da biodiversidade (Myers e Knoll 2001). Devido ao crescente desmatamento nos últimos anos, as exigências legais e a discussão sobre a necessidade de recuperação de áreas degradadas e recomposição florestal têm aumentado no Brasil, levando à maior demanda por mudas de espécies arbóreas neotropicais (Keller et al. 2009).

Muitas espécies lenhosas apresentam problemas de sobrevivência e crescimento de suas mudas após o plantio em áreas degradadas (Jacobs et al. 2004). Surgiu, portanto, a necessidade de se produzir mudas que tenham qualidades que favoreçam o estabelecimento no campo (Mattsson 1996). 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), mas a heterogeneidade do ambiente dificulta a identificação de mudas de alta qualidade, já que mudas mais adequadas para uma determinada área e tempo de plantio podem não ser ideais para outras condições ambientais (Cortina et al. 2013). A falta de conhecimento sobre as exigências ecofisiológicas das espécies nativas do Brasil é umas das principais razões do insucesso nos reflorestamentos (Cunha et al. 2005). Com isso, é de extrema importância o conhecimento das características morfológicas, fisiológicas e metabólicas das mudas, a fim de estabelecer os fatores que beneficiariam ou não a sua sobrevivência e o seu desenvolvimento inicial no campo.

O nitrogênio (N) é um dos nutrientes que exercem as maiores influências no crescimento e produtividade das plantas sob diferentes condições ambientais, por ser constituinte de biomoléculas essenciais como ácidos nucleicos, ATP, NADH, NADPH, clorofila, proteínas e enzimas (Cao e Tibbitts 1993; Harper 1994; Kraiser et al. 2011; Kusano et al. 2011). Este nutriente está disponível para plantas superiores terrestres em diferentes formas, que incluem principalmente formas inorgânicas ( $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ ) e moléculas orgânicas nitrogenadas (Bloom 1997; Harrison et al. 2007; Ashton et al. 2008).

O nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) é considerado a principal fonte de N inorgânico assimilado pelas plantas superiores, mas há evidências de que o amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) possa ser predominante em muitas situações (Stewart et al. 1993; Nardoto e Bustamante 2003). A absorção do  $\text{NO}_3^-$  (Fig. 1) pelas raízes ocorre de forma ativa por meio de vários cotransportadores  $\text{H}^+/\text{NO}_3^-$  de baixa ou alta afinidade (Crawford e Forde 2002; Miller et al. 2007). Já a absorção de  $\text{NH}_4^+$  (Fig. 1)

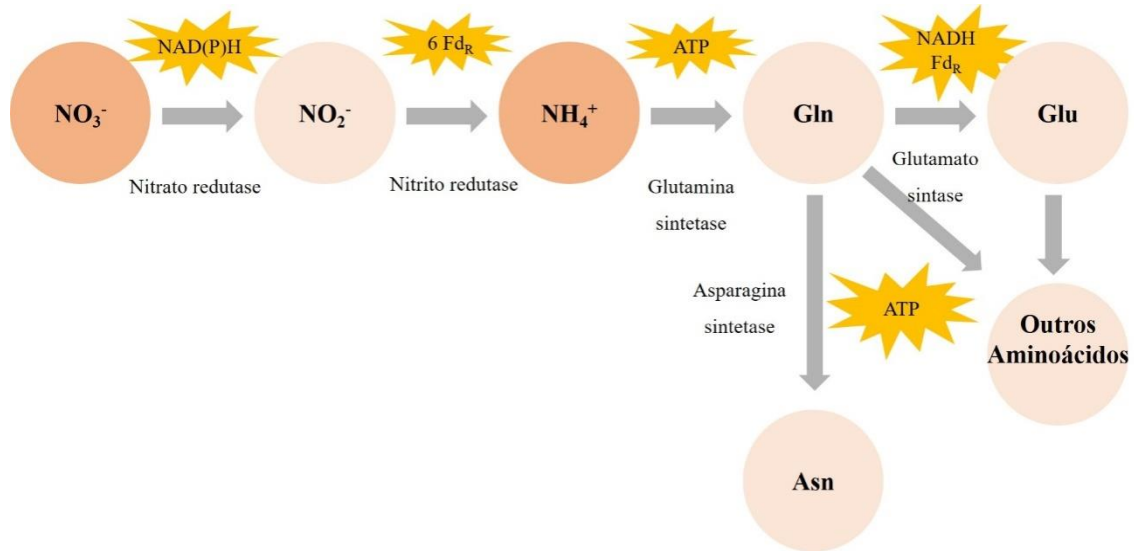
do solo pelas raízes das plantas ocorre de forma passiva por difusão através de canais proteicos, quando as concentrações externas desse íon são altas, e de forma ativa através de transportadores, quando as concentrações externas são baixas (Willians e Miller 2001).



**Fig. 1** Esquema geral da absorção e assimilação de nitrogênio em plantas. Baseado em Hawkesford et al. (2012).

O  $\text{NO}_3^-$  pode ser assimilado nas folhas ou nas raízes (Fig. 1), sendo que o primeiro passo da sua assimilação na planta é catalisado pela enzima nitrato redutase (NR) localizada no citoplasma, cujo doador de elétrons é o NAD(P)H (Fig. 2) (Meyer e Stitt 2001). Esta enzima é composta por três subunidades envolvidas na transferência de elétrons do NAD(P)H para o  $\text{NO}_3^-$ , que é reduzido a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) (Meyer e Stitt 2001). Nas folhas, o  $\text{NO}_2^-$  entra no cloroplasto, onde a enzima nitrito redutase catalisa sua redução a amônio ( $\text{NH}_4^+$ ). Nos tecidos

heterotróficos, como a raiz, o  $\text{NO}_2^-$  é reduzido nos plastídeos pela nitrito redutase. Nesse caso, os  $e^-$  para a redução de  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NH}_4^+$  são provenientes citosol, através do ciclo das pentoses e da glicólise, e nas mitocôndrias pelo ciclo do ácido tricarboxílico (Oaks e Hirel 1985; Meyer e Stitt 2001).



**Fig. 2** Reações esquematizadas da assimilação de nitrogênio em plantas. Baseado em Bloom (2010). Ferredoxina reduzida ( $\text{Fd}_R$ ), glutamina (Gln), glutamato (Glu) e asparagina (Asn).

A redução completa do  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NH}_4^+$  requer oito elétrons, sendo seu processo de assimilação mais eficiente na folha, onde o poder redutor para a redução do  $\text{NO}_3^-$  e os seis elétrons utilizados na redução do  $\text{NO}_2^-$  podem ser fornecidos diretamente pelas reações fotoquímicas no cloroplasto. Isso é particularmente vantajoso sob altas intensidades luminosas e a assimilação do carbono encontra-se saturada por luz (Smirnoff e Stewart 1985; Sodek 2004).

O  $\text{NH}_4^+$ , embora seja intermediário em muitas reações metabólicas, pode causar sintomas de toxicidade quando acumulado, como ocorre em plantas de várias espécies cultivadas com este cátion como fonte exclusiva de N (de Graaf et al. 1998; Britto e Kronzucker 2002). As células vegetais evitam essa toxicidade pela rápida assimilação do  $\text{NH}_4^+$  (Figs. 1 e 2), que foi gerado a partir da redução do  $\text{NO}_3^-$  ou da fotorrespiração, ou absorvido diretamente do meio externo (Krapp 2015). A enzima responsável pela assimilação do  $\text{NH}_4^+$  em aminoácidos é a glutamina sintetase (GS), que funciona mesmo em baixas concentrações de  $\text{NH}_4^+$ , catalisando a união deste com glutamato para formar glutamina. A eficiência desse processo é normalmente muito maior que a taxa de produção de  $\text{NH}_4^+$  pela redução do  $\text{NO}_3^-$  e/ou pelo processo de fotorrespiração, mantendo o  $\text{NH}_4^+$  em concentrações

baixas nos tecidos vegetais (Xu et al. 2012). A síntese de glutamato pode ser mediada pela enzima glutamina 2-oxoglutarato aminotransferase (GOGAT), em uma reação que necessita de dois elétrons fornecidos pela ferredoxina (no cloroplasto) ou NADH (em tecidos não verdes) (Meyer e Stitt 2001). O sistema GS-GOGAT é dominante para a síntese de glutamato em plantas superiores. A glutamina e o glutamato formados por esse processo irão fornecer o N para a síntese de outros aminoácidos (Oaks 1994).

Nem toda glutamina formada via GS segue pela GOGAT, ou seja, ela pode também ser exportada como composto de translocação de nitrogênio ou ser utilizada para a síntese de asparagina (Asn) e transportada nesta forma. Assim, o sistema GS-GOGAT tem duas finalidades: produção de aminoácidos para a síntese de proteínas no próprio tecido (suprindo a demanda local) e produção de glutamato e aspartato para a formação de amidas, que são translocadas para outros tecidos (Krapp 2015).

A exigência energética da assimilação do N varia em função da fonte de N disponível para a planta. O baixo custo energético na assimilação do  $\text{NH}_4^+$  pode ser importante para o crescimento de uma planta em ambientes onde a luz é fator limitante (Stewart et al. 1988), como é o caso de espécies não pioneiras. Por outro lado, o  $\text{NO}_3^-$  pode ser translocado em maiores concentrações pela seiva do xilema, podendo ser assimilado em aminoácidos nas raízes ou nas folhas, ao passo que o  $\text{NH}_4^+$  absorvido do solo é assimilado principalmente nas raízes e os aminoácidos formados são transportados no xilema (Engels e Marschner 1995; Oliveira et al. 2013).

A translocação de N na planta envolve compostos específicos e característicos da espécie, e pode variar, por exemplo, com as estações do ano e com a forma de nitrogênio nutricional (Pearsons e Sunley 2001). Os aminoácidos formados podem ser exportados pelo xilema (principalmente em raízes e caule) e floema (folhas). Já o  $\text{NO}_3^-$  não é translocado via floema, portanto sua presença no xilema é indicativa de absorção radicular e de assimilação foliar (Smirnoff e Stewart 1985)

No geral, predominam na seiva do xilema os produtos primários da assimilação do N, que são as amidas glutamina e asparagina e os aminoácidos glutamato e aspartato (Martins 2007). O acúmulo de arginina também é comum em muitas espécies de plantas, podendo constituir cerca de 40% do nitrogênio em sementes proteicas e cerca de 50% do pool livre total de nitrogênio em árvores frutíferas (Micallef e Shelp 1989). A arginina possui uma baixa razão C/N (=1,5), sendo um eficiente composto de reserva e de translocação de N. O N transportado pela seiva do xilema pode não ser exclusivamente de origem radicular, pois reservas de N podem ser remobilizadas (Moreno e Garcia-Matinez 1983). A remobilização e

retranslocação de nutrientes de folhas e tecidos senescentes para outros órgãos em crescimento ou de armazenamento são importantes estratégias na redução da perda de nutrientes, elevando a eficiência no uso do mesmo na planta (Vitousek 1984). Porém, o conhecimento sobre a remobilização de N nas espécies nativas brasileiras ainda é muito incipiente, havendo pouca informação disponível (Nardoto et al. 2006).

Diferentes espécies vegetais podem apresentar padrões específicos quanto à fonte de nitrogênio mineral preferencialmente utilizada, o que pode ser uma importante resposta adaptativa ao ambiente onde vivem. Um exemplo é a grande capacidade de utilização de  $\text{NO}_3^-$  por algumas espécies do gênero *Ficus*, associada à sua distribuição em solos com altas taxas de nitrificação e maior disponibilidade desse ânion (Schmidt e Stewart 1998). Diferentemente, outras espécies como arroz, cebola, alho-poró e várias espécies arbóreas de ecossistemas australianos com predomínio de  $\text{NH}_4^+$  no solo (como as florestas de eucaliptos) apresentam preferência pelo uso desse cátion (Turnbull et al. 1996; Schmidt e Stewart 1998).

Apesar da preferência por  $\text{NH}_4^+$  por algumas plantas, várias espécies podem apresentar sintomas de toxicidade quando cultivadas em solos com alta concentração de  $\text{NH}_4^+$ , na ausência de  $\text{NO}_3^-$  (Britto e Kronzucker 2002). Alguns sintomas de toxicidade estão relacionados com as alterações químicas na planta induzidas pela exposição ao  $\text{NH}_4^+$ , que incluem a deficiência de cátions essenciais como o potássio, cálcio e magnésio, em comparação com as plantas supridas com  $\text{NO}_3^-$  (Kirkby 1968; van Beusichem et al. 1988; Boxman et al. 1991; Holldampf e Barker, 1993; Troelstra et al. 1995; Gloser e Gloser 2000). Outros sintomas estão relacionados com elevados fluxos de  $\text{NH}_4^+$  em ambas as direções na membrana plasmática (Feng et al. 1994; Nielsen e Schjoerring 1998; Rawat et al. 1999; Min et al. 1999; Britto et al. 2001; Cerezo et al. 2001). Dado que tais fluxos podem exceder muito a capacidade de assimilação de  $\text{NH}_4^+$  da planta, deve ocorrer o acúmulo de  $\text{NH}_4^+$  no tecido (Hecht e Mohr 1990; Lang e Kaiser 1994; Wieneke e Roeb 1997; Husted et al. 2000) e/ou o aumento do efluxo de  $\text{NH}_4^+$  da planta. Baseado no aumento da respiração na raiz com a nutrição de  $\text{NH}_4^+$ , e na diminuição na razão raiz/parte aérea, alguns pesquisadores sugeriram que um dreno excessivo de carbono nos tecidos da raiz, onde a maior parte do metabolismo de  $\text{NH}_4^+$  acontece (Schortemeyer et al. 1997), é em parte responsável pela toxicidade do amônio.

Um importante exemplo da necessidade de se conhecer as relações de nitrogênio das mudas foi o estudo de Kronzucker et al. (1997). Esses autores demonstraram que a baixa capacidade de utilização do  $\text{NO}_3^-$  por plântulas de *Picea glauca* (Moench) Voss (Pinaceae) era um impedimento para o seu estabelecimento em áreas degradadas com predominância de  $\text{NO}_3^-$ , enquanto que a utilização de mudas de espécies mais adaptadas ao uso do  $\text{NO}_3^-$  poderia

resultar em reflorestamentos bem sucedidos. Dessa forma, há interesse ecológico e econômico em se identificar as estratégias de uso do nitrogênio por mudas de espécies arbóreas para que se torne possível estabelecer critérios na escolha das espécies que obtenham sucesso na recuperação de áreas degradadas em que as características nutricionais do solo e a forma de nitrogênio predominante sejam conhecidas.

Em alguns ecossistemas naturais, o  $\text{NH}_4^+$  é a fonte de N predominante (Bijlsma et al. 2000), inclusive em solos de Floresta Ombrófila Densa (Pereira-Silva 2008, Silva 2012) e Floresta Ombrófila Mista (Morena 2015). A abundância relativa do  $\text{NH}_4^+$  no solo, em relação ao  $\text{NO}_3^-$ , é determinada por vários fatores, sendo os mais importantes o acúmulo de matéria orgânica, pH, temperatura, oxigenação e presença de aleloquímicos (Britto e Kronzucker 2002). O baixo pH, a baixa temperatura, o acúmulo de aleloquímicos e o baixo suprimento de oxigênio inibem muitos microrganismos nitrificantes, diminuindo a nitrificação e provocando aumento da abundância de  $\text{NH}_4^+$  em relação ao  $\text{NO}_3^-$  (Vitousek et al. 1982; Stark e Hart 1997; Zhang et al. 2008). Solos com essas condições tendem a ser de áreas em sucessão avançada, enquanto solos ricos em  $\text{NO}_3^-$  tendem a ser de início de sucessão (Lodhi 1978; Britto e Kronzucker 2002).

Alguns estudos têm relacionado as características de aquisição e uso de N em plantas com sua classe sucessional (Stewart et al. 1988; Freedman et al. 1991; Pate et al. 1993; Aidar et al. 2003; Pereira-Silva 2008; Campos 2009; Silva 2012). De acordo com o modelo proposto por Aidar et al. (2003) para comunidade sucessional de Mata Atlântica, as espécies pioneiras apresentam alta capacidade de assimilação de  $\text{NO}_3^-$  pelas folhas, apontada pela elevada atividade da NR foliar, elevado conteúdo foliar de nitrogênio total e translocação de grande quantidade de  $\text{NO}_3^-$  pela seiva do xilema, seguido do aminoácido asparagina. Por outro lado, espécies secundárias tardias apresentam baixo conteúdo foliar de nitrogênio total e baixa atividade da NR nas folhas e, conseqüentemente, menor taxa de assimilação de  $\text{NO}_3^-$  nesse órgão, além de translocar principalmente aminoácidos como a asparagina e arginina pela seiva de xilema. As espécies secundárias iniciais apresentam características intermediárias entre os dois grupos. De acordo com Aidar et al. (2003), as estratégias de uso do nitrogênio desenvolvidas pelos grupos funcionais estão de acordo com as características ecológicas das espécies envolvidas.

Após esse estudo realizado por Aidar et al. (2003), estudos posteriores com abordagem similar confirmaram o modelo das estratégias de uso do nitrogênio ao longo da sucessão ecológica em outras regiões (Pereira-Silva 2008; Campos 2009; Silva 2012; Latansio-Aidar 2013). Todas essas análises foram realizadas em ecossistemas naturais (em condições de

campo) e, por inviabilidade técnica, não foram feitas análises das raízes. Dessa forma, se faz necessária uma análise integrada das relações entre o metabolismo do nitrogênio e aspectos do crescimento vegetal, incluindo análises do metabolismo do nitrogênio nas raízes, em plantas cultivadas sob condições controladas. Outro ponto a ser levantado é que os estudos acima citados foram realizados com indivíduos adultos. Dessa forma, torna-se essencial a realização de análises das estratégias de uso do nitrogênio por plantas jovens, a fim de se verificar se é possível a extrapolação do modelo proposto por Aidar et al. (2003) para mudas a serem utilizadas em programas de reflorestamento.

Estudos iniciais foram realizados na Universidade Estadual de Londrina, com mudas de espécies arbóreas nativas da Floresta Estacional Semidecidual cultivadas em areia contendo diferentes fontes de nitrogênio (dados não publicados). Foi observado que as espécies pioneiras apresentaram maior dependência por  $\text{NO}_3^-$  em relação às não pioneiras, corroborando o modelo proposto por Aidar et al. (2003). Também foram observadas variações dentro de um mesmo grupo sucessional quanto à sensibilidade ao  $\text{NH}_4^+$ , à forma de N predominante na seiva do xilema e ao principal órgão onde ocorre a assimilação do  $\text{NO}_3^-$ .

A fim de dar continuidade a esse estudo, a realização de um experimento em cultivo hidropônico propiciaria um maior controle sobre o meio de cultivo, pois a cada semana o meio seria renovado, mantendo constantes o pH e a quantidade de macro e micronutrientes. Além disso, essa forma de cultivo facilitaria o uso do isótopo estável  $^{15}\text{N}$ , cujo destino metabólico na planta pode ser acompanhado, constituindo uma maneira de elucidar diferenças no uso de N entre espécies de plantas (Robinson 2001).

