



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LIGIA MARIA INOCÊNCIO DA SILVA

**AVALIAÇÃO ECOFISIOLÓGICA DE MUDAS DE ESPÉCIES  
ARBÓREAS SUBMETIDAS A DIFERENTES FONTES DE  
NITROGÊNIO E À INTERAÇÃO COM *Brachiaria decumbens*  
Stapf (POACEAE)**



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA



FUNDAÇÃO  
ARAUCÁRIA



m e s t r a d o  
ciências biológicas  
zoologia e botânica

---

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

LIGIA MARIA INOCÊNCIO DA SILVA

**AVALIAÇÃO ECOFISIOLÓGICA DE MUDAS DE ESPÉCIES  
ARBÓREAS SUBMETIDAS A DIFERENTES FONTES DE  
NITROGÊNIO E À INTERAÇÃO COM *Brachiaria decumbens*  
Stapf (POACEAE)**

---

Londrina - PR

2017

LIGIA MARIA INOCÊNCIO DA SILVA

**AVALIAÇÃO ECOFISIOLÓGICA DE MUDAS DE ESPÉCIES  
ARBÓREAS SUBMETIDAS A DIFERENTES FONTES DE  
NITROGÊNIO E À INTERAÇÃO COM *Brachiaria decumbens*  
Stapf (POACEAE)**

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.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Stolf Moreira.

Coorientador: Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira.

Londrina  
2017

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

Inocêncio, Ligia Maria Inocêncio da Silva.

Avaliação ecofisiológica de mudas de espécies arbóreas submetidas a diferentes fontes de nitrogênio e à interação com *Brachiaria decumbens* Stapf (Poaceae / Ligia Maria Inocêncio da Silva Inocêncio. - Londrina, 2017.

81 f. il.

Orientador: Renata Stolf Moreira, Stolf-Moreira.

Coorientador: Halley Caixeta de Oliveira, Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Reflorestamento - Tese. 2. Mudas arbóreas nativas - Tese. 3. Metabolismo do Nitrogênio - Tese. 4. Braquiária - Tese. I. Stolf-Moreira, Renata Stolf Moreira. II. Oliveira, Halley Caixeta de Oliveira. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

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

*DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO*

Discente: **Ligia Maria Inocência da Silva**

Título: "Avaliação ecofisiológica de mudas de espécies arbóreas submetidas a diferentes fontes de nitrogênio e à interação com *Brachiaria decumbens* Stapf (POACEAE)"

Data da Defesa: 22 de fevereiro de 2017 as 14:00 horas. na CCB S/10, desta Universidade.

**Banca Examinadora**

**Parecer**

Presidente:

Dr. Renata Stolf Moreira

APROVADA

Titulares:

Dr. José Antonio Pimenta

APROVADA

Dr. André Luiz Martinez de Oliveira

APROVADA

Parecer Final APROVADA

Renata Stolf Moreira

Dr<sup>a</sup> Renata Stolf Moreira

Dr. José Antonio Pimenta

André Luiz M. de Oliveira  
Dr. André Luiz Martinez de Oliveira

*Aos meus maiores tesouros  
Meus avós Jair, Nanci, Mauro e Angela,  
Meus pais, Andréa e Gilberto, meus irmãos Eloá e Miguel,  
e meu marido Dionathan*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Andréa Ziza Inocência da Silva e Gilberto Inocência da Silva, e aos meus irmãos Eloá Inocência da Silva e Miguel Inocência da Silva, pelo apoio e amor incondicional;

À todos meus familiares, principalmente aos meus avós Jair, Nanci, Mauro e Ângela por todo incentivo e amor;

À professora Dr<sup>a</sup>. Renata Stolf Moreira, pela oportunidade de desenvolver esse estudo sob sua orientação, pela atenção e pela amizade ao longo dos últimos anos;

Ao Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira, pela coorientação constante e pela amizade;

Ao Prof. Dr. José Antonio Pimenta e ao Prof. Dr. José Marcelo Torezan pelas contribuições no exame de qualificação;

Aos membros da banca de defesa Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira e Prof. Dr. José Antonio Pimenta por todas as considerações feitas;

Aos amigos de laboratório Tatiane Debiase, Anderson Kikuchi, Mariana Hertel e Angélica Tiepo, pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho e pela amizade;

Aos meus queridos amigos, Giovanna Inocência, Nagyla Pierolli, Lucas Milanez e Camila Vrech, por nossa amizade e companheirismo;

Ao Dionathan Adriano Georgi, por todo amor, carinho, incentivo e por estar ao meu lado nos momentos difíceis;

À CAPES e à FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA pela bolsa de estudos concedida;