Com isso, objetivou-se analisar o efeito do cultivo com fontes inorgânicas de nitrogênio ( $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ ) sobre o crescimento e o metabolismo de N de mudas de espécies arbóreas neotropicais pioneiras e não pioneiras cultivadas em hidroponia.

## **2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Aidar MPM, Schmidt S, Moss G, Stewart GR, Joly CA (2003) Nitrogen use strategies of neotropical rainforest trees in threatened Atlantic Forest. *Plant Cell Environ* 26:389-399

Ashton IW, Miller AE, Bowman WD, Suding KN (2008) Nitrogen preferences and plant-soil feedbacks as influenced by neighbors in the alpine tundra. *Oecologia* 156:625-636

Bijlsma RJ, Lambers H, Kooijman SALM (2000) A dynamic whole plant model of integrated metabolism of nitrogen and carbon. 1. Comparative ecological implications of ammonium-nitrate interactions. *Plant Soil* 220:49-69

Bloom AJ (1997) Nitrogen as a limiting factor: Crop acquisition of ammonium and nitrate. In: Jackson LE (ed) *Ecology in Agriculture*, pp 145-172, Academic Press, San Diego (ISBN 9780123782601)

Bloom AJ (2010) Assimilação de nutrientes minerais. In: Taiz L, Zeiger E (ed) *Plant physiology* 5 ed, pp 343-368. Sinauer Associates, Sunderland (ISBN 978-0878938667)

Boxman AW, Krabbendam H, Bellemakers MJS, Roelofs JGM (1991) Effects of ammonium and aluminum on the development and nutrition of *Pinus nigra* in hydroculture. *Environ Pollut* 73:119-136

Britto DT, Kronzucker HJ (2002)  $\text{NH}_4^+$  toxicity in higher plants: a critical review. *J Plant Physiol* 159:567-584

Britto DT, Siddiqi MY, Glass ADM, Kronzucker HJ (2001) Futile transmembrane  $\text{NH}_4^+$  cycling: a cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4255-4258

Campos MMS (2009) *Ecofisiologia de uso do N em espécies arbóreas da Floresta Ombrófila Densa das Terras Baixas, Ubatuba, SP.* (Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica/SMA – São Paulo/SP)

Cao W, Tibbitts TW (1993) Study of various  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  mixtures for enhancing growth of potatoes. *J Plant Nutr* 16:1691-1704

Cerezo M, Tillard P, Gojon A, Primo-Millo E, Garcia-Agustin P (2001) Characterization and regulation of ammonium transport systems in *Citrus* plants. *Planta* 214:97-105

Cortina J, Vilagrosa A, Trubat R (2013) The role of nutrients for improving seedling quality in drylands. *New Forest* 44:719-732

Crawford NM, Forde BJ (2002) Molecular and developmental biology of inorganic nitrogen nutrition. In: Somerville C, Meyerowitz E (eds) *Arabidopsis Book*, American Society of Plants Physiologists, Rockville (ISSN 15438120)

Cunha AO, Andrade LA, Bruno RLA, Silva JAL, Souza VC (2005) Efeitos de substratos e das dimensões dos recipientes na qualidade das mudas de *Tabebuia impetiginosa* (Mart. Ex D.C.) Standl. Rev Arvore 29:507-516

de Graaf MCC, Bobbink R, Jan GM, Roelofs M, Verbeek PJM (1998) Differential effects of ammonium and nitrate on three heathland species. *Plant Ecol* 135:185-196

Engels C, Marschner H (1995) Plant uptake and utilization of nitrogen. In: Bacon PE (ed) *Nitrogen fertilization in the environment*, pp 41-81. CRC Press, New York (ISBN 9780824789947)

Feng J, Volk RJ, Jackson WA (1994) Inward and outward transport of ammonium in roots of maize and sorghum: contrasting effects of methionine sulphoximine. *Plant Physiol* 5:429-439

Freedden AL, Griffin K, Field CB (1991) Effects of light quantity and quality and soil nitrogen status on nitrate reductase activity in rainforest species of the genus *Piper*. *Oecologia* 86:441-446

Gloser V, Gloser J (2000) Nitrogen and base cation uptake in seedlings of *Acer pseudoplatanus* and *Calamagrostis villosa* exposed to an acidified environment. *Plant Soil* 226:71-77

Halkesford M, Horst W, Kichey T, Lambers H, Schjoerring J, Moller IS, White P (2012) Functions of macronutrients. In: Marschner P (ed) *Marschner's mineral nutrition of higher plants*, 3 ed, pp 135-189. Elsevier, London (ISBN 978-0-12-384905-2)

Harper JE (1994) Nitrogen metabolism. In: Boote KJ, Bennet JM, Sinclair TR (eds) Physiology and determination of crop yield, pp 285-189. ASA/CSSA/SSSA, Madison (ISBN 0891181229)

Harrison KA, Bol R, Bardgett RD (2007) Preferences for different nitrogen forms by coexisting plant species and soil microbes. *Ecology* 88:989-999

Hecht U, Mohr H (1990) Factors controlling nitrate and ammonium accumulation in mustard (*Sinapis alba*) seedlings. *Physiol Plant* 78:379-387

Holldampf B, Barker AV (1993) Effects of ammonium on elemental nutrition of red spruce and indicator plants grown in acid soil. *Commun Soil Sci Plant Anal* 24:1945-1957

Husted S, Hebbern C, Mattsson M, Schjoerring JK (2000) A critical experimental evaluation of methods for determination of  $\text{NH}_4^+$  in plant tissue, xylem sap, and apoplastic fluid. *Physiol Plant* 109:167-179

Jacobs DF, Ross-Davis AL, Davis AS (2004) Establishment success of conservation tree plantations in relation to silvicultural practices in Indiana, USA. *New Forest* 28:23-36

Keller L, Leles PSS, Oliveira Neto SN (2009) Sistema de blocos prensados para produção de mudas de três espécies arbóreas nativas. *Rev Arvore* 33:305-314

Kirkby EA (1968) Influence of ammonium and nitrate nutrition on the cation-anion balance and nitrogen and carbohydrate metabolism of white mustard plants grown in dilute nutrient solutions. *Soil Sci* 105:133-141

Kraiser T, Gras DE, Gutiérrez AG, González B, Gutiérrez RA (2011) A holistic view of nitrogen acquisition in plants. *J Exp Bot* 62:1455-1466

Krapp A (2015) Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces. *Curr Opin Plant Biol* 25:115-122

Kronzucker HJ, Siddiqi MY, Glass ADM (1997) Conifer root discrimination against soil nitrate and the ecology of forest succession. *Nature* 385:59-61

Kusano M, Fukushima A, Redestig H, Saito K (2011) Metabolomic approaches toward understanding nitrogen metabolism in plants. *J Exp Bot* 62:1439-1453

Lang B, Kaiser WM (1994) Solute content and energy status of roots of barley plants cultivated at different pH on nitrate or ammonium nitrogen. *New Phytol* 128:451-459

Latansio-Aidar SR (2013) Economia do nitrogênio em árvores tropicais. (Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas – Campinas/SP)

Lodhi MAK (1978) Inhibition of nitrifying bacteria, nitrification, and mineralization of spoil soils as related to their successional stages. *Bull Torrey Bot Club* 106:284-289

Martins MCM (2007) Ecofisiologia do uso de reservas de carbono e nitrogênio ao longo do ciclo de vida de *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (Heyne) Lee & Lang. (Leguminosae, Caesalpinioideae). (Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica/SMA – São Paulo/SP)

Mattsson A (1996) Predicting field performance using seedling quality assessment. *New Forests* 13:227-252

Meyer C, Stitt M (2001) Nitrate reduction and signaling. In: Lea PJ, Morot-Gaudry JF (eds) *Plant Nitrogen*, pp 37-60. Springer, Berlin (ISBN 9783662040645)

Micallef BJ, Shelp BJ (1989) Arginine metabolism in developing soybean cotyledons. *Plant Physiol* 90:624-630

Miller AJ, Fan X, Orsel M, Smith SJ, Wells DM (2007) Nitrate transport and signalling. *J Exp Bot* 9:2297-2306

Min X, Siddiqi MY, Guy RD (1999) A comparative study of fluxes and compartmentation of nitrate and ammonium in early-successional tree species. *Plant Cell Environ* 22:821-830

Morena M (2015) Ecofisiologia do uso de nitrogênio em espécies arbóreas da Floresta Ombrófica Mista, Parque Estadual de Campos do Jordão, SP. (Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica/SMA – São Paulo/SP)

Moreno J, Garcia-Martinez JL (1983) Seasonal variation of nitrogenous compounds in the xylem sap of *Citrus*. *Physiol Plantarum* 59:669-675

Myers N, Knoll AH (2001). The biotic crises and the future of evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:5389-5392

Nardoto GB, Bustamante MMC (2003). Effects of fire on soil nitrogen dynamics and microbial biomass in savannas of Central Brazil. *Pesqui Agropecu Bras* 38:955-962

Nardoto GB, Bustamante MMC, Pinto AS, Klink CA (2006) Nutrient use efficiency at ecosystem and species level in savanna areas of Central Brazil impacts of fire. *J Trop Ecol* 22:191-201

Nielsen KH, Schjoerring JK (1998) Regulation of apoplastic  $\text{NH}_4^+$  concentration in leaves of oilseed rape. *Plant Physiol* 118:1361-1368

Oaks A (1994) Primary nitrogen assimilation in higher plants and its regulation. *Can J Botany* 72:739-750

Oaks A, Hirel B (1985) Nitrogen metabolism in roots. *Annu Rev Plant Physiol* 36:345-365

Oliveira HC, Freschi L, Sodek L (2013) Nitrogen metabolism and translocation in soybean plants subjected to root oxygen deficiency. *Plant Physiol Biochem* 66:141-149

Pate JS, Stewart GR, Unkovich M (1993)  $^{15}\text{N}$  natural abundance of plant and soil components of a *Banksia* woodland ecosystem in relation to nitrate utilization, life form, mycorrhizal status and N-fixing abilities of component species. *Plant Cell Environ* 16:365-373

Pearsons R, Sunley RJ (2001) Nitrogen nutrition and the role of root-shoot nitrogen signalling particularly in symbiotic systems. *J Exp Bot* 52:435-443

Pereira-Silva EFL (2008) Estratégias ecofisiológicas no uso de nitrogênio em espécies arbóreas de Floresta Ombrófila Densa Submontana e Estacional Semidecidual, SP. (Tese de Doutorado, Universidade de Campinas – Campinas/SP)

Rawat SR, Silim SN, Kronzucker HJ, Siddiqi MY, Glass ADM (1999) *AtAMT1* gene expression and  $\text{NH}_4^+$  uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*: evidence for regulation by root glutamine levels. *Plant J* 19:143-152

Schmidt S, Stewart GR (1998) Transport, storage and mobilization of nitrogen by trees and shrubs in the wet/dry tropics of northern Australia. *Tree Physiol* 18:403-410

Schortemeyer M, Stamp P, Feil B (1997) Ammonium tolerance and carbohydrate status in maize cultivars. *Ann Bot* 79:25-30

Silva JG (2012) Ecofisiologia do uso de nitrogênio em espécies arbóreas da Floresta Ombrófila Densa, Caraguatatuba, SP. (Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica/SMA – São Paulo/SP)

Smirnoff N, Stewart GR (1985) Nitrate assimilation and translocation by higher plants: Comparative physiology and ecological consequences. *Physiol Plant* 64:133-140

S.O.S Mata Atlântica (2006) Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica. Período 2000-2005. Estado de São Paulo

Sodek L (2004) Metabolismo do nitrogênio. In: Kerbauy GB (ed) *Fisiologia vegetal*, 2 ed, pp 65-81. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro (ISBN 9788527714457)

Stark JM, Hart SC (1997) High rates of nitrification and nitrate turnover in undisturbed coniferous forests. *Nature* 385:61-64

Stewart GR, Hegarty EE, Specht RL (1988) Inorganic nitrogen assimilation in plants of Australian rainforest communities. *Plant Physiol* 74:26-33

Stewart GR, Pate JS, Unkovich M (1993) Characteristics of inorganic nitrogen assimilation of plants in fireprone Mediterranean type vegetation. *Plant Cell Environ* 16:351-363

Robinson D (2001)  $\delta^{15}\text{N}$  as an integrator on the nitrogen cycle. *Trends Ecol Evol* 16:153-161

Troelstra SR, Wagenaar R, Smant W (1995) Nitrogen utilization by plants species from acid heathland soils. 1. Comparison between nitrate and ammonium nutrition at constant low pH. *J Exp Bot* 45:1103-1112

Turnbull MH, Schmidt S, Erskine PD, Richards S, Stewart GR (1996) Root adaptation and nitrogen source acquisition in natural ecosystems. *Tree Physiol* 16:941-948

van Beusichem ML, Kirkby EA, Baas R (1988) Influence of nitrate and ammonium nutrition on the uptake, assimilation, and distribution of nutrients in *Ricinus communis*. *Plant Physiol* 86:914-921

Vitousek PM (1984) Litterfall, nutrient cycling, and nutrient limitation in tropical forests. *Ecology* 65:285-298

Vitousek PM, Gosz JR, Grier CC, Melillo JM, Reiners WA (1982) A comparative analysis of potential nitrification and nitrate mobility in forest ecosystems. *Ecol Monogr* 52:155-177

Wieneke J, Roeb GW (1997) Effect of methionine sulphoximine on  $^{13}\text{N}$ -ammonium fluxes in the roots of barley and squash seedlings. *Z Pflanzenernaehr Bodenkd* 161:1-7

Williams LE, Miller AJ (2001) Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. *Annu Rev Plant Phys* 52:659-688

Xu G, Fan X, Miller AJ (2012) Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annu Rev Plant Biol* 63:153-182

Zhang X, Qibing W, Li L, Han X (2008) Seasonal variations in nitrogen mineralization under three land use types in a grassland landscape. *Acta Oecol* 34:322-330

**Estratégias de uso de fontes inorgânicas de nitrogênio em mudas de espécies arbóreas neotropicais de distintos estágios sucessionais cultivadas em hidroponia**

Tatiane Viegas Debiasi<sup>1\*</sup>, Halley Caixeta de Oliveira<sup>2</sup>,

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 Km 380, Campus Universitário, CEP 86057-970 Londrina, PR.

<sup>2</sup>Professor do Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina (UEL). Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 Km 380, Campus Universitário, CEP 86057-970 Londrina, PR.

\*Autor para correspondência: Telefone (043) 3025-2310, E-mail: debiasi.tatiane@hotmail.com

**Pretende-se submeter este artigo para a revista Planta**

**Regras:**

[http://www.springer.com/life+sciences/plant+sciences/journal/425?detailsPage=pltc\\_i\\_1060417](http://www.springer.com/life+sciences/plant+sciences/journal/425?detailsPage=pltc_i_1060417)

## Resumo

Diferentes espécies vegetais podem apresentar padrões específicos quanto à fonte de nitrogênio preferencialmente utilizada, o que pode ser uma importante resposta adaptativa ao seu habitat. Esse trabalho teve como objetivo analisar as estratégias de uso de fontes inorgânicas de nitrogênio por mudas de espécies arbóreas neotropicais pioneiras (*Heliocarpus popayanensis* Kunth e *Trema micrantha* (L.) Blume) e não pioneiras (*Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze e *Eugenia brasiliensis* Lam.). Para isso, analisou-se o efeito do cultivo em hidroponia com nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) sobre o crescimento, o metabolismo e a translocação do nitrogênio em mudas dessas espécies. Também foi acompanhada a incorporação do  $^{15}\text{N}$  em aminoácidos após a incubação com  $^{15}\text{NO}_3^-$  ou  $^{15}\text{NH}_4^+$ . As espécies pioneiras tiveram uso majoritário do  $\text{NO}_3^-$ , apresentando alta taxa de absorção e translocação desse ânion e assimilando-o principalmente na folha, conforme verificado pela alta atividade de enzima nitrato redutase foliar, pelos altos níveis de  $\text{NO}_3^-$  na seiva do xilema e pelo padrão de enriquecimento de aminoácidos em  $^{15}\text{N}$ . As espécies pioneiras tiveram o crescimento reduzido na presença de  $\text{NH}_4^+$ , ao passo que as não pioneiras foram tolerantes a esse cátion. Entre as não pioneiras, verificou-se que a espécie de subosque *E. brasiliensis* assimilou esse ânion principalmente nas raízes, enquanto em *C. estrellensis* (espécie de dossel) a assimilação ocorreu principalmente nas folhas. Observaram-se também variações na translocação de compostos nitrogenados na seiva do xilema e no metabolismo de aminoácidos na raiz e folhas entre as espécies do mesmo grupo sucessional. As diferentes respostas devem estar relacionadas a adaptações às diferentes condições de luminosidade e disponibilidade de nitrogênio dos ambientes onde essas espécies são encontradas.

**Palavras-chave:** aminoácidos; amônio; isótopo estável  $^{15}\text{N}$ ; metabolismo do nitrogênio; nitrato; nitrato redutase; pioneira.

## Abstract

Different plant species may present specific patterns regarding the nitrogen source preferentially used, which may be an important adaptive response to their habitat. This study aimed to analyze the strategies of use of inorganic nitrogen sources by seedlings of pioneer (*Heliocarpus popayanensis* Kunth and *Trema micrantha* (L.) Blume) and non-pioneer (*Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze and *Eugenia brasiliensis* Lam.) neotropical tree species. We analyzed the effect of hydroponic cultivation with nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) or ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) on growth and nitrogen metabolism and translocation of seedlings.  $^{15}\text{N}$  incorporation into amino acids was also monitored after incubation with  $^{15}\text{NO}_3^-$  or  $^{15}\text{NH}_4^+$ . Pioneer species had preference for the use of  $\text{NO}_3^-$ , showing a high absorption rate of this ion and assimilating it mainly in leaves, as verified by the high activity of leaf nitrate reductase, by the high levels of  $\text{NO}_3^-$  in the xylem sap and by the  $^{15}\text{N}$  enrichment pattern into amino acids. Pioneer species showed reduced growth in the presence of  $\text{NH}_4^+$ , whereas non-pioneers were tolerant to this cation. Among the non-pioneers, the understory species *E. brasiliensis* assimilated this anion mainly in roots, whereas in *C. estrellensis* (canopy species) the assimilation occurred predominantly in leaves. Variations in the translocation of nitrogen compounds in xylem sap and in amino acid metabolism in roots and leaves among species of the same successional group were also observed. The different responses might be related to adaptations to different light conditions and nitrogen availability of the microsites where these species are found.

**Keywords:** amino acids; ammonium; nitrogen metabolism; nitrate; nitrate reductase; pioneer; stable isotope  $^{15}\text{N}$ .

## Introdução

O nitrogênio (N) é considerado um importante nutriente que limita crescimento e produtividade das plantas, pois constitui biomoléculas essenciais como ácidos nucleicos, ATP, NADH, NADPH, clorofilas e proteínas (Kraiser et al. 2011). Este nutriente está disponível para as plantas superiores terrestres predominantemente nas formas inorgânicas nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) (Miller e Cramer 2004).