À Universidade Estadual de Londrina pela minha formação profissional;

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho,

**Meus sinceros agradecimentos!**

SILVA, Ligia Maria Inocência da. **Avaliação ecofisiológica de mudas de espécies arbóreas submetidas a diferentes fontes de nitrogênio e à interação com *Brachiaria decumbens* Stapf (Poaceae)**. 2017. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## RESUMO

Apesar da importância do Nitrogênio (N) para a restauração de ambientes degradados, poucos estudos abordam as estratégias de uso deste nutriente por mudas de espécies arbóreas nativas neotropicais. Um dos principais desafios a ser vencido no processo de restauração é o estabelecimento de mudas em áreas ocupadas por gramíneas invasoras, uma vez que essas plantas limitam o crescimento de espécies arbóreas nativas em função da elevada competição por recursos e pela ação alelopática. A caracterização ecofisiológica de mudas arbóreas nativas e a verificação dos efeitos causados pela interação com gramíneas invasoras nessas mudas arbóreas são de grande importância em programas de restauração, uma vez que permite prever fatores que beneficiam ou não a sobrevivência e o desenvolvimento inicial dessas mudas no campo, garantindo assim o sucesso desses plantios. Este estudo teve como objetivo caracterizar as estratégias de uso do N de duas espécies de plantas de diferentes grupos sucessionais utilizadas em programas de reflorestamento da Mata Atlântica, uma pioneira: *Cecropia pachystachya* Trécul (Urticaceae), e uma não-pioneira: *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae), cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  e/ou  $\text{NH}_4^+$ . Além disso, foram verificados os efeitos causados pela alelopatia e pela competição com *Brachiaria decumbens* Stapf, no metabolismo, na fisiologia e no crescimento dessas mudas arbóreas nativas. *C. pachystachya* apresentou alta sensibilidade ao  $\text{NH}_4^+$ , tendo sua taxa fotossintética e seu crescimento reduzidos quando as mudas foram expostas a esta fonte de N, diferente de *E. brasiliensis* que apresentou alta tolerância ao  $\text{NH}_4^+$ . A caracterização das estratégias de uso de N das espécies nativas corroborou estudos prévios feitos em campo. *C. pachystachya* apresentou baixa atividade assimilatória de  $\text{NO}_3^-$  nas raízes, alta translocação de  $\text{NO}_3^-$  pela seiva do xilema e alta redução dessa fonte de N na folha. Já *E. brasiliensis* apresentou alta assimilação de N nas raízes, baixa assimilação de N foliar e consequente translocação de aminoácidos pela seiva do xilema. A análise dos efeitos causados pela interação com *B. decumbens* demonstrou que *C. pachystachya* apresentou alta sensibilidade aos aleloquímicos presentes no exsudado de raiz de *B. decumbens*, tendo seu crescimento, sua fisiologia e seu metabolismo fortemente prejudicados, indicando que houve uma inibição de absorção de nutrientes pelas raízes. Diferente disto, *E. brasiliensis* mostrou-se pouco sensível à presença de aleloquímicos no solo. Quando cultivadas com a braquiária, as duas espécies arbóreas tiveram seus parâmetros fisiológicos e seu crescimento prejudicados, além de uma alteração no metabolismo de N, o que deve estar relacionado à competição por nutrientes em adição ao efeito alelopático aos quais estas mudas estavam expostas. Estes resultados permitem supor que as mudas da espécie pioneira teriam maior sucesso em solos com predominância de  $\text{NO}_3^-$ , diferente da espécie não-pioneira que se desenvolveria melhor em solos contendo  $\text{NH}_4^+$  predominantemente. Em solos com histórico de ocupação por *B. decumbens*, as mudas de *E. brasiliensis* apresentariam maior sucesso. Já em áreas de reflorestamento suscetível a presença de braquiária, nenhuma das espécies arbóreas é indicada para o plantio, uma vez que ambas foram sensíveis ao cultivo simultâneo com *B. decumbens*.

**Palavras-chave:** Espécies pioneiras. Espécies não-pioneiras. Sucessão vegetal. Nitrato. Amônio. Aleloquímicos. *Urochloa decumbens*.

SILVA, Ligia Maria Inocência da. **Ecophysiological evaluation of seedlings of tree species submitted to different nitrogen sources and to interaction with *Brachiaria decumbens* Stapf (Poaceae)**. 2017. 81 p. Dissertation (Master's degree in Biological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## ABSTRACT

Despite the relevance of Nitrogen (N) for the restoration of degraded environments, few studies have addressed the strategies of use of this nutrient by seedlings of native neotropical tree species. One of the main challenges to overcome in the restoration process is the establishment of seedlings in areas occupied by invasive grasses, since these plants limit the growth of native tree species through intense competition for resources as well as by allelopathic activity. The ecophysiological characterization of native tree seedlings and the verification of the effects caused by the interaction with invasive grasses in these tree seedlings are of great importance in restoration programs, since it would allow to predict the factors that would benefit or not their survival and initial development in the field, thus achieving more success of these plantations. This study aimed to characterize the N use strategies of two plant species of different successional groups used in Atlantic Forest reforestation programs, a pioneer: *Cecropia pachystachya* Trécul (Urticaceae), and a non-pioneer: *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae), cultivated with  $\text{NO}_3^-$  and/or  $\text{NH}_4^+$ . In addition, the effects caused by allelopathy and competition with *Brachiaria decumbens* Stapf on the metabolism, physiology and growth of these native tree seedlings were verified. *C. pachystachya* showed high sensitivity to  $\text{NH}_4^+$ , with its photosynthetic rate and growth reduced when the seedlings were exposed to this N source, different from *E. brasiliensis* that presented high tolerance to  $\text{NH}_4^+$ . The characterization of N use strategies of native species corroborated previous field studies. *C. pachystachya* presented low  $\text{NO}_3^-$  assimilation in roots, high translocation of  $\text{NO}_3^-$  in the xylem sap and high reduction of this source of N in the leaf. Differently, *E. brasiliensis* had high N assimilation in roots and consequent translocation of amino acids by xylem sap. The analysis of the effects caused by interaction with *B. decumbens* showed that *C. pachystachya* seedlings had high sensibility to allelochemicals present in the exudate of *B. decumbens* roots, having their growth, physiology and metabolism strongly impaired, indicating that there was inhibition of nutrient absorption by roots. On the other hand, *E. brasiliensis* was not sensitive to allelochemicals presence in soil. When cultivated together with the grass, both species had their physiological parameters and growth impaired, in addition to alteration in N metabolism, which may be related to competition for nutrients in conjunction with the allelochemicals which seedlings were exposed to. These results suggest that the seedlings of the pioneer species would have greater success in soils with predominance of  $\text{NO}_3^-$ , different from the non-pioneer species that would develop better in soils containing predominantly  $\text{NH}_4^+$ . In soils with occupation history by *B. decumbens*, *E. brasiliensis* seedlings would be more successful. Reforestation areas susceptible to the presence of *Brachiaria*, none of the tree species is indicated for planting, since both were sensitive to the simultaneous cultivation with *B. decumbens*.

**Keywords:** Pioneer species. Non-pioneer species. Plant succession. Nitrate. Ammonium. Allelopathic; *Urochloa decumbens*.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Quantificação relativa (%) de nitrato e amônio no substrato de cultivo das mudas de *Cecropia pachystachya* e *Eugenia brasiliensis* cultivadas em areia acrescida de diferentes fontes inorgânicas de nitrogênio ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{NH}_4^+$ ). As análises estatísticas envolveram somente comparações intraespecíficas. Letras minúsculas comparam a porcentagem de nitrato, assim como letras maiúsculas comparam a porcentagem de amônio. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )..... 26
- Figura 2.** Trocas gasosas foliares de mudas de *Cecropia pachystachya* e *Eugenia brasiliensis* cultivadas com diferentes fontes inorgânicas de nitrogênio ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{NH}_4^+$ ). A- fotossíntese líquida (A); B- condutância estomática ( $g_s$ ); C- transpiração (E); e D- eficiência instantânea de carboxilação (k). As análises estatísticas envolveram somente comparações intraespecíficas. Letras minúsculas comparam os tratamentos em *C. pachystachya*, assim como letras maiúsculas comparam os tratamentos em *E. brasiliensis*. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) ..... 28
- Figura 3.** Fluorescência da clorofila e conteúdo de clorofila total de folhas de mudas de *Cecropia pachystachya* e *Eugenia brasiliensis* cultivadas com diferentes fontes inorgânicas de nitrogênio ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{NH}_4^+$ ). A- eficiência máxima do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ); B- taxa de transporte de elétrons (ETR); e C- conteúdo de clorofila a + clorofila b (clorofila total). As análises estatísticas envolveram somente comparações intraespecíficas. Letras minúsculas comparam os tratamentos em *C. pachystachya*, assim como letras maiúsculas comparam os tratamentos em *E. brasiliensis*. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) ..... 28
- Figura 4.** Atividade da enzima Nitrato Redutase (NR), em raiz e folha de mudas de *Cecropia pachystachya* (A) e *Eugenia brasiliensis* (B) cultivadas com diferentes fontes inorgânicas de nitrogênio ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{NH}_4^+$ ). As

análises estatísticas envolveram somente comparações intraespecíficas. Letras minúsculas nas raízes, assim como letras maiúsculas nas folhas comparam os tratamentos. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,050$ ) ..... 29