A absorção do  $\text{NO}_3^-$  pelas raízes ocorre de forma ativa por meio de vários cotransportadores  $\text{H}^+/\text{NO}_3^-$  (Miller et al. 2007). Após absorvido, o  $\text{NO}_3^-$  é reduzido a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) nas folhas ou nas raízes pela enzima nitrato redutase (NR) citoplasmática, com uso de poder redutor na forma de NADH ou NADPH (Meyer e Stitt 2001). O  $\text{NO}_2^-$  é reduzido a  $\text{NH}_4^+$  pela enzima nitrito redutase nos cloroplastos ou nos plastídeos, com uso de poder redutor da ferredoxina reduzida ou do NADPH (Oaks e Hirel 1985; Meyer e Stitt 2001). Por sua vez, o  $\text{NH}_4^+$  resultante dessa reação, assim como o  $\text{NH}_4^+$  diretamente absorvido passiva ou ativamente pelas raízes, é assimilado em aminoácidos pela ação sequencial das enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamina-2-oxoglutarato aminotransferase (GOGAT) (Krapp 2015).

Dessa forma, o processo de absorção e assimilação do nitrogênio mineral envolve o gasto de grandes quantidades de energia pelas células vegetais, o qual é mais elevado quando o  $\text{NO}_3^-$  é usado em comparação à utilização direta de  $\text{NH}_4^+$  (Bloom 1997). Por outro lado, enquanto o  $\text{NO}_3^-$  pode ser estocado em altas concentrações nas células (Dechorgnat et al. 2011), o  $\text{NH}_4^+$  pode levar a efeitos tóxicos quando acumulado, sendo assim rapidamente assimilado após sua absorção direta ou formação a partir da redução do nitrito (Zhu et al. 2000; Hachiya et al. 2010).

Diferentes espécies vegetais podem apresentar padrões específicos quanto à fonte de nitrogênio inorgânico predominantemente utilizada, o que pode ser uma importante resposta adaptativa ao ambiente onde vivem. Tipicamente, solos de ambientes temperados em estágio inicial de sucessão tendem a ter predomínio de  $\text{NO}_3^-$ , enquanto solos de áreas de sucessão ecológica avançada são ricos em  $\text{NH}_4^+$  (Britto e Kronzucker 2002). De acordo com um modelo proposto por Aidar et al. (2003), espécies arbóreas neotropicais pioneiras, encontradas em clareiras e nas bordas da floresta, locais com maior disponibilidade de luz, apresentam alta capacidade de assimilação do  $\text{NO}_3^-$ , conforme indicado pela elevada atividade da NR nas folhas e pela translocação de grandes concentrações de  $\text{NO}_3^-$  pela seiva do xilema. Por outro lado, espécies não pioneiras (tolerantes à sombra) apresentam menor capacidade de

assimilação do  $\text{NO}_3^-$ , com baixa atividade da NR nas folhas e predomínio da translocação dos aminoácidos asparagina e arginina pela seiva do xilema, indicando assimilação de  $\text{NH}_4^+$  predominantemente na raiz. Como parte da energia química para assimilação do  $\text{NO}_3^-$  nas folhas provém do transporte fotossintético de elétrons, a utilização dessa fonte de N é vantajosa em ambientes onde a luz não é um fator limitante (Smirnoff e Stewart 1985). Diferentemente, a assimilação foliar de  $\text{NO}_3^-$  não seria vantajosa em ambientes sombreados onde predominam as espécies não pioneiras, favorecendo a assimilação de outras fontes nitrogenadas pelas raízes, como o  $\text{NH}_4^+$ , e processos de remobilização do nitrogênio endógeno (Aidar et al. 2003).

Vários estudos feitos em campo corroboraram o modelo proposto por Aidar et al. (2003), como os de Campos (2009); Marchiori (2012); Silva (2012) e Latansio- Aidar (2013), mas ainda há lacunas a serem preenchidas no que diz respeito as estratégias utilizadas pelas plantas no uso de diferentes fontes inorgânicas de N, como a absorção e assimilação do N pela raiz e a análise dos compostos nitrogenados presentes na raiz e folhas.

Um estudo realizado por Oliveira et al. (2017), no qual se utilizaram mudas de espécies arbóreas nativas da Floresta Estacional Semidecidual, cultivadas em areia contendo diferentes fontes de nitrogênio, mostrou que as espécies pioneiras, de fato, tiveram elevada dependência pelo  $\text{NO}_3^-$  em relação às não pioneiras, corroborando o modelo proposto por Aidar et al. (2003). Além disso, as espécies pioneiras, quando tratadas com  $\text{NH}_4^+$ , apresentaram crescimento reduzido e alterações em parâmetros fisiológicos, sugerindo que essas espécies apresentaram sintomas de toxicidade ao  $\text{NH}_4^+$ . Foram observadas variações entre as espécies não pioneiras quanto à sensibilidade ao  $\text{NH}_4^+$ , à forma de N predominante na seiva do xilema e ao principal órgão onde ocorre a assimilação do  $\text{NO}_3^-$ .

Todavia, estudos mais aprofundados são necessários a fim de confirmar esses resultados e abordar outros aspectos das estratégias de uso do N das mudas. Neste caso, a realização de um experimento em cultivo hidropônico propiciaria um maior controle sobre os nutrientes e o pH do meio de cultivo. Além disso, essa forma de cultivo facilita a análise da absorção de N pela raiz e o uso do isótopo estável  $^{15}\text{N}$ , cujo destino metabólico na planta pode ser acompanhado, constituindo uma maneira de elucidar diferenças no uso de N entre espécies de plantas (Robinson 2001).

Dessa forma, objetivou-se analisar o efeito do cultivo com diferentes fontes inorgânicas de nitrogênio ( $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ ) sobre o crescimento e o metabolismo e translocação de N de mudas de espécies arbóreas neotropicais pioneiras e não pioneiras cultivadas em hidroponia. Foram levantadas as seguintes hipóteses: i - As espécies pioneiras apresentam

maior crescimento no tratamento com  $\text{NO}_3^-$  e apresentam sensibilidade à toxicidade do  $\text{NH}_4^+$ , enquanto as espécies não pioneiras apresentam maior crescimento no tratamento com  $\text{NH}_4^+$ . ii - As espécies pioneiras absorvem preferencialmente o  $\text{NO}_3^-$ , enquanto as espécies não pioneiras absorvem preferencialmente o  $\text{NH}_4^+$ . iii - Nas espécies pioneiras, a assimilação do  $\text{NO}_3^-$  ocorre principalmente nas folhas, enquanto a assimilação do  $\text{NH}_4^+$  ocorre principalmente na raiz. Já nas espécies não pioneiras a assimilação das duas fontes de nitrogênio ocorre principalmente na raiz. iv- Há padrões no metabolismo de aminoácidos em raiz e folha e na translocação desses compostos nitrogenados pela seiva do xilema entre espécies de um grupo sucessional.

## **Material e Métodos**

### ***Local***

O experimento foi realizado na casa de vegetação do Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, no município de Londrina, PR (23°19'29''S e 51°11'51''O), em altitude média de 566 m e clima do tipo Cfa, segundo Köppen, com precipitação média anual de 1615 mm (IAPAR 2000).

### ***Material vegetal***

Para o presente estudo, foram escolhidas quatro espécies arbóreas nativas que ocorrem na Floresta Estacional Semidecidual, duas espécies arbóreas pioneiras: *Heliocarpus popayanensis* Kunth. (Malvaceae), popularmente conhecida como jangadeiro, característica de bordas de matas e florestas secundárias (Lorenzi 2008); e *Trema micranta* (L.) Blume (Cannabaceae), popularmente conhecida como candiúba, distribuída em todos os biomas brasileiros, exceto em ambientes muito úmidos (Carvalho 1994). As outras duas espécies escolhidas são de estágios mais tardios da sucessão (tolerantes à sombra): *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze (Lecythidaceae), espécie que atinge o dossel, popularmente conhecida como jequitibá-branco, com ocorrência em Floresta Ombrófila Densa e Floresta Estacional Semidecidual, da Bahia a Santa Catarina (Carvalho 2003); e *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae), típica de subosque, popularmente conhecida como grumixama, com ocorrência do sul da Bahia até Santa Catarina (Kohama et al. 2006). As quatro espécies são empregadas em programas de reflorestamento desenvolvidos pelo viveiro do Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas (LABRE), da Universidade Estadual de Londrina.

## ***Experimento 1***

### ***Germinação***

As sementes foram germinadas em caixas com areia esterilizada. Todas as sementes foram previamente limpas. Após a completa expansão do primeiro eofilo, as plântulas foram transferidas para a hidroponia, onde foram submetidas aos diversos tratamentos.

### ***Cultivo das mudas sob adição controlada de nitrogênio inorgânico***

Cada muda foi cultivada em recipiente com 550 mL de volume total, em meio hidropônico aerado continuamente, que foi renovado semanalmente a fim de manter o pH próximo a 5,5. Ao todo foram cultivados 20 indivíduos de cada espécie, sendo 10 para cada tratamento ( $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ ). Os recipientes correspondentes a cada tratamento foram preenchidos com soluções nutritivas distintas, descritas na tabela 1.

Os vasos foram mantidos em casa de vegetação por dois meses e os parâmetros morfológicos e metabólicos das espécies foram analisados no final do experimento.

### ***Análise de crescimento***

Foram avaliados os seguintes parâmetros morfológicos das mudas: matéria seca (MS) da raiz e da parte aérea (PA) (g), taxa de crescimento relativo (TCR) das raízes e da PA ( $\text{mg g}^{-1} \text{dia}^{-1}$ ) e área foliar total ( $\text{cm}^2$ ).

**Tabela 1** Composição da solução nutritiva com as diferentes fontes de nitrogênio e suas concentrações finais.

<b>Sal</b>	<b><math>\text{NO}_3^-</math></b>	<b><math>\text{NH}_4^+</math></b>
<b><math>(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4^*</math></b>	-	1 mM
<b><math>\text{KNO}_3^*</math></b>	2 mM	-
<b><math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math></b>	0,5 mM	0,5 mM
<b><math>\text{K}_2\text{SO}_4</math></b>	1 mM	1 mM
<b><math>\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}</math></b>	1 mM	1 mM
<b><math>\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}</math></b>	1 mM	1 mM
<b><math>\text{FeSO}_4 \cdot \text{EDTA}</math></b>	100 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
<b><math>\text{H}_3\text{BO}_3</math></b>	46,25 $\mu\text{M}$	46,25 $\mu\text{M}$
<b><math>\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}</math></b>	9 $\mu\text{M}$	9 $\mu\text{M}$

<b>ZnCl<sub>2</sub></b>	0,75 $\mu$ M	0,75 $\mu$ M
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	0,28 $\mu$ M	0,28 $\mu$ M
<b>CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	0,331 $\mu$ M	0,331 $\mu$ M

\* A solução livre de nitrogênio, mencionada no “Experimento 2” não contém (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> nem KNO<sub>3</sub>.

Para a determinação da matéria seca, os componentes das mudas foram separados, acondicionados em sacos de papel e secos em estufa à temperatura de 60°C por quatro dias até atingirem peso constante. A TCR foi calculada através da equação  $(\overline{\ln MSf} - \overline{\ln MSi})/t$  (Hoffman e Poorter 2002), em que MSf = massa seca final, MSi = massa seca inicial e t = representa o tempo de duração do experimento em dias. A MSi foi obtida no dia zero do experimento, antes de as plântulas serem submetidas aos tratamentos, quando a média da MS da raiz e da PA de cinco indivíduos de cada espécie foi determinada. A área foliar total foi obtida através do integrador de área foliar modelo LI-3000C (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA).

#### *Extração dos metabólitos primários*

Para a extração dos metabólitos, foram coletadas a porção apical das raízes e as duas folhas mais jovens completamente expandidas. As amostras foram trituradas em N<sub>2</sub> líquido e os aminoácidos foram extraídos com a solução de MCW (metanol:clorofórmio:água, 12:5:3, v/v/v) por 24 h (Oliveira e Sodek 2013). Após centrifugação a 1800 xg por 30 min, foram adicionados 1 volume de clorofórmio e 1,5 volume de água a cada 4 volumes do sobrenadante obtido. A fase aquosa foi separada após 24 h e mantida a 37°C por 15 h para concentração da amostra, antes de ser congelada. As proteínas foram extraídas por 24 h com NaOH 0,1 M a partir do resíduo resultante da extração com MCW.

#### *Análise dos metabólitos primários*

O conteúdo de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> foi determinado através da sua redução a NO<sub>2</sub><sup>-</sup> pelo catalisador cloreto de vanádio (VCl<sub>3</sub> 0,4% em HCl 0,5 N). O NO<sub>2</sub><sup>-</sup> resultante foi dosado usando reagente de Griess (sulfanilamida 1% em HCl 1,5 N seguida da adição de N- (naftil)-etilenodiamina 0,02%) com posterior leitura da absorbância a 540 nm (Miranda et al. 2001).

O NH<sub>4</sub><sup>+</sup> foi dosado pela reação de Berthelot com uso de dois reagentes: reagente 1 (fenol 1% e nitroprussiato de sódio 0,2 mM) e reagente 2 (NaOH 125 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 150 mM

e NaClO 0,12%). Após a reação de 35 min a 37 °C, o conteúdo de  $\text{NH}_4^+$  foi determinado pela leitura da absorbância a 625 nm (McCullough 1967).

O conteúdo de aminoácidos livres totais foi determinado utilizando tampão citrato 0,2 M (pH 5), ninhidrina 5% (em metilcelusolve) e KCN 0,01M (em metilcelusolve). Após a adição dos reagentes, os tubos de ensaio foram tampados e mantidos a 100 °C por 20 min. Por fim, foi adicionado etanol 60% e feita a quantificação pela leitura da absorbância a 570 nm (Yemm e Cocking 1955).

O conteúdo de proteínas foi determinado utilizando o reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 da Bio-Rad, seguindo as especificações do fabricante (Bradford 1976).

Em todas as análises espectrofotométricas, a determinação das absorbâncias foi realizada utilizando-se um leitor de microplacas modelo Spectra Max Plus 384 (Molecular Devices, China).

#### *Determinação da atividade da enzima nitrato redutase*

A porção apical das raízes e as duas folhas mais jovens completamente expandidas foram coletadas e imediatamente utilizadas para a análise enzimática. A atividade da enzima nitrato redutase (NR) foi determinada *in vivo* baseando-se no método proposto por Stewart et al. (1986). Amostras de raízes e folhas (0,15 g) de mudas cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  foram cortadas em segmentos e transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL do meio de reação ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,05 M pH 7,5; propanol 1%;  $\text{KNO}_3$  0,05 M). Os tubos foram mantidos a temperatura ambiente sob vácuo (para a infiltração do meio de reação nos tecidos) e no escuro e, após 40 min, uma alíquota do meio foi coletada para a dosagem do  $\text{NO}_2^-$  formado utilizando-se o reagente de Griess (Hageman e Reed 1980).

#### *Coleta e análise da seiva do xilema*

A seiva do xilema foi extraída a partir da porção apical do caule utilizando-se uma câmara de pressão do tipo Schölander, conforme o procedimento descrito por Jaeger et al. (2009). A seiva coletada foi diretamente utilizada para as análises de aminoácidos livres totais,  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ , utilizando os métodos descritos anteriormente.

A composição e a concentração individual dos aminoácidos livres presentes na seiva do xilema foram analisadas usando a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência -UPLC (Waters Acquity UPLC® system- Waters, Milford, MA, USA- com detector de fluorescência). A derivatização foi realizada seguindo o protocolo do kit AccQ-Tag de derivatização da Waters modificado. As amostras de seiva foram centrifugadas por 20

minutos a 8000 rpm, e 10  $\mu\text{L}$  delas foram adicionados a 70  $\mu\text{L}$  tampão borato e 20  $\mu\text{L}$  de 6 aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC), agitadas por 10 segundos em vortex e posteriormente aquecidas em banho-maria a 55°C por 10 minutos. A separação foi realizada com a coluna AccQ.Tag Ultra Column C18 (2,1x100 mm 1,7  $\mu\text{m}$ ), a 60 °C com os seguintes eluentes: A- AccQ.Tag Ultra Eluent A (10% em água), B- AccQ. Tag Ultra Eluent B (100%), em fluxo de 0,7 mL/minuto. Os aminoácidos foram detectados em UV no comprimento de onda de 260 nm. Para evitar contaminação da coluna pela amostra, após cada injeção a coluna era lavada com 200  $\mu\text{L}$  de acetonitrila 95% em água e posteriormente com 600  $\mu\text{L}$  acetonitrila 5% em água. Essas análises foram realizadas no Instituto de Botânica de São Paulo, com a colaboração do Prof. Dr. Marcos Pereira Marinho Aidar.

## ***Experimento 2***

### *Germinação e crescimento*

As sementes das espécies arbóreas foram germinadas conforme descrito para o Experimento 1. Após a expansão do primeiro eofilo, as plântulas foram transferidas para vasos com areia (3 plântulas por vaso), onde foram regadas duas vezes por semana com a mistura das soluções da tabela 1, obtendo 1 mM de  $\text{KNO}_3$  e 0,5mM de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Após dois meses, as plantas foram transferidas para a hidroponia, em frascos de 550 mL contendo a mesma solução.

### *Exposição às fontes enriquecidas em $^{15}\text{N}$*

Após sete dias de cultivo em hidroponia para aclimatação, as plantas foram transferidas para frascos de 150 mL contendo a solução nutritiva livre de N (Tabela 1), para que fosse consumido o conteúdo endógeno de N, sob aeração. Após um dia, a solução foi suplementada com 2 mM  $\text{K}^{15}\text{NO}_3$  ou 1 mM  $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (ambos com enriquecimento em  $^{15}\text{N}$  de 20%). Foram mantidos dois indivíduos de cada espécie por tratamento em meio sem enriquecimento em  $^{15}\text{N}$ , como controle.

### *Absorção das fontes de N*

Após 24 h da suplementação com 2 mM  $\text{K}^{15}\text{NO}_3$  ou 1 mM  $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , foram coletadas cinco alíquotas (500  $\mu\text{L}$ /frasco) de cada tratamento para determinação das taxas de absorção das fontes de nitrogênio pelas raízes de cada espécie. Também foram coletadas alíquotas de quatro frascos sem plantas, dois de cada fonte de N, usados como controle. Os níveis de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  nas alíquotas foram quantificados como descrito anteriormente e a

matéria seca das raízes de cada indivíduo foi determinada. As taxas de absorção de cada fonte de N foram calculadas através da fórmula: (Número de moles de  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  nos frascos controle - Número de moles de  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  no frasco com plantas)/Matéria seca da raiz.