**Figura 5.** Atividade da enzima Nitrato Redutase (NR) (A) e Conteúdo de nitrato (B) em raiz e folha de mudas de *Cecropia pachystachya* e *Eugenia brasiliensis* cultivadas com  $\text{NO}_3^-$ . As análises estatísticas envolveram comparações intraespecíficas e interespecíficas. Letras maiúsculas comparam raiz e folha em cada espécie. Letras minúsculas comparam as espécies em cada órgão vegetal. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) ..... 30

**Figura 6.** Conteúdo de Nitrato (A e B) e Amônio (C e D) em raiz e folha de mudas de *Cecropia pachystachya* (A e C) e *Eugenia brasiliensis* (B e D) cultivadas com diferentes fontes inorgânicas de nitrogênio ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{NH}_4^+$ ). As análises estatísticas envolveram somente comparações intraespecíficas. Letras minúsculas nas raízes, assim como letras maiúsculas nas folhas comparam os tratamentos. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) ..... 31

**Figura 7.** Conteúdo de Aminoácidos solúveis totais (A e B) e Proteínas totais (C e D) em raiz e folha de mudas de *Cecropia pachystachya* (A e C) e *Eugenia brasiliensis* (B e D) cultivadas com diferentes fontes inorgânicas de nitrogênio ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{NH}_4^+$ ). As análises estatísticas envolveram somente comparações intraespecíficas. Letras minúsculas nas raízes, assim como letras maiúsculas nas folhas comparam os tratamentos. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) ..... 31

## CAPÍTULO 2

**Figura 1.** Trocas gasosas foliares de mudas de *Cecropia pachystachya* e *Eugenia brasiliensis* cultivadas em conjunto com *Brachiaria decumbens* (B), submetidas ao tratamento com aleloquímicos exsudados pelas raízes da gramínea (AL) ou sem tratamento (C: controle). A- fotossíntese líquida (A); B- condutância estomática ( $g_s$ ); C- transpiração (E); e D- eficiência

instantânea de carboxilação ( $k$ ). As análises estatísticas envolveram somente comparações intraespecíficas. Letras minúsculas comparam os tratamentos em *C. pachystachya*, assim como letras maiúsculas comparam os tratamentos em *E. brasiliensis*. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) ..... 55

**Figura 2.** Eficiência máxima do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) de folhas de mudas de *Cecropia pachystachya* e *Eugenia brasiliensis* cultivadas em conjunto com *Brachiaria decumbens* (B), submetidas ao tratamento com aleloquímicos exsudados pelas raízes da gramínea (AL) ou sem tratamento (C: controle). As análises estatísticas envolveram somente comparações intraespecíficas. Letras minúsculas comparam os tratamentos em *C. pachystachya*, assim como letras maiúsculas comparam os tratamentos em *E. brasiliensis*. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) ..... 56

**Figura 3.** Atividade da enzima Nitrato Redutase (NR) em raiz e folha de mudas de *Cecropia pachystachya* (A) e *Eugenia brasiliensis* (B) cultivadas em conjunto com *Brachiaria decumbens* (B), submetidas ao tratamento com aleloquímicos exsudados pelas raízes da gramínea (AL) ou sem tratamento (C: controle). As análises estatísticas envolveram somente comparações intraespecíficas. Letras minúsculas comparam os tratamentos nas raízes, assim como letras maiúsculas comparam os tratamentos nas folhas. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) ..... 57

**Figura 4.** Conteúdo de Nitrato (A e B) e Amônio (C e D) em raiz e folha de mudas de *Cecropia pachystachya* (A e C) e *Eugenia brasiliensis* (B e D) cultivadas em conjunto com *Brachiaria decumbens* (B), submetidas ao tratamento com aleloquímicos exsudados pelas raízes da gramínea (AL) ou sem tratamento (C: controle). As análises estatísticas envolveram somente comparações intraespecíficas. Letras minúsculas comparam os tratamentos nas raízes, assim como letras maiúsculas comparam os tratamentos nas folhas. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )..... 58