#### *Determinação da incorporação do $^{15}\text{N}$ em aminoácidos*

Após 24 h de incubação, as raízes e folhas foram pesadas e coletadas em  $\text{N}_2$  líquido para análises. As raízes foram lavadas com solução de  $\text{CaSO}_4$  0,5 mM + KCl 1 mM e depois com água destilada, para eliminação do  $^{15}\text{N}$  adsorvido à sua superfície (Ashton et al. 2010), enquanto as folhas foram lavadas apenas com água destilada. Os aminoácidos foram extraídos em MCW conforme descrito anteriormente (Experimento 1). A porcentagem do  $^{15}\text{N}$  incorporado aos aminoácidos de raízes e folhas foi analisada utilizando-se o sistema de cromatografia gasosa acoplado ao espectrômetro de massas (Shimadzu QP2010 plus system, Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan), em colaboração com o Prof. Dr. Ladaslav Sodek, da Universidade Estadual de Campinas. Após passagem dos extratos MCW numa coluna Dowex 50W  $\text{H}^+$  e eluição com  $\text{NH}_4\text{OH}$  4M, os aminoácidos foram derivatizados com *N*-metil-*N* (*tert*-butildimetilsilil) trifluoracetamida (Sigma, Saint Louis, USA) em piridina a 70°C por 30 min. Os aminoácidos foram analisados no modo SIM seguindo as condições descritas por Chaves das Neves e Vasconcelos (1987). A quantificação dos aminoácidos (em nmol) foi feita a partir da comparação das áreas dos picos de aminoácidos nas amostras com as áreas do padrão. Para o cálculo da quantidade relativa de cada aminoácido (em mol%) foi utilizada a seguinte fórmula: Quantidade do aminoácido individual x 100/quantidade total de aminoácidos na amostra.

Para calcular o enriquecimento dos aminoácidos em  $^{15}\text{N}$ , a seguinte fórmula foi usada: Porcentagem de N enriquecido =  $(R_e - R_c) / [1 + (R_e - R_c)] \times 100$  (Silvester et al., 1996), na qual  $R_e = [(M + 1)/M]$  das amostras provenientes de material exposto ao  $^{15}\text{N}$ , e  $R_c$  é igual a mesma relação  $M+1$  e  $M$  para as amostras de material controle (não expostas ao  $^{15}\text{N}$ ). Os valores  $M$  e  $M+1$  representam as intensidades relativas de duas formas do mesmo fragmento, uma com  $^{14}\text{N}$  (=M) e a outra com  $^{15}\text{N}$  (M+1) (Oliveira e Sodek 2013). O enriquecimento médio dos aminoácidos em cada órgão foi calculado como a média da %  $^{15}\text{N}$  nos aminoácidos ponderada pela quantidade dos aminoácidos em mol%.

#### *Análise estatística*

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado. Nove repetições foram utilizadas para as análises morfológicas, enquanto quatro repetições foram utilizadas

para as análises metabólicas e três repetições para as análises do experimento com  $^{15}\text{N}$ . Os dados quantitativos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de um fator, para comparar o efeito dos tratamentos de N em cada espécie. No caso dos dados de enriquecimento com  $^{15}\text{N}$ , foi comparada a incorporação de  $^{15}\text{N}$  em aminoácidos entre os órgãos da planta (raiz e folha). A atividade da enzima NR foi comparada entre os órgãos das mudas e entre as espécies, com ANOVA de dois fatores seguida pelo teste de Tukey. Em todos os casos, foi testada a normalidade da distribuição dos dados e a homogeneidade de variâncias e, quando necessário, os dados foram transformados. Todas as análises estatísticas foram realizadas adotando-se o nível de significância de 5%, no programa Statistica v. 10.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

## Resultados

### *Crescimento*

Foi notável o menor crescimento das mudas das espécies pioneiras, *H. popayanensis* e *T. micrantha*, tratadas com  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao tratamento com  $\text{NO}_3^-$  (Fig. 1). Além disso, as mudas dessas espécies apresentaram clorose internerval em suas folhas quando cultivadas com  $\text{NH}_4^+$ . Quantitativamente, em *H. popayanensis* e *T. micrantha*, a área foliar e o conteúdo de matéria seca da raiz e parte aérea foram menores no tratamento com  $\text{NH}_4^+$  (Tabela 2). A TCR da parte aérea em *H. popayanensis* foi de  $91,5 \text{ mg g}^{-1} \text{ d}^{-1}$  no tratamento com  $\text{NO}_3^-$  para  $75,3 \text{ mg g}^{-1} \text{ d}^{-1}$  no tratamento com  $\text{NH}_4^+$ , enquanto a TCR da raiz foi  $117,1 \text{ mg g}^{-1} \text{ d}^{-1}$  e  $92,3 \text{ mg g}^{-1} \text{ d}^{-1}$  nos tratamentos com  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ , respectivamente. Em *T. micrantha*, foram encontrados resultados semelhantes aos da outra pioneira: TCR da parte aérea foi de  $120,6 \text{ mg g}^{-1} \text{ d}^{-1}$  para o tratamento com  $\text{NO}_3^-$  para  $66,0 \text{ mg g}^{-1} \text{ d}^{-1}$  no tratamento com  $\text{NH}_4^+$  e a TCR da raiz foi de  $131,5 \text{ mg g}^{-1} \text{ d}^{-1}$  no tratamento com  $\text{NO}_3^-$  para  $107,4 \text{ mg g}^{-1} \text{ d}^{-1}$  no tratamento com  $\text{NH}_4^+$ .

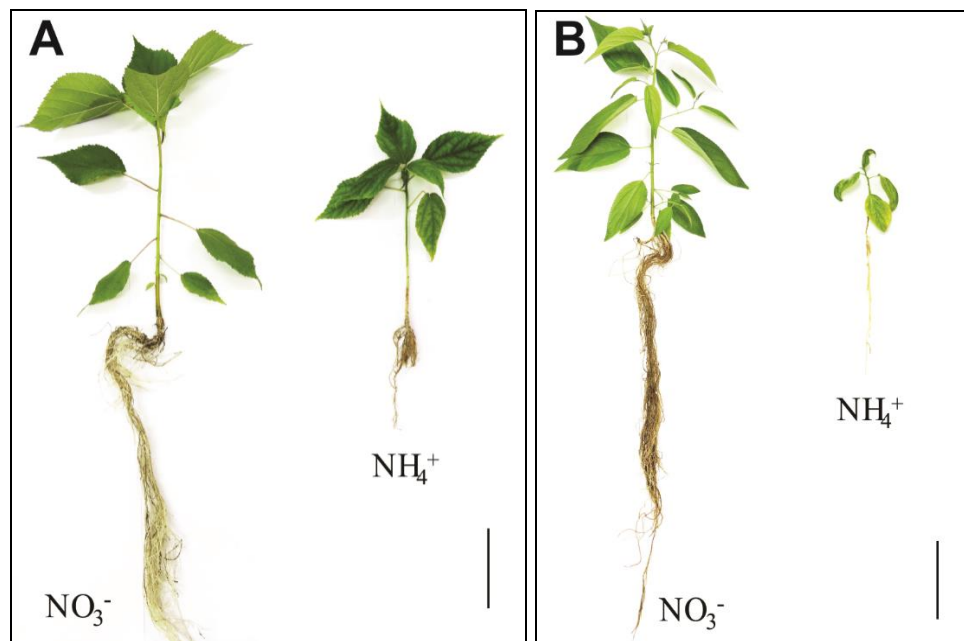
Diferentemente, *C. estrellensis*, espécie não pioneira, apresentou maiores valores de área foliar e conteúdo de matéria seca da parte aérea no tratamento com  $\text{NH}_4^+$ , ao passo que o conteúdo de matéria seca da raiz não foi afetada pela fonte de N (Tabela 2). A TCR da parte aérea foi de  $30,4 \text{ mg g}^{-1} \text{ d}^{-1}$  no tratamento com  $\text{NH}_4^+$  para  $25,4 \text{ mg g}^{-1} \text{ d}^{-1}$  no tratamento com  $\text{NO}_3^-$ , e a TCR da raiz foi de  $30,7 \text{ mg g}^{-1} \text{ d}^{-1}$  e  $30,4 \text{ mg g}^{-1} \text{ d}^{-1}$  nos tratamentos com  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ , respectivamente. Em *E. brasiliensis*, não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros de crescimento entre os tratamentos (Tabela 2). A TCR da parte aérea foi de

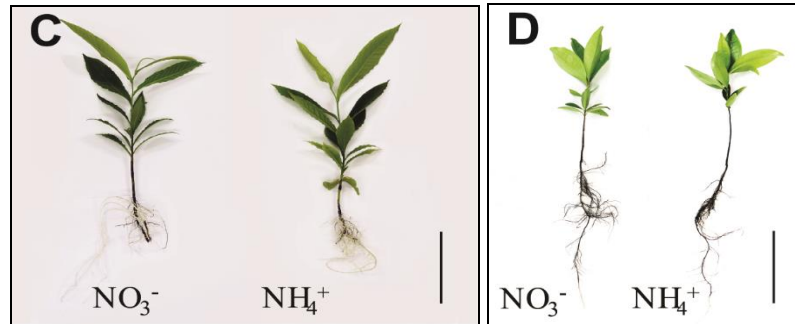
31,8 mg g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> nos dois tratamentos de N e a TCR da raiz foi 23,5 mg g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> no tratamento com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e 20,1 mg g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> no tratamento com NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Em ambas as espécies não pioneiras, não foram observados sintomas de toxicidade do NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Fig. 1).

#### *Metabolismo do nitrogênio nas raízes e folhas*

Considerando mudas cultivadas com NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, as espécies pioneiras apresentaram atividade da NR foliar maior que as não pioneiras, com a maior atividade observada em *T. micrantha* (Fig. 2). Entre as não pioneiras, a atividade dessa enzima nas folhas foi maior em *C. estrellensis*, em relação a *E. brasiliensis*. Na raiz, a atividade dessa enzima foi baixa e não diferiu entre as espécies.

*T. micrantha*, *H. popayanensis* e *C. estrellensis* apresentaram uma maior atividade NR na folha em relação à raiz, ao passo que não houve diferença entre os órgãos em *E. brasiliensis* (Fig. 2). Quanto à proporção da atividade da NR entre folha e raiz (razão folha/raiz), verificou-se que *T. micrantha* apresentou a maior razão folha/raiz (38,7) seguido por *H. popayanensis* (4,75), *C. estrellensis* (2,54) e *E. brasiliensis* (1,38).



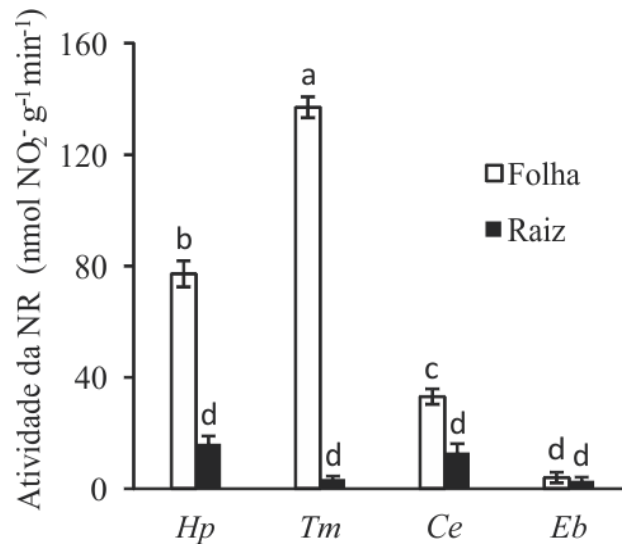


**Fig. 1** Mudanças de *Heliocarpus popayanensis* (A), *Trema micrantha* (B), *Cariniana estrellensis* (C) e *Eugenia brasiliensis* (D) cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  como fonte de nitrogênio. Escala = 10 cm.

No tratamento com  $\text{NH}_4^+$ , as espécies não pioneiras apresentaram maior conteúdo de aminoácidos totais na raiz, em relação ao tratamento  $\text{NO}_3^-$  (Fig. 3a). Diferentemente, a espécie *T. micrantha* apresentou maior conteúdo de aminoácidos totais na raiz no tratamento com  $\text{NO}_3^-$ , enquanto *H. popayanensis* não apresentou diferença significativa no conteúdo de aminoácidos totais na raiz entre os tratamentos. O cultivo com  $\text{NH}_4^+$  levou a um aumento no conteúdo de aminoácidos totais nas folhas apenas da espécie *E. brasiliensis* quando comparado com o tratamento com  $\text{NO}_3^-$  (Fig. 3b). Nas outras espécies, não houve diferença significativa entre os tratamentos.

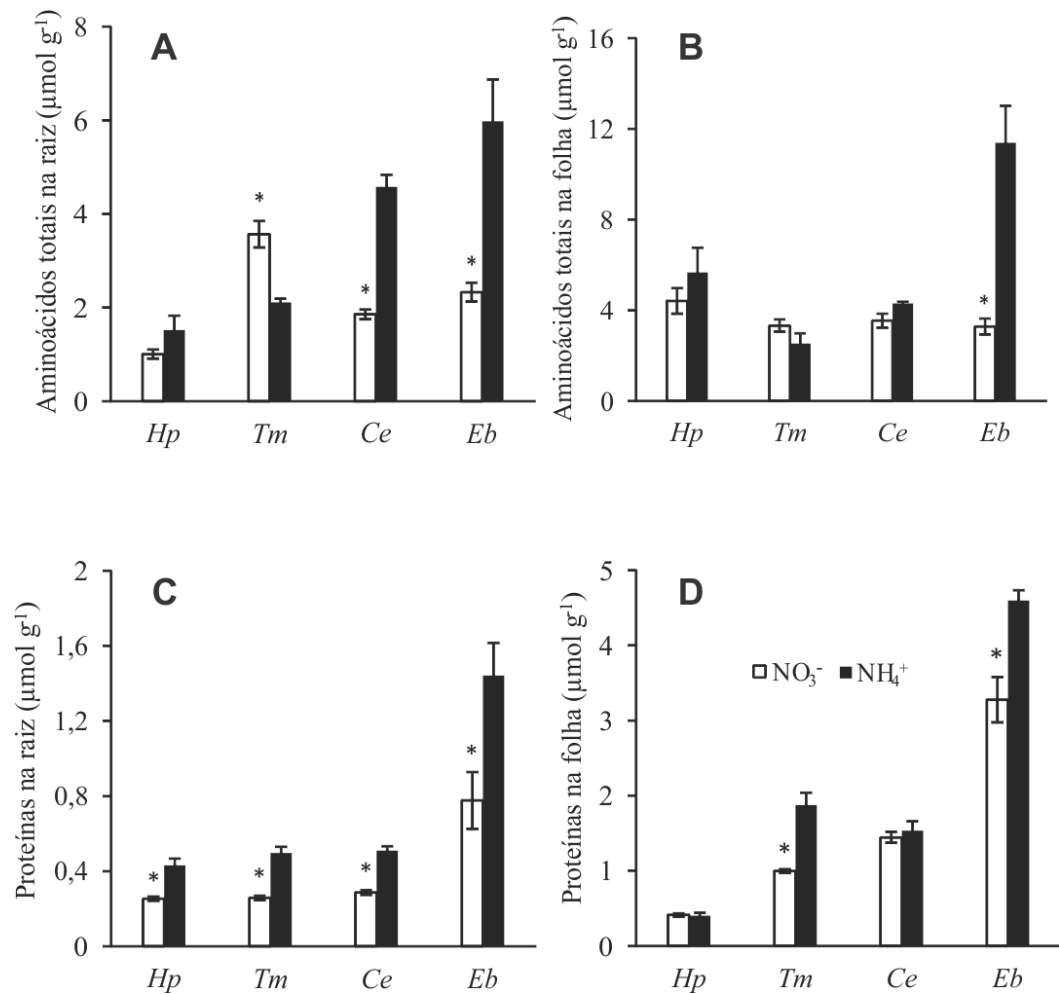
**Tabela 2** Área foliar e matéria seca da raiz e parte aérea de mudas de *Heliocarpus popayanensis* (*Hp*), *Trema micrantha* (*Tm*), *Cariniana estrellensis* (*Ce*) e *Eugenia brasiliensis* (*Eb*) cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  como fonte de nitrogênio. Os dados são médias  $\pm$  erro-padrão ( $n = 9$ ). Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos de nitrogênio, para cada espécie, pelo teste F (ANOVA;  $p < 0,05$ )

Espécies	Tratamentos	Área foliar (cm <sup>2</sup> )	Matéria seca raiz (g)	Matéria seca parte aérea (g)
<i>Hp</i>	$\text{NO}_3^-$	496 $\pm$ 28,2 *	0,823 $\pm$ 0,112 *	2,22 $\pm$ 0,248 *
	$\text{NH}_4^+$	229 $\pm$ 15,9	0,233 $\pm$ 0,021	0,986 $\pm$ 0,069
<i>Tm</i>	$\text{NO}_3^-$	458 $\pm$ 26,4 *	1,05 $\pm$ 0,157 *	2,54 $\pm$ 0,117 *
	$\text{NH}_4^+$	48,3 $\pm$ 14,3	0,382 $\pm$ 0,08	0,412 $\pm$ 0,112
<i>Ce</i>	$\text{NO}_3^-$	119 $\pm$ 11,1 *	0,236 $\pm$ 0,023	0,623 $\pm$ 0,039 *
	$\text{NH}_4^+$	169 $\pm$ 14,0	0,226 $\pm$ 0,034	0,803 $\pm$ 0,058
<i>Eb</i>	$\text{NO}_3^-$	61,9 $\pm$ 7,98	0,143 $\pm$ 0,009	0,550 $\pm$ 0,009
	$\text{NH}_4^+$	83,5 $\pm$ 9,33	0,117 $\pm$ 0,008	0,658 $\pm$ 0,049



**Fig. 2** Atividade da enzima nitrato redutase (NR) na raiz e folhas de mudas de *Heliocarpus popayanensis* (*Hp*), *Trema micrantha* (*Tm*), *Cariniana estrellensis* (*Ce*) e *Eugenia brasiliensis* (*Eb*) cultivadas com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> como fonte de nitrogênio. Os dados são médias ± erros-padrão ( $n = 4$ ). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os órgãos e as espécies (ANOVA de dois fatores seguida de teste de Tukey;  $p < 0,05$ ).

A fonte de N afetou a quantidade de proteínas na raiz de todas as espécies, sendo essa quantidade maior no tratamento com NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Fig. 3c). Nas folhas, o conteúdo de proteína foi maior no tratamento com NH<sub>4</sub><sup>+</sup> nas espécies *T. micrantha* e *E. brasiliensis* (Fig. 3d). Nas outras espécies, *H. popayanensis* e *C. estrellensis*, não houve diferença significativa entre os tratamentos.



**Fig. 3** Conteúdo total de aminoácidos (A e B) e proteínas (C e D) na raiz e folhas de mudas de *Heliocarpus popayanensis* (*Hp*), *Trema micrantha* (*Tm*), *Cariniana estrellensis* (*Ce*) e *Eugenia brasiliensis* (*Eb*) cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  como fonte de nitrogênio. Os dados são médias  $\pm$  erros-padrão ( $n = 4$ ). Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos de nitrogênio, para cada espécie, pelo teste F (ANOVA;  $p < 0,05$ )

#### Translocação dos compostos nitrogenados pela seiva do xilema

Quando cultivadas com  $\text{NO}_3^-$ , houve um grande aumento na porcentagem de  $\text{NO}_3^-$  translocado pela seiva do xilema em todas as espécies (Tabela 3). Nas espécies *H. popayanensis*, *T. micrantha* e *C. estrellensis* o  $\text{NO}_3^-$  foi a fonte de N predominante na seiva do xilema de mudas cultivadas com  $\text{NO}_3^-$ , mas em *E. brasiliensis* os aminoácidos foram predominantes sobre o  $\text{NO}_3^-$  no mesmo tratamento (Tabela 3).

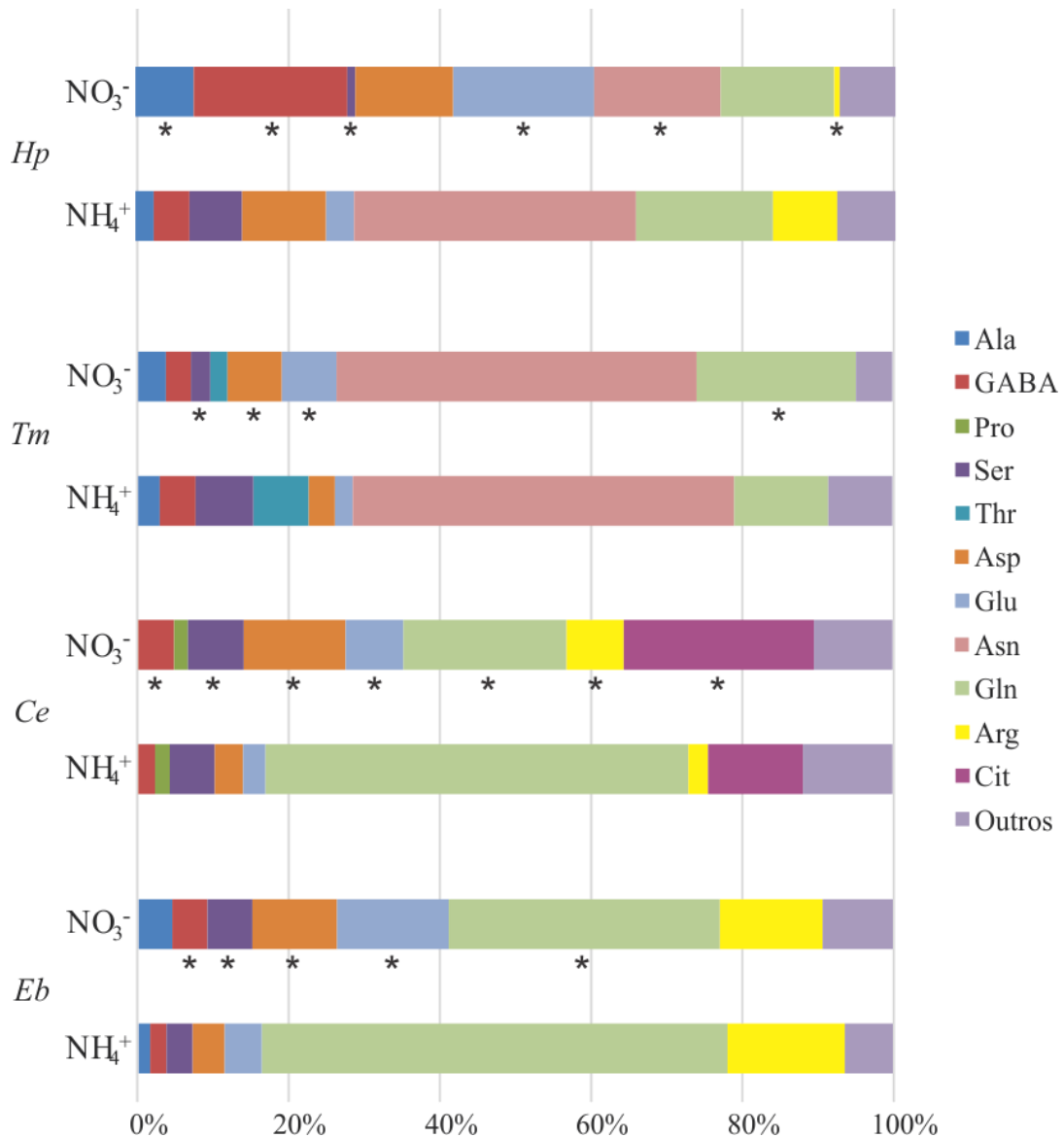
No cultivo das mudas com  $\text{NH}_4^+$  como fonte de N, a porcentagem de  $\text{NH}_4^+$  transportado pela seiva do xilema aumentou em relação ao  $\text{NO}_3^-$ , mas a proporção de  $\text{NH}_4^+$  translocada foi menor que os aminoácidos. Em todas as espécies, foi possível observar que o cultivo com  $\text{NH}_4^+$  induziu a um aumento na proporção de aminoácidos translocados pela seiva do xilema.

**Tabela 3** Conteúdo relativo (em mol%) de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  e aminoácidos na seiva do xilema de mudas de *Heliocarpus popayanensis* (*Hp*), *Trema micrantha* (*Tm*), *Cariniana estrellensis* (*Ce*) e *Eugenia brasiliensis* (*Eb*) cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  como fonte de nitrogênio. Os dados são médias  $\pm$  erros-padrão ( $n = 4$ ). Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos de N, para cada espécie, pelo teste F (ANOVA;  $p < 0,05$ ).

Espécies	Tratamentos	$\text{NO}_3^-$	$\text{NH}_4^+$	Aminoácidos
<i>Hp</i>	$\text{NO}_3^-$	55,4 $\pm$ 3,44	5,77 $\pm$ 0,62	38,8 $\pm$ 3,99
	$\text{NH}_4^+$	1,43 $\pm$ 1,12*	13,2 $\pm$ 1,02*	85,3 $\pm$ 1,98*
<i>Tm</i>	$\text{NO}_3^-$	59 $\pm$ 0,819	5,04 $\pm$ 0,991	35,9 $\pm$ 1,02
	$\text{NH}_4^+$	14,2 $\pm$ 1,78*	14,3 $\pm$ 0,953*	71,4 $\pm$ 0,865*
<i>Ce</i>	$\text{NO}_3^-$	73,2 $\pm$ 2,20	6,51 $\pm$ 1,76	20,3 $\pm$ 0,807
	$\text{NH}_4^+$	15,1 $\pm$ 3,44*	19,4 $\pm$ 1,23*	65,4 $\pm$ 3,55*
<i>Eb</i>	$\text{NO}_3^-$	33 $\pm$ 1,95	9,19 $\pm$ 0,680	57,8 $\pm$ 2,41
	$\text{NH}_4^+$	5,50 $\pm$ 0,930*	12,8 $\pm$ 0,924*	81,6 $\pm$ 1,63*

#### Quantificação e identificação dos aminoácidos presentes na seiva do xilema

Em *H. popayanensis*, os principais aminoácidos translocados pela seiva do xilema foram asparagina (Asn), serina (Ser), glutamina (Gln), arginina (Arg), ácido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu), alanina (Ala) e ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) (Fig. 4). O tratamento com  $\text{NH}_4^+$  levou a um aumento na proporção de Asn, Ser e Arg na seiva do xilema em relação ao cultivo com  $\text{NO}_3^-$ , ao passo que os níveis relativos de Glu, Ala e GABA foram reduzidos. Assim, nas plantas de *H. popayanensis* cultivadas com  $\text{NO}_3^-$ , GABA (20,2%), Glu (18,5%) e Asn (16,6%) foram os aminoácidos mais abundantes na seiva do xilema. Já na presença de  $\text{NH}_4^+$ , as amidas Asn (37,0%) e Gln (18,0%) passaram a ser predominantes (Fig. 4).



**Fig. 4** Conteúdo relativo de aminoácidos (em mol%) presentes na seiva do xilema de mudas de *Heliocarpus popayanensis* (Hp), *Trema micrantha* (Tm), *Cariniana estrellensis* (Ce) e *Eugenia brasiliensis* (Eb) cultivadas com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup> como fonte de nitrogênio. Os dados são médias ( $n = 4$ ). Asteriscos indicam diferenças significativas no conteúdo de cada aminoácido entre os tratamentos de N, para cada espécie, pelo teste F (ANOVA;  $p < 0,05$ ). Apenas os aminoácidos que apresentaram uma quantidade em mol% superior a 3% são mostrados: Ala (alanina), Arg (arginina), Asn (asparagina), Asp (ácido aspártico), Cit (citrulina), Gln (glutamina), Glu (ácido glutâmico), GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico), Pro (prolina), Ser (serina) e Thr (treonina)

Em *T. micrantha*, os principais aminoácidos translocados pela seiva do xilema foram Asn, Ser, Gln, Asp, Glu, treonina (Thr), Ala e GABA (Fig. 4). No tratamento com NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, houve um aumento na proporção de Ser em comparação ao cultivo com NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Por outro lado, no tratamento com NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, os aminoácidos Gln e Glu foram transportados em maiores

quantidades relativas em relação ao tratamento com  $\text{NH}_4^+$ . Independente da fonte de N, Asn foi o aminoácido predominante na seiva do xilema de *T. micrantha*, correspondendo a mais de 50% dos aminoácidos translocados (Fig. 4).

Em *C. estrellensis*, os principais aminoácidos translocados pela seiva do xilema foram Ser, Gln, Arg, Asp, Glu, GABA, prolina (Pro) e citrulina (Cit) (Fig. 4). A Gln foi translocada em maior quantidade relativa no tratamento com  $\text{NH}_4^+$  em relação ao tratamento com  $\text{NO}_3^-$ . No cultivo com  $\text{NO}_3^-$ , os aminoácidos Ser, Arg, Asp, Glu, GABA e Cit foram transportados em maiores proporções em comparação ao tratamento com  $\text{NH}_4^+$ . Em mudas cultivadas com  $\text{NO}_3^-$ , Cit (25,2%) foi predominante na seiva do xilema de *C. estrellensis* seguida pela Gln (21,6%), ao passo que no cultivo com  $\text{NH}_4^+$  essa proporção se inverteu (Gln 56,0% e Cit 12,5%) (Fig. 4).

Em *E. brasiliensis*, os principais aminoácidos translocados pela seiva do xilema foram Ser, Gln, Arg, Asp, Glu, Ala e GABA (Fig. 4). O tratamento com  $\text{NH}_4^+$  induziu a um aumento na proporção de Gln na seiva do xilema em relação ao cultivo com  $\text{NO}_3^-$  acompanhado de uma diminuição nas quantidades relativas de Ser, Asp, Glu e GABA. Mesmo assim, independente da fonte de N, Gln foi o aminoácido predominante na seiva do xilema de *E. brasiliensis* (Fig. 4).

#### *Absorção de $\text{NO}_3^-$ e $\text{NH}_4^+$ pelas raízes*

As raízes das espécies pioneiras (*H. popayanensis* e *T. micrantha*) apresentaram maior taxa de absorção de  $\text{NO}_3^-$  em relação ao  $\text{NH}_4^+$ , com razões de absorção de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  próximas a 2 (Tabela 4). As raízes de *C. estrellensis* absorveram quantidades equivalentes das duas formas de N, apresentando razão de absorção de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  próxima a 1. Dentre as espécies estudadas, *E. brasiliensis* foi a única que apresentou maior taxa de absorção de  $\text{NH}_4^+$  em relação ao  $\text{NO}_3^-$ , e teve uma razão de absorção de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  de 0,44.

#### *Assimilação de $^{15}\text{NO}_3^-$ e $^{15}\text{NH}_4^+$ pela raiz e folha*

Os resultados de enriquecimento com  $^{15}\text{N}$  em cada aminoácido a partir do  $^{15}\text{NO}_3^-$  e  $^{15}\text{NH}_4^+$  podem ser consultados nos dados suplementares (Tabelas Suplementares S1 a S4).

**Tabela 4** Taxa de absorção (em  $\mu\text{mol g}^{-1}\text{dia}^{-1}$ ) de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  e razão de absorção de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  por mudas de *Heliocarpus popayanensis* (Hp), *Trema micrantha* (Tm), *Cariniana estrellensis* (Ce) e *Eugenia brasiliensis* (Eb) cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  como fonte de N. Os dados são médias  $\pm$  erros-padrão ( $n = 4$ ). Asteriscos indicam diferenças significativas entre a absorção de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ , para cada espécie, pelo teste F (ANOVA;  $p < 0,05$ )

Espécies	$\text{NO}_3^-$	$\text{NH}_4^+$	$\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$
Hp	851 $\pm$ 69,4 *	443 $\pm$ 45,0	1,92
Tm	1522 $\pm$ 61,9*	681 $\pm$ 30,5	2,23
Ce	526 $\pm$ 61,9	577 $\pm$ 42,4	0,91
Eb	325 $\pm$ 15,4*	741 $\pm$ 16,1	0,44

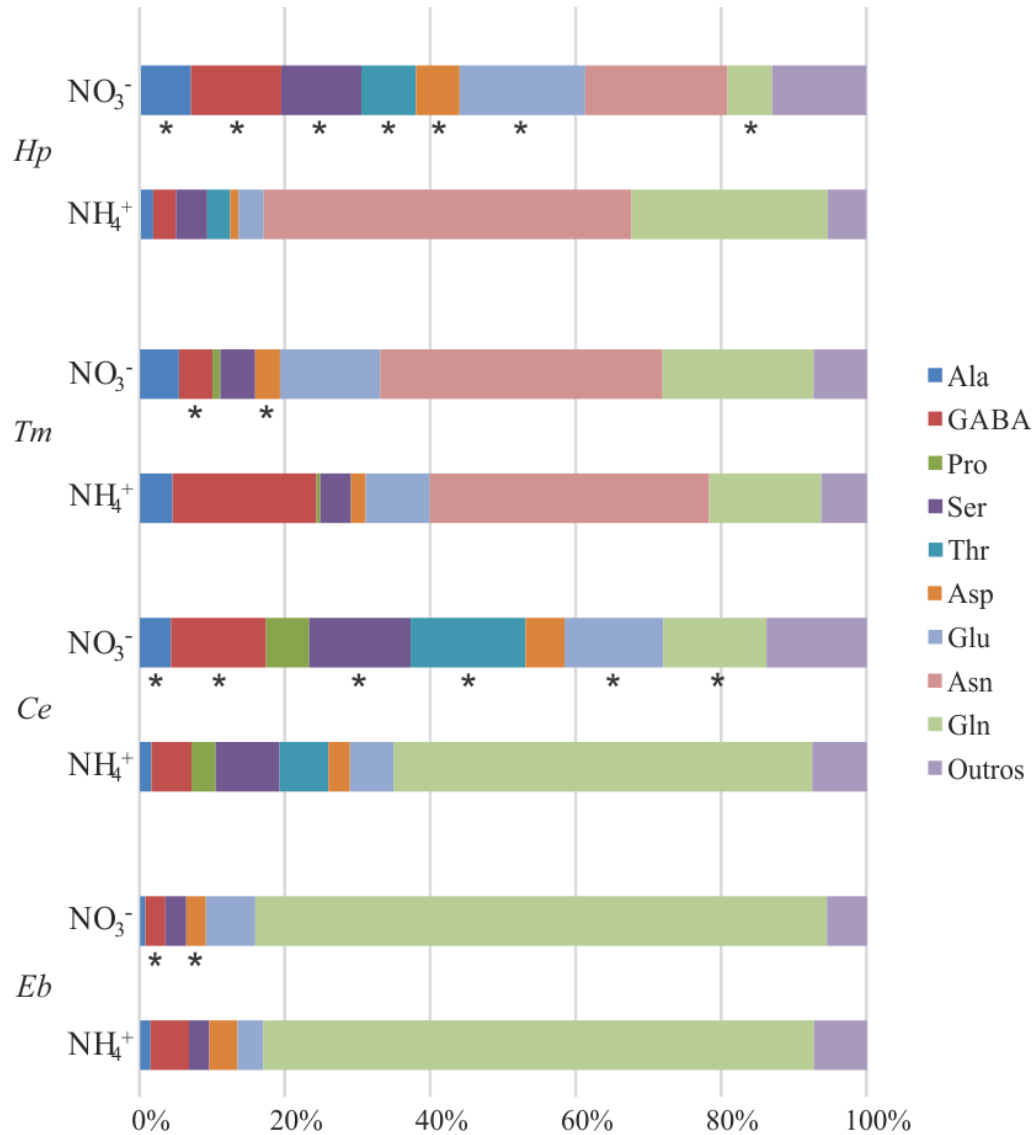
Na raiz de mudas de *H. popayanensis* tratadas com  $\text{NO}_3^-$ , Asn (19,5%), Glu (17,3%), GABA (12,4%) e Ser (11,0%) foram os aminoácidos mais abundantes (Fig. 5), ao passo que nas folhas foram Ser (36,4%), Gln (21,0%) e Glu (18,1%), com Asn não chegando a 1% (Fig. 6). No tratamento com  $\text{NH}_4^+$ , o predomínio de Asn na raiz foi ainda maior (50,6%), seguido de uma elevada proporção de Gln (27,0%). Nas folhas, Ser (34,8%) e Gln (24,4%) permaneceram como os aminoácidos mais abundantes, sendo observado um aumento na proporção de Asn (18,2%). O enriquecimento médio dos aminoácidos com  $^{15}\text{N}$  em mudas tratadas com  $\text{NO}_3^-$  foi maior nas folhas do que na raiz (Tabela 5), sendo que apenas GABA e Asn não apresentaram diferença entre os órgãos (Tabela Suplementar S1). Nas mudas tratadas com  $\text{NH}_4^+$ , houve maior enriquecimento médio dos aminoácidos com  $^{15}\text{N}$  na raiz do que nas folhas (Tabela 5), resultante do menor enriquecimento da Gln nas folhas (Tabela Suplementar S1).

Na raiz de mudas de *T. micrantha* cultivadas com  $\text{NO}_3^-$ , Asn (38,8%), Gln (20,7%) e Glu (13,8%) foram os aminoácidos mais abundantes (Fig. 5), semelhante ao observado nas folhas (Asn 35,9%, Gln 26,7% e Glu 12,9%) (Fig. 6). No tratamento com  $\text{NH}_4^+$ , a proporção de Asn na raiz também foi alta (38,4%), mas houve aumento da proporção de GABA (19,8%) e diminuição de Asp (2,0%) em relação ao tratamento com  $\text{NO}_3^-$ . Nas folhas, houve aumento na proporção de Ser (15,3%) e diminuição de Asp (0,5%) em plantas tratadas com  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao  $\text{NO}_3^-$ , mas as amidas Asn e Gln permaneceram como os aminoácidos predominantes. Em plantas tratadas com  $\text{NO}_3^-$  houve maior enriquecimento médio dos aminoácidos com  $^{15}\text{N}$  nas folhas em relação à raiz (Tabela 5), sendo que apenas Glu não diferiu entre os órgãos (Tabela Suplementar S2). Quando tratadas com  $\text{NH}_4^+$ , também se

observou maior enriquecimento médio com  $^{15}\text{N}$  nas folhas do que na raiz (Tabela 5). Os aminoácidos responsáveis pelo maior enriquecimento médio nas folhas de plantas de *T. micrantha* incubadas com  $^{15}\text{NH}_4^+$  foram Ser e, em maior parte, Asn, principal aminoácido relacionado à translocação de N das raízes até as folhas. O enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  nos demais aminoácidos não diferiu entre os órgãos (Ala, Gln e Asp) ou foi maior na raiz em relação à folha (GABA e Glu).

**Tabela Suplementar S1** Enriquecimento em  $^{15}\text{N}$  (%) de aminoácidos em raízes e folhas de mudas de *H. popayanensis* cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  como fonte de N, ambas enriquecidas com 20% de  $^{15}\text{N}$ . Os dados são médias  $\pm$  erros-padrão ( $n = 3$ ). Asteriscos indicam diferenças significativas no enriquecimento do aminoácido em  $^{15}\text{N}$  entre raiz e folha, para cada fonte de N, pelo teste F (ANOVA;  $p < 0,05$ ). Ala (alanina), Asn (aparagina), Asp (ácido aspártico), Gln (glutamina), Glu (ácido glutâmico), GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico), Ser (serina) e Thr (treonina).

Aminoácido	$\text{NO}_3^-$		$\text{NH}_4^+$	
	Raiz	Folha	Raiz	Folha
Ala	5,30 $\pm$ 0,73	8,93 $\pm$ 0,45 *	11,28 $\pm$ 1,58	8,47 $\pm$ 2,44
GABA	5,46 $\pm$ 0,79	7,83 $\pm$ 0,54	14,0 $\pm$ 1,18	8,73 $\pm$ 2,72
Gln	9,27 $\pm$ 1,40	18,91 $\pm$ 1,00 *	26,13 $\pm$ 1,70	15,57 $\pm$ 3,81 *
Glu	6,27 $\pm$ 0,64	8,91 $\pm$ 0,62 *	13,07 $\pm$ 1,53	7,85 $\pm$ 2,55
Asn	10,9 $\pm$ 2,70	10,1 $\pm$ 0,94	19,39 $\pm$ 2,60	21,55 $\pm$ 1,87
Asp	5,84 $\pm$ 0,67	9,01 $\pm$ 0,59 *	11,58 $\pm$ 1,26	8,80 $\pm$ 2,40
Ser	2,0 $\pm$ 0,90	7,73 $\pm$ 0,27 *	4,08 $\pm$ 0,90	8,18 $\pm$ 2,80
Thr	1,34 $\pm$ 0,70	5,33 $\pm$ 0,43 *	3,34 $\pm$ 1,11	4,97 $\pm$ 1,60



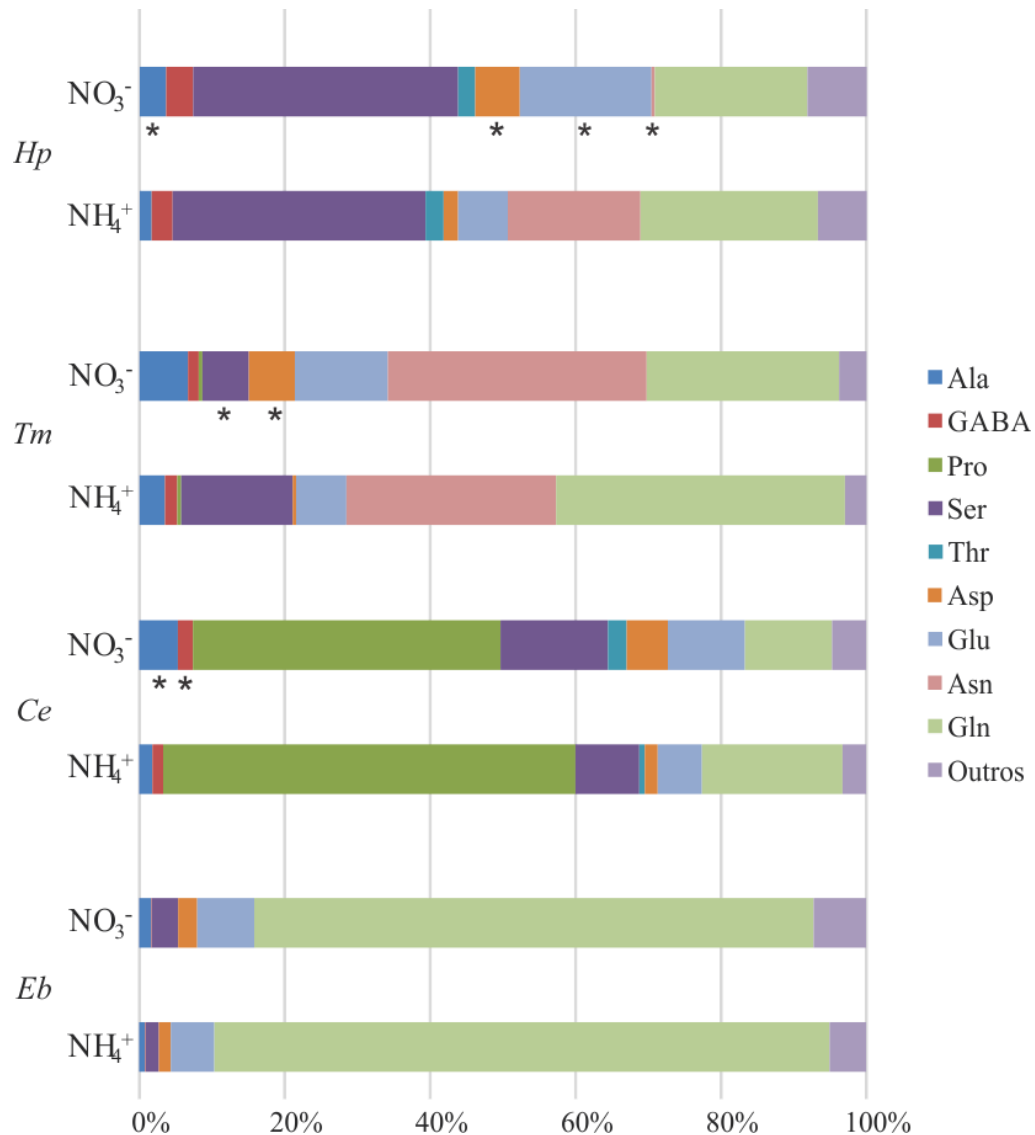
**Fig. 5** Conteúdo de aminoácidos (em mol%) presentes na raiz de mudas de *Heliocarpus popayanensis* (*Hp*), *Trema micrantha* (*Tm*), *Cariniana estrellensis* (*Ce*) e *Eugenia brasiliensis* (*Eb*) cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  como fonte de nitrogênio. Os dados são médias ( $n = 3$ ). Asteriscos indicam diferenças significativas no conteúdo de cada aminoácido entre os tratamentos de N, para cada espécie, pelo teste F (ANOVA;  $p < 0,05$ ). Os aminoácidos mostrados são Ala (alanina), Asn (aparagina), Asp (ácido aspártico), Gln (glutamina), Glu (ácido glutâmico), GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico), Pro (prolina), Ser (serina) e Thr (treonina). Os aminoácidos inclusos em “Outros” são Arg (arginina), Gly (glicina), Ile (isoleucina), Leu (leucina), Lys (lisina), Met (metionina), Phe (fenilalanina), Tyr (tirosina), His (histidina) e Val (valina).

**Tabela 5** Enriquecimento médio de  $^{15}\text{N}$  (%) em aminoácidos em raízes e folhas de mudas de *Heliocarpus popayanensis* (*Hp*), *Trema micrantha* (*Tm*), *Cariniana estrellensis* (*Ce*) e *Eugenia brasiliensis* (*Eb*) cultivadas com  $^{15}\text{NO}_3^-$  ou  $^{15}\text{NH}_4^+$  como fonte de nitrogênio, ambas enriquecidas com 20% de  $^{15}\text{N}$ . Os dados são médias  $\pm$  erros-padrão ( $n = 3$ ). Asteriscos indicam diferenças significativas no enriquecimento médio do  $^{15}\text{N}$  em aminoácidos entre raiz e folha, para cada fonte de N, pelo teste F (ANOVA;  $p < 0,05$ ).

Espécies	$\text{NO}_3^-$		$\text{NH}_4^+$	
	Raiz	Folha	Raiz	Folha
<i>Hp</i>	5,43 $\pm$ 0,57	9,87 $\pm$ 0,03 *	18,3 $\pm$ 1,97	11,8 $\pm$ 1,65 *
<i>Tm</i>	9,96 $\pm$ 0,22	17,3 $\pm$ 0,41*	12,1 $\pm$ 0,83	16,3 $\pm$ 0,16 *
<i>Ce</i>	2,88 $\pm$ 0,03	3,36 $\pm$ 0,05 *	10,6 $\pm$ 0,15	0,96 $\pm$ 0,38 *
<i>Eb</i>	7,66 $\pm$ 0,31	5,26 $\pm$ 0,37 *	17,1 $\pm$ 0,97	6,70 $\pm$ 0,48 *

**Tabela Suplementar S2** Enriquecimento em  $^{15}\text{N}$  (%) de aminoácidos em raízes e folhas de mudas de *T. micrantha* cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  como fonte de N, ambas enriquecidas com 20% de  $^{15}\text{N}$ . Os dados são médias  $\pm$  erros-padrão ( $n = 3$ ). Asteriscos indicam diferenças significativas no enriquecimento do aminoácido em  $^{15}\text{N}$  entre raiz e folha, para cada fonte de N, pelo teste F (ANOVA;  $p < 0,05$ ). Ala (alanina), Asn (aparagina), Asp (ácido aspártico), Gln (glutamina), Glu (ácido glutâmico), GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico), Ser (serina).

Aminoácido	$\text{NO}_3^-$		$\text{NH}_4^+$	
	Raiz	Folha	Raiz	Folha
Ala	10,9 $\pm$ 0,96	14,31 $\pm$ 0,78 *	10,2 $\pm$ 0,08	9,64 $\pm$ 0,27
GABA	9,37 $\pm$ 1,02	12,77 $\pm$ 1,02 *	10,8 $\pm$ 0,57	9,20 $\pm$ 0,32 *
Gln	17,97 $\pm$ 1,20	22,6 $\pm$ 1,26 *	17,2 $\pm$ 1,60	18,96 $\pm$ 1,60
Glu	9,81 $\pm$ 0,71	10,8 $\pm$ 0,99	10,8 $\pm$ 0,33	9,55 $\pm$ 0,47 *
Asn	8,45 $\pm$ 1,37	19,4 $\pm$ 1,72 *	14,3 $\pm$ 2,41	21,24 $\pm$ 0,82 *
Asp	8,62 $\pm$ 0,85	13,71 $\pm$ 0,60 *	9,11 $\pm$ 0,27	9,15 $\pm$ 0,35
Ser	6,12 $\pm$ 0,75	13,65 $\pm$ 0,99 *	4,60 $\pm$ 0,32	9,79 $\pm$ 0,52 *



**Fig. 6** Conteúdo de aminoácidos (mol%) presentes nas folhas de mudas de *Heliocarpus popayanensis* (Hp), *Trema micrantha* (Tm), *Cariniana estrellensis* (Ce) e *Eugenia brasiliensis* (Eb) cultivadas com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup> como fonte de nitrogênio. Os dados são médias ( $n = 3$ ). Asteriscos indicam diferenças significativas no conteúdo de cada aminoácido entre os tratamentos de N, para cada espécie, pelo teste F (ANOVA;  $p < 0,05$ ). Os aminoácidos mostrados são Ala (alanina), Asn (aparagina), Asp (ácido aspártico), Gln (glutamina), Glu (ácido glutâmico), GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico), Pro (prolina), Ser (serina) e Thr (treonina). Os aminoácidos inclusos em “Outros” são Arg (arginina), Gly (glicina), Ile (isoleucina), Leu (leucina), Lys (lisina), Met (metionina), Phe (fenilalanina), Tyr (tirosina), His (histidina) e Val (valina).

Na raiz de mudas de *C. estrellensis* cultivadas com NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Thr (15,8%), Gln (14,1%), GABA (13,9%), Ser (13,9%), e Glu (13,6%) foram os aminoácidos mais abundantes (Fig. 5), enquanto nas folhas foram Pro (42,3%), Ser (14,8%), Gln (11,9%) e Glu (10,6%) (Fig. 6). No tratamento com NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, houve grande predomínio de Gln (57,6%) na raiz, ao passo que houve

diminuição da proporção de diversos aminoácidos (Ala, GABA, Ser, Thr, Asp e Glu), em relação ao tratamento com  $\text{NO}_3^-$ . Nas folhas de mudas tratadas com  $\text{NH}_4^+$ , houve diminuição apenas na proporção de Ala e GABA, comparado ao tratamento com  $\text{NO}_3^-$ . No tratamento com  $\text{NO}_3^-$ , houve maior enriquecimento médio com  $^{15}\text{N}$  em aminoácidos nas folhas, em relação à raiz (Tabela 5), com os aminoácidos Ala, Gln, Glu, Asp, Ser e Thr apresentando menor enriquecimento nas raízes em relação às folhas (Tabela Suplementar S3). Por outro lado, sob nutrição com  $\text{NH}_4^+$ , o enriquecimento médio com esse isótopo foi maior na raiz do que nas folhas (Tabela 5), e apenas a Pro não apresentou diferenças no enriquecimento entre os órgãos (Tabela Suplementar S3).

**Tabela Suplementar S3** Enriquecimento em  $^{15}\text{N}$  (%) de aminoácidos em raízes e folhas de mudas de *C. estrellensis* cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  como fonte de N, ambas enriquecidas com 20% de  $^{15}\text{N}$ . Os dados são médias  $\pm$  erros-padrão ( $n = 3$ ). Asteriscos indicam diferenças significativas no enriquecimento do aminoácido em  $^{15}\text{N}$  entre raiz e folha, para cada fonte de N, pelo teste F (ANOVA;  $p < 0,05$ ). Ala (alanina), Asp (ácido aspártico), Gln (glutamina), Glu (ácido glutâmico), GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico), Pro (prolina), Ser (serina) e Thr (treonina).

Aminoácido	$\text{NO}_3^-$		$\text{NH}_4^+$	
	Raiz	Folha	Raiz	Folha
Ala	3,97 $\pm$ 0,34	5,25 $\pm$ 0,41 *	8,84 $\pm$ 0,77	1,55 $\pm$ 0,72 *
GABA	4,81 $\pm$ 0,22	6,04 $\pm$ 1,7	10,9 $\pm$ 0,78	1,49 $\pm$ 0,78 *
Gln	6,03 $\pm$ 0,48	9,10 $\pm$ 0,20 *	14,82 $\pm$ 1,09	1,91 $\pm$ 1,90 *
Glu	3,92 $\pm$ 0,28	5,55 $\pm$ 0,33 *	9,07 $\pm$ 0,55	1,39 $\pm$ 0,88 *
Asp	4,37 $\pm$ 0,31	5,88 $\pm$ 0,51 *	8,83 $\pm$ 0,50	1,61 $\pm$ 0,73 *
Ser	2,21 $\pm$ 0,24	4,94 $\pm$ 0,43 *	3,86 $\pm$ 0,33	1,39 $\pm$ 0,85 *
Pro	0,65 $\pm$ 0,15	0,41 $\pm$ 0,31	1,87 $\pm$ 1,15	0,54 $\pm$ 0,30
Thr	0,74 $\pm$ 0,05	1,68 $\pm$ 0,30 *	1,89 $\pm$ 0,29	0,73 $\pm$ 0,30 *

Na raiz de mudas de *E. brasiliensis* tratadas com  $\text{NO}_3^-$ , Gln foi o aminoácido predominante na raiz e folhas (78,6 e 76,2%, respectivamente) (Fig. 5). No tratamento com  $\text{NH}_4^+$ , houve aumento na proporção de GABA (5,2%) e Asp (3,9%) na raiz, em relação ao tratamento com  $\text{NO}_3^-$ . Nas folhas, não houve diferenças significativas nas proporções dos aminoácidos entre os tratamentos de N (Fig. 6). Nessa espécie, o enriquecimento médio dos

aminoácidos com  $^{15}\text{N}$  de mudas cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  foi maior na raiz, em relação às folhas (Tabela 5). A Gln, aminoácido mais abundante em *E. brasiliensis*, foi a responsável pelo maior enriquecimento médio nas raízes (Tabela Suplementar S4). Quando tratadas com  $\text{NH}_4^+$ , houve maior enriquecimento médio com  $^{15}\text{N}$  em aminoácidos na raiz do que nas folhas (Tabela 5). Para ambas as fontes de N, apenas Ser teve maior enriquecimento nas folhas em relação às raízes (Tabela Suplementar S4).

**Tabela Suplementar S4** Enriquecimento em  $^{15}\text{N}$  (%) de aminoácidos em raízes e folhas de mudas de *E. brasiliensis* cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  como fonte de N, ambas enriquecidas com 20% de  $^{15}\text{N}$ . Os dados são médias  $\pm$  erros-padrão ( $n = 3$ ). Asteriscos indicam diferenças significativas no enriquecimento do aminoácido em  $^{15}\text{N}$  entre raiz e folha, para cada fonte de N, pelo teste F (ANOVA;  $p < 0,05$ ). Ala (alanina), Asp (ácido aspártico), Gln (glutamina), Glu (ácido glutâmico), GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico), Ser (serina).

Aminoácido	$\text{NO}_3^-$		$\text{NH}_4^+$	
	Raiz	Folha	Raiz	Folha
Ala	4,80 $\pm$ 0,47	4,44 $\pm$ 0,34	9,48 $\pm$ 0,48	7,21 $\pm$ 0,11 *
GABA	3,04 $\pm$ 0,73	2,15 $\pm$ 1,19	9,72 $\pm$ 0,12	4,89 $\pm$ 0,24 *
Gln	8,23 $\pm$ 1,52	5,91 $\pm$ 1,04 *	20,6 $\pm$ 1,97	7,36 $\pm$ 0,56 *
Glu	5,60 $\pm$ 0,77	3,69 $\pm$ 0,40	9,64 $\pm$ 0,20	5,33 $\pm$ 0,13 *
Asp	5,76 $\pm$ 0,72	3,77 $\pm$ 0,341	10,2 $\pm$ 0,32	5,24 $\pm$ 0,12 *
Ser	1,40 $\pm$ 0,23	3,61 $\pm$ 0,42 *	3,76 $\pm$ 0,41	6,36 $\pm$ 0,09 *

## Discussão

O presente estudo avaliou o efeito do cultivo hidropônico com duas fontes de N inorgânico ( $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ ) sobre o crescimento, o metabolismo e a translocação do N em mudas de espécies arbóreas nativas que ocorrem na Floresta Estacional Semidecidual de diferentes estágios da sucessão (pioneiras e não pioneiras). Por meio das análises realizadas, foi possível verificar a alta sensibilidade das espécies pioneiras ao cultivo com  $\text{NH}_4^+$ , além da alta absorção de  $\text{NO}_3^-$  e capacidade de assimilação desse ânion nas folhas. Além disso, foi possível observar a tolerância das espécies não pioneiras ao  $\text{NH}_4^+$  e as diferenças entre essas espécies quanto à absorção e assimilação do  $\text{NO}_3^-$ . Portanto, esse estudo mostrou a

contribuição das raízes e folhas para a assimilação do N, além das diferenças entre as espécies no uso das diferentes fontes de N inorgânico.

As análises de crescimento mostraram que as espécies pioneiras, *H. popayanensis* e *T. micrantha*, cresceram menos e apresentaram redução da área foliar total e sinais de clorose nas folhas quando supridas com  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao  $\text{NO}_3^-$  (Tabela 2, Fig. 1a, b), que podem ser sintomas de toxicidade ao  $\text{NH}_4^+$  (Britto e Kronzucker 2002). De fato, plantas sensíveis ao  $\text{NH}_4^+$ , quando tratadas com esse cátion como única fonte de N, podem ter o crescimento, principalmente da raiz, limitado (Raab e Terry 1994; Guo et al. 2002). A diminuição da área foliar em plantas tratadas com  $\text{NH}_4^+$ , em comparação com  $\text{NO}_3^-$ , foi também observada em outras espécies (Raab e Terry 1994; Walch-Liu et al. 2000). Esse efeito pode ser atribuído a uma perda na capacidade de regulação osmótica e a concomitante diminuição da taxa de expansão celular nas folhas, possivelmente devido à perda de turgor celular (Leidi et al. 1992; Raab e Terry 1994). Por fim, a diminuição da área fotossintetizante pode contribuir para o baixo acúmulo de biomassa nas plantas supridas com  $\text{NH}_4^+$  (Guo et al. 2007). Portanto, em *H. popayanensis* e *T. micrantha*, o menor acúmulo de biomassa pode ser parcialmente relacionado à menor expansão foliar no tratamento com  $\text{NH}_4^+$ .

Além disso, outros fatores podem ser responsáveis pela toxicidade observada nas espécies pioneiras tratadas com  $\text{NH}_4^+$  como fonte exclusiva de N, como a diminuição da absorção de cátions essenciais (Siddiqi et al. 2002; Roosta e Schjoerring 2007), distúrbios na regulação do pH induzidas pelo  $\text{NH}_4^+$  (Walch-Liu et al. 2000), o consumo excessivo de carboidratos para a assimilação do  $\text{NH}_4^+$ , causando limitação de carbono (Finnemann e Schjoerring 1998), além de desbalanço hormonal (Britto e Kronzucker 2002) que pode levar à redução da síntese de citocininas, resultando em diminuição da expansão foliar (Andrews et al. 2013).

Considerando as não pioneiras, *E. brasiliensis* não apresentou diferenças nos parâmetros de crescimento entre os tratamentos de N, enquanto *C. estrellensis* apresentou maior área foliar e TCR da parte aérea no tratamento com  $\text{NH}_4^+$ , em comparação com o  $\text{NO}_3^-$  (Tabela 2, Fig. 1c, d). Esses resultados indicam que o  $\text{NH}_4^+$  não foi tóxico para as espécies não pioneiras estudadas e, inclusive, beneficiou o crescimento de *C. estrellensis*. Apesar de mesmo as espécies muito tolerantes à nutrição com  $\text{NH}_4^+$  apresentarem sintomas de toxicidade quando supridas com essa fonte de N (Britto e Kronzucker 2002), há espécies que apresentam crescimento mais pronunciado quando tratadas com  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao  $\text{NO}_3^-$ , como única fonte de N (de Graaf et al. 1998), como ocorreu em *C. estrellensis*.

Apesar das diferenças na tolerância ao  $\text{NH}_4^+$ , as espécies apresentaram semelhanças quanto à assimilação desse íon. Quando cultivadas com  $\text{NH}_4^+$ , as mudas das quatro espécies estudadas apresentaram aumento do conteúdo de proteínas na raiz (Fig. 3c) e transportaram, proporcionalmente, mais aminoácidos pela seiva do xilema (Tabela 3), em relação ao cultivo com  $\text{NO}_3^-$ . Houve também, em *C. estrellensis* e *E. brasiliensis*, aumento do conteúdo de aminoácidos na raiz no tratamento com  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao  $\text{NO}_3^-$  (Fig. 3a). Esses resultados indicam que, nas raízes das mudas tratadas com  $\text{NH}_4^+$ , em comparação ao tratamento com  $\text{NO}_3^-$ , houve maior assimilação de N, provocando aumento da síntese de proteínas nesse órgão e aumento da translocação de aminoácidos pela seiva do xilema.

Além disso, nas mudas tratadas com  $\text{NH}_4^+$ , o maior enriquecimento médio de aminoácidos com  $^{15}\text{N}$  nas raízes de *H. popayanensis*, *C. estrellensis* e *E. brasiliensis*, em relação às folhas, mostraram que a assimilação desse cátion ocorreu principalmente na raiz dessas espécies. De fato, uma resposta comum ao cultivo com  $\text{NH}_4^+$  é o aumento da assimilação em aminoácidos na raiz (Tabela 5), o que pode contribuir para diminuir o acúmulo de  $\text{NH}_4^+$  nesse órgão e sua translocação para a parte aérea, evitando assim os seus efeitos tóxicos (Oliveira et al. 2013; Sarasketa et al. 2014, 2016). Apesar da toxicidade causada pelo cultivo com  $\text{NH}_4^+$ , houve alta assimilação desse cátion em aminoácidos na raiz de *H. popayanensis* e *T. micrantha*. Nesse estudo, também se observou na seiva do xilema das quatro espécies estudadas a translocação de baixas proporções de  $\text{NH}_4^+$ , em relação a aminoácidos. Em mudas de *T. micrantha* tratadas com  $\text{NH}_4^+$ , diferentemente das demais espécies estudadas, observou-se maior enriquecimento médio com  $^{15}\text{N}$  nas folhas, em comparação com a raiz (Tabela 5). Isso pode ter ocorrido devido à translocação de aminoácidos assimilados na raiz até as folhas, principalmente na forma de Asn, que é o aminoácido com maior enriquecimento nas folhas (Tabela Suplementar S2), onde foram utilizados para síntese de proteínas, ocasionando a diminuição do conteúdo de aminoácidos na raiz (Fig. 3a) e o aumento do conteúdo de proteínas nas folhas (Fig. 3d), sob cultivo com  $\text{NH}_4^+$ . Além da Asn, o enriquecimento da Ser foi maior nas folhas em relação às raízes das mudas de *T. micrantha*, nos dois tratamentos, possivelmente resultante da fotorrespiração (Ros et al. 2014). Esse mesmo resultado foi encontrado nas mudas de *E. brasiliensis*.

Uma grande diferença observada entre os grupos sucessionais foi relativa à atividade da enzima NR foliar (Fig. 2). As folhas das espécies pioneiras apresentaram maior atividade da NR em relação às não pioneiras. Esses resultados corroboram estudos anteriores com árvores adultas em sucessões de Mata Atlântica, que relataram elevada atividade da enzima NR foliar em pioneiras e baixa atividade dessa enzima em espécies tardias (Stewart et al.

1992; Aidar et al. 2003, Oliveira et al. 2017). Espécies arbóreas pioneiras são encontradas em clareiras e nas bordas da floresta, locais com maior disponibilidade de luz (Britto e Kronzucker 2002). Como a energia para assimilação do  $\text{NO}_3^-$  nas folhas provém do transporte fotossintético de elétrons, a utilização dessa fonte de N é vantajosa nesses ambientes onde a luz não é um fator limitante (Smirnoff e Stewart 1985; Guo et al. 2007). Além disso, as espécies pioneiras possuem maior taxa de fotorrespiração (Bazzaz e Pickett 1980; Souza et al. 2008), o que torna necessário a elas reassimilar o  $\text{NH}_4^+$  formado na folha pela fotorrespiração, investindo em grande quantidade de GS e maquinaria para o processo de assimilação do  $\text{NH}_4^+$  (Keys et al. 1978). Seria então vantajoso investir em enzimas como a nitrato redutase e nitrito redutase para a assimilação do  $\text{NO}_3^-$  também na folha. Diferentemente, a assimilação foliar de  $\text{NO}_3^-$  não seria vantajosa em ambientes sombreados onde predominam as espécies secundárias tardias, favorecendo a assimilação de outras fontes nitrogenadas pelas raízes, como o  $\text{NH}_4^+$  (Aidar et al. 2003).

As mudas das espécies pioneiras (*H. popayanensis* e *T. micrantha*) cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  apresentaram baixa atividade da NR na raiz (Fig. 2), indicando assimilação de  $\text{NO}_3^-$  relativamente baixa nesse órgão. Por outro lado, as mudas dessas espécies translocaram altas proporções desse íon pela seiva do xilema (Tabela 3) e apresentaram alta atividade de NR nas folhas, o que indicou que essas espécies têm alta capacidade de assimilar nitrato na parte aérea. Em *H. popayanensis* e *T. micrantha*, o maior enriquecimento médio com  $^{15}\text{N}$  aminoácidos nas folhas no tratamento com  $\text{NO}_3^-$ , em relação à raiz (Tabela 5), corrobora a alta capacidade de assimilação de  $\text{NO}_3^-$  na parte aérea dessas espécies.

Assim como ocorreu nas espécies pioneiras tratadas com  $\text{NO}_3^-$ , *C. estrellensis* também apresentou alta capacidade de assimilação de  $\text{NO}_3^-$  na parte aérea, indicada pela translocação de uma alta proporção de  $\text{NO}_3^-$  pela seiva do xilema (Tabela 3) e pela atividade da NR foliar superior à da raiz (Fig. 2), o que sugere que essa espécie assimila  $\text{NO}_3^-$  principalmente nas folhas, padrão geralmente observado nas pioneiras (Stewart et al. 1988; 1992; Aidar et al. 2003). O maior enriquecimento médio com  $^{15}\text{N}$  nas folhas das mudas tratadas com  $\text{NO}_3^-$  em relação à raiz (Tabela 5) também aponta para a predominância da assimilação desse ânion nas folhas. Campos (2009) também observou elevada atividade da NR foliar, associada a uma alta concentração de  $\text{NO}_3^-$  na seiva do xilema em indivíduos adultos de *Cariniana estrellensis*, em um fragmento de Floresta Ombrófila Densa. Apesar da alta capacidade de assimilação de  $\text{NO}_3^-$  apresentada por *C. estrellensis*, a atividade da enzima NR foliar dessa espécie foi mais baixa do que às das espécies pioneiras, bem como a razão da atividade dessa enzima entre folha e raiz e a diferença de enriquecimento dos aminoácidos com  $^{15}\text{N}$  entre folha e raiz.

Apenas *E. brasiliensis* não apresentou diferenças entre a atividade da NR foliar em comparação com a atividade da raiz, o que mostra que, diferentemente das pioneiras e de *C. estrellensis*, *E. brasiliensis* não é forte assimiladora de  $\text{NO}_3^-$  na parte aérea, assim como foi observado por Silva (2012) em espécies de Myrtaceae, inclusive do gênero *Eugenia*. Além disso, mesmo no tratamento com  $\text{NO}_3^-$ , essa espécie transportou proporcionalmente mais aminoácidos do que  $\text{NO}_3^-$  na seiva do xilema (Tabela 3), o que pode indicar que a assimilação desse ânion se dá principalmente na raiz, o que não foi observado nas demais espécies. Apesar da baixa atividade da NR nas raízes e nas folhas em *E. brasiliensis*, essa espécie foi capaz de assimilar  $\text{NO}_3^-$  quando cultivada apenas com essa fonte de N, conforme indicado pelas altas concentrações de aminoácidos e proteínas na raiz e nas folhas (Fig. 3), pelo maior enriquecimento médio com  $^{15}\text{N}$  em aminoácidos na raiz do que nas folhas (Tabela 5) e pelas análises de crescimento (Tabela 2). Para essa espécie, mesmo uma atividade relativamente baixa da NR nas folhas foi suficiente para sustentar sua demanda por N e seu metabolismo, que, caracteristicamente, são baixos em espécies tolerantes à sombra (Stewart et al. 1992).

Em *H. popayanensis* e *T. micrantha*, a quantidade de  $\text{NO}_3^-$  absorvida da solução nutritiva foi maior do que a de  $\text{NH}_4^+$  (Tabela 4). Esses resultados, em conjunto com a verificação da translocação de grandes concentrações de  $\text{NO}_3^-$  para a parte aérea e da elevada assimilação dessa fonte nitrogenada nas folhas, reforçam a hipótese de uso majoritário de  $\text{NO}_3^-$  por espécies pioneiras (Stewart et al. 1992; Aidar et al. 2003). Em *C. estrellensis*, foi possível observar bom aproveitamento das duas fontes de N, já que não houve diferença significativa na taxa de absorção entre as duas fontes. Além disso, as mudas dessa espécie, quando tratadas com  $\text{NH}_4^+$ , apresentaram elevada capacidade de assimilar essa fonte de N na raiz, e quando tratadas com  $\text{NO}_3^-$  exibiram características similares às pioneiras, ou seja, capacidade de translocar esse ânion para a parte aérea e assimilá-lo nas folhas. No caso da *E. brasiliensis*, o  $\text{NH}_4^+$  foi a forma de N mais absorvida e foi assimilado principalmente nas raízes, resultado que corresponde ao que foi sugerido para espécies tardias de florestas tropicais, com base na observação da translocação de grandes quantidades de aminoácidos pela seiva do xilema (Aidar et al. 2003). Apesar do uso majoritário de  $\text{NH}_4^+$  por *E. brasiliensis* por  $\text{NH}_4^+$ , e do menor custo energético para assimilar  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao  $\text{NO}_3^-$ , não foi verificada diferença nas taxas de crescimento relativo entre os tratamentos nessa espécie, o que pode ter relação com as condições experimentais de luminosidade. A intensidade luminosa dentro da casa de vegetação onde se realizou o experimento é alta, em relação ao subosque de uma floresta. Dessa forma, a assimilação de  $\text{NO}_3^-$ , energeticamente mais custosa do que a do  $\text{NH}_4^+$  (Guo et al. 2007), não seria desvantajosa sob luminosidade

não limitante. Por outro lado, sob baixa intensidade luminosa, é possível que o uso do  $\text{NH}_4^+$ , em detrimento do  $\text{NO}_3^-$ , resulte em maior crescimento em indivíduos de *E. brasiliensis*. A taxa de absorção e a presença de altas concentrações de  $\text{NO}_3^-$  em raízes de *C. estrellensis* e *E. brasiliensis* (Tabela 4 e Fig. 2), espécies não pioneiras, demonstrou que essas espécies são capazes de absorver  $\text{NO}_3^-$ , diferentemente do que ocorre com *Picea glauca*, conífera de sucessão tardia que apresenta fortes limitações na absorção do  $\text{NO}_3^-$ , que pode chegar a ser 20 vezes menor do que a de  $\text{NH}_4^+$  (Kronzucker et al. 1997).

Em *T. micrantha*, Asn foi o principal aminoácido translocado pela seiva do xilema (Fig. 4), assim como foi o aminoácido mais abundante nas raízes (Fig. 5) e nas folhas (Fig. 6), independente da fonte de N, demonstrando o papel central desse composto no metabolismo e distribuição de N nessa espécie. As mudas de *T. micrantha* apresentaram aumento do conteúdo de GABA na raiz quando cultivadas com  $\text{NH}_4^+$  (Fig. 5). Esse aumento, também observado nas raízes de mudas de *E. brasiliensis* cultivadas com  $\text{NH}_4^+$  (embora em menor intensidade), pode ter algum papel na regulação do pH, já que quando plantas são cultivadas com  $\text{NH}_4^+$ , como única fonte de N, há diminuição do pH celular e do meio externo (Crawford et al. 1994; Schubert e Yan 1997; Britto e Kronzucker 2002). A formação de GABA pode ser resultado da descarboxilação do Glu, com incorporação de  $\text{H}^+$ , que pode ocorrer quando o pH da célula está baixo (Sodek 2004; Crawford et al. 1994).

A Asn também foi o aminoácido predominante na raiz e na seiva do xilema de mudas de *H. popayanensis* cultivadas com  $\text{NH}_4^+$  (Figs. 4 e 5). Sob cultivo com  $\text{NO}_3^-$  também foi observada grande quantidade de Asn sendo translocada, mas houve predomínio de GABA neste tratamento. Nas folhas, boa parte da Asn e do GABA deve ser desviada para síntese de outros aminoácidos, uma vez que Ser e Gln são os aminoácidos mais abundantes nesse órgão independente da fonte de N (Fig. 6).

Os resultados observados nas espécies pioneiras corroboram os estudos feitos anteriormente (Aidar et al. 2003; Campos 2009), em que os autores relataram que as espécies pioneiras investem na translocação do N assimilado nas raízes principalmente através de Asn, que compreende cerca de 50% do N na seiva do xilema dessas espécies. Na maioria das plantas, a amida Asn é um importante veículo de translocação de N entre os tecidos (Suárez et al. 2002). Esse aminoácido, sintetizado a partir da transferência do grupo amida da Gln para o Asp, é predominante na seiva do xilema de muitas plantas não noduladas, atuando como precursor de proteína, transportador de longa distância e armazenador de N por longo período, em virtude de sua estabilidade e relativamente baixa razão C:N (2) (Singh 1999; Lea et al. 2007).

Diferentemente das pioneiras, em *C. estrellensis* e *E. brasiliensis* a Asn foi encontrada em baixíssimos níveis na seiva do xilema e nos órgãos analisados. Um dos principais aminoácidos sintetizados na raiz e translocados na seiva do xilema dessas espécies foi a Gln (Fig. 4 e 5). Em *E. brasiliensis*, houve um grande predomínio de Gln na raiz, na seiva do xilema e nas folhas. Em *C. estrellensis*, o conteúdo desse aminoácido foi maior nas raízes e na seiva do xilema das mudas tratadas com  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao tratamento com  $\text{NO}_3^-$  (Fig. 4 e 5). Já sob nutrição com esse ânion, a translocação pela seiva do xilema foi predominantemente na forma de Cit, embora a Gln também tenha sido detectada em altas concentrações. A Gln é um importante veículo de translocação de N entre os tecidos (Suárez et al. 2002). Por ser produto primário da assimilação de N inorgânico, ocupa posição de destaque como intermediário do metabolismo de N (Stewart et al. 1980).

Pereira-Silva (2008) também estudou a espécie *C. estrellensis* e observou como principal forma de translocação a Cit. Segundo Malaguti et al. (2001), a Cit é o principal aminoácido transportado na seiva de diversas espécies (Malaguti et al. 2001), e tem baixíssima razão C:N (0,5) (Sodek 2004). Para *Betula pendula*, ele foi observado como o principal aminoácido translocado para a remobilização de N (Millard et al. 1998). Isso pode indicar que a *C. estrellensis* apresenta uma grande reciclagem interna de N, assim como *B. pendula*. No estudo de Silva (2012), foi observado que entre as espécies secundárias tardias da família Myrtaceae houve diferença na forma de translocação de aminoácido. Assim como *E. brasiliensis*, *Myrceugenia myrcioides* transportou principalmente Gln pela seiva do xilema (Silva 2012). Porém, também foram detectados outros aminoácidos predominantes na translocação de N pela seiva do xilema, como Arg em *Gomidesia spectabilis*, Arg e Glu em *Eugenia oblongata* e Glu em *Eugenia cuprea* (Silva 2012).

De uma forma geral, no presente estudo, a proporção de Arg na seiva das espécies não pioneiras foi maior que a das espécies pioneiras (Fig. 4). A Arg tem baixa razão C:N (1,5), sendo eficiente composto de reserva, cerca de 50% do pool livre total de N em árvores frutíferas, e de translocação de N (Micallef e Shelp 1989). Aidar et al. (2003) propuseram que a maioria das espécies não pioneiras transloca Arg pela seiva do xilema, mas há grandes variações dentro desse grupo.

O aminoácido observado em maior quantidade nas folhas de *C. estrellensis* foi a prolina (Pro) (Fig. 6). Uma vez que não é abundante na seiva do xilema, a Pro deve ser sintetizada *de novo* nas folhas a partir da Cit e da Gln que chegam via xilema. Apesar de ser conhecido por ter sua síntese aumentada em situações de estresse (Hare e Cress 1997; Saradhi et al. 1995; Siripornadulsil et al. 2002), observou-se em estudo feito com *Arabidopsis*

*thaliana* que se desenvolveu na ausência de estresse grandes concentrações de Pro nas flores, pólen e sementes, e baixas concentrações na raiz (Verbruggen e Hermans 2008). A Pro tem um importante papel no armazenamento de N, que pode ser remobilizado e convertido em outros aminoácidos, ao mesmo tempo pode contribuir para a defesa antioxidante (Dickson 1989).

Em síntese, verificou-se que as espécies pioneiras apresentaram sintomas de toxicidade na presença de  $\text{NH}_4^+$ , e se assemelharam quanto ao uso das fontes nitrogenadas, assimilando  $\text{NO}_3^-$  principalmente nas folhas e  $\text{NH}_4^+$  nas raízes. Já as espécies não pioneiras foram tolerantes ao  $\text{NH}_4^+$  e assimilaram esse cátion principalmente nas raízes. Essas diferentes respostas entre os grupos funcionais devem estar relacionadas a adaptações às diferentes condições de luminosidade dos ambientes onde essas espécies são encontradas (estágios iniciais ou avançados da sucessão). Porém, quanto ao uso do  $\text{NO}_3^-$  entre as não-pioneiras, verificou-se que *E. brasiliensis* assimilou esse ânion principalmente nas raízes, enquanto em *C. estrellensis*, de forma similar às pioneiras, a assimilação ocorreu principalmente nas folhas. É possível que essa diferença tenha relação com o estrato que essas espécies atingem ao longo do seu ciclo de vida, já que ao contrário de *E. brasiliensis*, que é de subosque, *C. estrellensis* atinge o dossel, onde as altas intensidades luminosas poderiam favorecer o uso do  $\text{NO}_3^-$ . Assim, é sugerido que as estratégias no uso do N por espécies neotropicais não são determinadas somente pelo seu grupo sucessional, mas também por outros aspectos, como o nicho que cada espécie ocupa no ambiente. Diferentes estratégias de uso de N permitiriam a divisão do uso de recursos e a complementaridade de nicho entre espécies do mesmo grupo sucessional, contribuindo assim para sua coexistência e para a alta diversidade de plantas em florestas neotropicais (Boudsocq et al. 2012; Britto e Kronzucker 2013).

## Conclusões

- Quanto à primeira hipótese: “As espécies pioneiras apresentam maior crescimento no tratamento com  $\text{NO}_3^-$  e apresentam sensibilidade à toxicidade do  $\text{NH}_4^+$ , enquanto as espécies não pioneiras apresentam maior crescimento no tratamento com  $\text{NH}_4^+$ ”. De acordo com os resultados encontrados, aceita-se a hipótese. As espécies pioneiras apresentaram maior crescimento quando cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  e realmente apresentaram sintomas de toxicidade na presença de  $\text{NH}_4^+$ , como o crescimento reduzido e clorose nas folhas. As espécies não pioneiras foram tolerantes ao  $\text{NH}_4^+$  e, inclusive, o crescimento

de *C. estrellensis* no tratamento com  $\text{NH}_4^+$  foi favorecido em relação ao tratamento com  $\text{NO}_3^-$ .

- Quanto à segunda hipótese “As espécies pioneiras absorvem preferencialmente o  $\text{NO}_3^-$ , enquanto as espécies não pioneiras absorvem preferencialmente o  $\text{NH}_4^+$ ”. A partir dos resultados de absorção é possível aceitar a parcialmente a hipótese. De fato, as espécies pioneiras absorveram preferencialmente o  $\text{NO}_3^-$ . Porém, houve diferença na absorção das fontes nitrogenadas entre as espécies não pioneiras. *C. estrellensis* absorveu igualmente  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ , enquanto *E. brasiliensis* absorveu preferencialmente  $\text{NH}_4^+$ .
- Quanto à terceira hipótese: “Nas espécies pioneiras, a assimilação do  $\text{NO}_3^-$  ocorre principalmente nas folhas, enquanto a assimilação do  $\text{NH}_4^+$  ocorre principalmente na raiz. Já nas espécies não pioneiras a assimilação das duas fontes de nitrogênio ocorre principalmente na raiz”. Os resultados corroboram parcialmente a hipótese. Quando cultivadas com  $\text{NH}_4^+$ , as mudas de todas as espécies assimilaram esse cátion principalmente na raiz. No tratamento com  $\text{NO}_3^-$ , as espécies pioneiras realmente assimilaram esse ânion principalmente nas folhas e *E. brasiliensis* (não pioneira) o assimilou principalmente na raiz. Por outro lado, em *C. estrellensis*, a assimilação de  $\text{NO}_3^-$  ocorreu principalmente nas folhas.
- Quanto à quarta hipótese: “Há padrões no metabolismo de aminoácidos em raiz e folha e na translocação desses compostos nitrogenados pela seiva do xilema entre espécies de um grupo sucessional.”. De fato, há padrões nos aminoácidos mais abundantes, como Asn e Gln na seiva do xilema das pioneiras e não pioneiras, respectivamente, o que corrobora a hipótese. Porém, também há particularidades do metabolismo de aminoácidos de cada espécie.

### Referências bibliográficas

Aidar MPM, Schmidt S, Moss G, Stewart GR, Joly CA (2003) Nitrogen use strategies of neotropical rainforest trees in threatened Atlantic Forest. *Plant Cell Environ* 26:389-399

Andrews M, Raven JA, Lea PJ (2013) Do plants need nitrate? The mechanisms by which nitrogen form affects plants. *Ann Appl Biol* 163: 174-199

Ashton IW, Miller AE, Bowman WD, Suding KN (2010) Niche complementarity due to plasticity in resource use: plant partitioning of chemical N forms. *Ecology* 91:3252-326

Bazzaz FA, Pickett STA (1980) Physiological ecology of tropical succession: a comparative review. *Ann Rev Ecol Syst* 11:287-310

Bloom AJ (1997) Nitrogen as a limiting factor: Crop acquisition of ammonium and nitrate. In: Jackson LE (ed) *Ecology in Agriculture*, pp 145-172, Academic Press, San Diego (ISBN 9780123782601)

Boudsocq S, Niboyet A, Lata JC, Raynaud X, Loeuille N, Mathieu J, Blouin M, Abbadie L, Barot S (2012) Plant preference for ammonium versus nitrate: a neglected determinant of ecosystem functioning? *Am Nat* 180:60-69

Bradford MM (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 DT, Kronzucker HJ (2002)  $\text{NH}_4^+$  toxicity in higher plants: a critical review. *J Plant Physiol* 159:567-584

Britto DT, Kronzucker HJ (2013) Ecological significance and complexity of N-source preference in plants. *Ann Bot* 112:957-963

Campos MMS (2009) *Ecofisiologia de uso do N em espécies arbóreas da Floresta Ombrófila Densa das Terras Baixas, Ubatuba, SP.* (Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica/SMA – São Paulo/SP)

Carvalho PER (1994) *Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira.* Embrapa CNPF, Brasília

Chaves das Neves HJ, Vasconcelos AMP (1987) Capillary gas chromatography of amino acids, including asparagine and glutamine: sensitive gas chromatographic-mass spectrometric and selected ion monitoring gas chromatographic-mass spectrometric detection of the N, O (S)-*tert*-butyldimethylsilyl derivatives. *J Chromatogr* 392:249-258

- Crawford LA, Bown AW, Breitzkreuz KE, Frédérique CG (1994) The synthesis of  $\gamma$ -aminobutyric acid in response to treatments reducing cytosolic pH. *Plant Physiol* 104:865-871
- de Graaf MCC, Bobbink R, Jan GM, Roelofs M, Verbeek PJM (1998) Differential effects of ammonium and nitrate on three heathland species. *Plant Ecol* 135:185-196
- Dechorgnat J, Nguyen CT, Armengaud P, Jossier M, Diatloff E, Filleur S, Daniel-Vedele F (2011) From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants. *J Exp Bot* 62:1349-1359
- Dickson RE (1989) Carbon and nitrogen allocation in trees. In: Dreyer E (ed) *Forest tree physiology*, pp 631-647, Elsevier, Amsterdam (ISSN 0034312)
- Finnemann J, Schjoerring JK (1998) Ammonium and soluble amide-bound nitrogen in leaves of *Brassica napus* as related to glutamine synthetase activity and external N supply. *Plant Physiol Biochem* 36:339-346
- Guo S, Brueck H, Sattelmacher B (2002) Effects of supplied nitrogen form on growth and water uptake of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. *Plant Soil* 239:267-275
- 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
- Hachiya T, Watanabe CK, Fujimoto M, Ishikawa T, Takahara K, Kawai-Yamada M, Hirofumi Uchimiya H, Uesono Y, Terashima I, Noguchi K (2010) Nitrate addition alleviates ammonium toxicity without lessening ammonium accumulation, organic acid depletion and inorganic cation depletion in *Arabidopsis thaliana* shoots. *Plant Cell Physiol* 53:577-591
- Hageman RH, Reed AJ (1980) Nitrate reductase from higher plants. *Method Enzymol* 69:270-280
- Hare PD, Cress WA (1997) Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regul* 21:79-102

Hunt R (1982) Plant growth curves. The functional approach to plant growth analysis, Edward Arnold, London (ISBN 9780839117575)

IAPAR - Instituto Agronômico do Paraná (2000) Cartas climáticas do estado do Paraná. Fundação Instituto Agronômico do Paraná, Londrina

Jaeger C, Gessler A, Biller S, Rennenberg H, Kreuzwieser J (2009) Differences in C metabolism of ash species and provenances as a consequence of root oxygen deprivation by waterlogging. *J Exp Bot* 60:4335-4345

Keys AJ, Bird IF, Cornelius MJ (1978) Photorespiratory nitrogen cycle. *Nature* 275:741-742

Kohama S, Maluf AM, Bilia DAC, Barbedo CJ (2006) Secagem e armazenamento de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Grumixameira). *Rev Bras Sem.* 28:72-78

Kraiser T, Gras DE, Gutiérrez AG, González B, Gutiérrez RA (2011) A holistic view of nitrogen acquisition in plants. *J Exp Bot* 62:1455-1466

Krapp A (2015) Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces. *Curr Opin Plant Biol* 25:115-122

Kronzucker HJ, Siddiqi MY, Glass ADM (1997) Conifer root discrimination against soil nitrate and the ecology of forest succession. *Nature* 385:59-61

Latansio-Aidar SR (2013) Economia do nitrogênio em árvores tropicais. (Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas – Campinas/SP)

Lea PJ, Sodek L, Parry MAJ, Shewry PR, Halford NG (2007) Asparagine in plants. *Ann Appl Biol* 150:1-26

Leidi EO, Silberbush M, Soares MIM, Lips SH (1992) Salinity and nitrogen nutrition studies on peanut and cotton plants. *J Plant Nutr.* 15:591-604

Lorenzi H (2008) Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil, 384 p, v 1, 5 ed. Plantarum, São Paulo (ISBN 9788586714498)

Malaguti D, Millard P, Wendler R, Hepburn A, Tagliavini M (2001) Translocation of amino acids in the xylem of apple (*Malus domestica* Borkh.) trees in spring as a consequence of both N remobilization and root uptake. *J Exp Bot* 52: 1665-1671

Marchiori NM (2012) Aspectos funcionais da floresta ombrófila densa montana, PESM: estrutura, biomassa aérea, uso de nitrogênio e fotossíntese. (Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas – Campinas/SP)

McCullough H (1967) The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clin Chim Acta* 17:297-304

Meyer C, Stitt M (2001) Nitrate reduction and signaling. In: Lea PJ, Morot-Gaudry JF (eds) *Plant Nitrogen*, pp 37-60. Springer, Berlin (ISBN 9783662040645)

Micallef BJ, Shelp BJ (1989) Arginine metabolism in developing soybean cotyledons. *Plant Physiol* 90:624-630

Millard P, Wendler R, Hepburn A, Smith A (1998) Variation in the amino acid composition of xylem sap of *Betula pendula* Roth. trees due to remobilization of stores N in the spring. *Plant Cell Environ* 21:715-722

Miller AJ, Cramer MD (2004) Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant Soil* 274:1-36

Miller AJ, Fan X, Orsel M, Smith SJ, Wells DM (2007) Nitrate transport and signalling. *J Exp Bot* 9:2297-2306

Miranda KM, Espey MG, Wink DA (2001) A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 5:62-71

Oaks A, Hirel B (1985) Nitrogen metabolism in roots. *Annu Rev Plant Physiol* 36:345-365

Oliveira HC, Freschi L, Sodek L (2013) Nitrogen metabolism and translocation in soybean plants subjected to root oxygen deficiency. *Plant Physiol Biochem* 66:141-149

Oliveira HC, Silva LMI, Freitas LD, Debiasi TV, Marchiori NM, Aidar MPM, Bianchini E, Pimenta JÁ, Stolf-Moreira R (2017) Nitrogen use strategies of seedlings from neotropical trees species of distinct successional groups. *Plant Physiol Biochem* 114:119-127

Oliveira HC, Sodek L (2013) Effect of oxygen deficiency on nitrogen assimilation and amino acid metabolism by soybean root segments. *Amino Acids* 44:743-755

Pereira-Silva EFL (2008) Estratégias ecofisiológicas no uso de nitrogênio em espécies arbóreas de Floresta Ombrófila Densa Submontana e Estacional Semidecidual, SP. (Tese de Doutorado, Universidade de Campinas – Campinas)

Raab TK, Terry N (1994) Nitrogen source regulation of growth and photosynthesis in *Beta vulgaris* L. *Plant Physiol* 105:1159-1166

Roosta HR, Schjoerring JK (2007) Effects of ammonium toxicity on nitrogen metabolism and elemental profile of cucumber plants. *J Plant Nutr* 30:1933-1951

Ros R, Muñoz-Bertomeu J, Krueger S (2014) Serine in plants: Biosynthesis, metabolism, and functions. *Trends Plant Sci* 19:564-569

Sarasketa A, González-Moro MB, González-Murua C, Marino D (2014) Exploring ammonium tolerance in a large panel of *Arabidopsis thaliana* natural accessions. *J Exp Bot* 65:6023-33

Sarasketa A, González-Moro MB, González-Murua C, Marino D (2016) Nitrogen source and external medium pH interaction differentially affects root and shoot metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Sci* 7:7-29

Saradhi PP, Arora AS, Prasad KVSK (1995) Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV induced peroxidation. *Biochem Bioph Res Co* 209:1-5

Schimann H, Ponton S, Hattenschwiler S, Ferry B, Lensi R, Domenach AM, Roggy JC (2008) Differing nitrogen use strategies of two tropical rainforest late successional tree species in French Guiana: Evidence from. *Soil Biol Biochem* 40:487-494

Schubert S, Yan F (1997) Nitrate and ammonium nutrition of plants: effects on acid/base balance and adaptation of root cell plasmalemma  $H^+$  ATPase. *J Plant Nutr Soil Sc* 160:275-281

Siddiqi MY, Malhotra B, Min X, Glass ADM (2002) Effects of ammonium and inorganic carbon enrichment on growth and yield of a hydroponic tomato crop. *Plant Nutr Soil Sci* 165:191-197

Silva JG (2012) Ecofisiologia do uso de nitrogênio em espécies arbóreas da Floresta Ombrófila Densa, Caraguatatuba, SP. (Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica/SMA – São Paulo/SP)

Silvester WB, Parsons R, Watt PW (1996) Direct measurement of release and assimilation of ammonia in the *Gunnera-Nostoc* symbiosis. *New Phytol* 132:617-625

Singh BK (1999) *Plant amino acids: biochemistry and biotechnology*, 948 p, Marcel Dekker, New York (ISBN 9780824702045)

Siripornadulsil S, Traina S, Verma DPS, Sayre RT (2002) Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy in transgenic microalgae. *The Plant Cell* 14:2837-2847

Smirnoff N, Stewart GR (1985) Nitrate assimilation and translocation by higher plants: Comparative physiology and ecological consequences. *Physiol Plantarum* 64:133-140

Sodek L (2004) Metabolismo do nitrogênio. In: Kerbauy GB (ed) *Fisiologia vegetal*, 2 ed, pp 65-81. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro (ISBN 9788527714457)

Souza GM, Ribeiro RV, Sato AM, Oliveira MS (2008) Diurnal and seasonal carbon balance of four tropical tree species differing in successional status. *Braz J Biol* 68:781-793

Stewart GR, Hegarty EE, Specht RL (1988) Inorganic nitrogen assimilation in plants of Australian rainforest communities. *Plant Physiol* 74:26-33

Stewart GR, Joly CA Smirnoff N (1992). Partitioning of inorganic nitrogen assimilation between the roots and shoots of cerrado and forest trees of contrasting plant communities of South East Brazil. *Oecologia* 91:511-517

Stewart GR, Mann AF, Fentem PA (1980) Enzymes of glutamate formation: glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase, and glutamate synthase. In: Stumpf PK Conn E (eds) *The biochemistry of plants*, pp 271-320, Academic Press, New York (ISBN 9780126754148)

Stewart GR, Popp M, Holzzapfel I, Stewart JA, Dickie-Eskew ANN (1986) Localization of nitrate reduction in ferns and its relationship to environment and physiological characteristics. *New Phytol* 104:373-384

Suárez MF, Avila C, Gallardo F, Cantón FR, Garcia-Gutiérrez A, Claros MG, Cánovas FM (2002) Molecular and enzymatic analysis of ammonium assimilation in woody plants. *J Exp Bot* 370:891-904

Verbruggen N, Hermans C (2008) Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35:753-759

Walch-Liu P, Neumann G, Bangerth F, Engels C (2000) Rapid effects of nitrogen form on leaf morphogenesis in tobacco. *J Exp Bot* 51:227-237

Yemm EW, Cocking EC (1955) The determination of amino acid with ninhydrin. *Analyst* 80: 209-213.

Zhu Z, Gerendas J, Bendixen R, Schinner K, Tabrizi H, Sattelmacher B, Hansen UP (2000) Different tolerance to light stress in  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  grown *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Biol* 2:558-570