**Figura 5.** Conteúdo de Aminoácidos solúveis totais (A e B) e Proteínas totais (C e D) em raiz e folha de mudas de *Cecropia pachystachya* (A e C) e *Eugenia brasiliensis* (B e D) cultivadas em conjunto com *Brachiaria decumbens* (B), submetidas ao tratamento com aleloquímicos exsudados pelas raízes

da gramínea (AL) ou sem tratamento (C: controle). As análises estatísticas envolveram somente comparações intraespecíficas. Letras minúsculas comparam os tratamentos nas raízes, assim como letras maiúsculas comparam os tratamentos nas folhas. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) ..... 59

**Figura 6.** Taxa de nitrificação biológica líquida no solo de cultivo das mudas de *Cecropia pachystachya* e *Eugenia brasiliensis* cultivadas em conjunto com *Brachiaria decumbens* (B), submetidas ao tratamento com aleloquímicos exsudados pelas raízes da gramínea (AL) ou sem tratamento (C: controle). As análises estatísticas envolveram somente comparações intraespecíficas. Letras minúsculas comparam os tratamentos em *C. pachystachya*, assim como letras maiúsculas comparam os tratamentos em *E. brasiliensis*. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) ..... 60

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

- Tabela 1.** Composição da solução nutritiva padrão livre de nitrogênio utilizada na rega da areia dos vasos em que foram cultivadas as mudas de *Cecropia pachystachya* e *Eugenia brasiliensis*..... 22
- Tabela 2.** Médias e erros-padrão de parâmetros referentes ao crescimento de mudas de *Cecropia pachystachya* (*Cp*) e *Eugenia brasiliensis* (*Eb*) cultivadas com diferentes fontes inorgânicas de nitrogênio ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{NH}_4^+$ ). As análises estatísticas envolveram somente comparações intraespecíficas. Letras minúsculas na linha comparam os tratamentos em *Cp*, assim como letras maiúsculas na linha comparam os tratamentos em *Eb*. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )..... 27
- Tabela 3.** Médias e erros-padrão da porcentagem (mol %) de Nitrato, Amônio e Aminoácidos solúveis totais na seiva do xilema de mudas de *Cecropia pachystachya* (*Cp*) e *Eugenia brasiliensis* (*Eb*) cultivadas com diferentes fontes inorgânicas de nitrogênio ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{NH}_4^+$ ). As análises estatísticas envolveram somente comparações intraespecíficas. Letras minúsculas na linha comparam os tratamentos em *Cp*, assim como letras maiúsculas na linha comparam os tratamentos em *Eb*. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )..... 32

### CAPÍTULO 2

- Tabela 1.** Composição da solução nutritiva padrão utilizada na rega do solo fértil em que foram cultivados os indivíduos de *Brachiaria decumbens* e as mudas de *Cecropia pachystachya* e *Eugenia brasiliensis* ..... 50
- Tabela 2.** Médias e erros-padrão de parâmetros referentes ao crescimento de mudas de *Cecropia pachystachya* (*Cp*) e *Eugenia brasiliensis* (*Eb*) cultivadas em conjunto com *Brachiaria decumbens* (*B*), submetidas ao tratamento com aleloquímicos exsudados pelas raízes da gramínea (*AL*) ou sem tratamento (*C*: controle). As análises estatísticas envolveram somente comparações intraespecíficas. Letras minúsculas na linha comparam os tratamentos em

*Cp*, assim como letras maiúsculas na linha comparam os tratamentos em *Eb*. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )..... 54

**Tabela 3.** Médias e erros-padrão da porcentagem de Clorofila *a* (Chla) e Clorofila *b* (Chlb), e da concentração de Clorofila total (Chla+Chlb) em folhas de mudas de *Cecropia pachystachya* (*Cp*) e *Eugenia brasiliensis* (*Eb*) cultivadas em conjunto com *Brachiaria decumbens* (B), submetidas ao tratamento com aleloquímicos exsudados pelas raízes da gramínea (AL) ou sem tratamento (C: controle). As análises estatísticas envolveram somente comparações intraespecíficas. Letras minúsculas na linha comparam os tratamentos em *C. pachystachya*, assim como letras maiúsculas na linha comparam os tratamentos em *E. brasiliensis*. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) ..... 57

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>1</b>	
<b>1.1</b>	<b>Importância do nitrogênio para o reflorestamento</b> .....	<b>1</b>	
<b>1.2</b>	<b>Restauração de habitats ocupados por braquiária</b> .....	<b>5</b>	
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS GERAIS</b> .....	<b>8</b>	
<b>3.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>8</b>	
<b>CAPÍTULO 1 – Avaliação ecofisiológica de mudas de <i>Cecropia pachystachya</i></b>			
<b>Trécul (pioneira) e <i>Eugenia brasiliensis</i> Lam. (não-pioneira)</b>			
<b>cultivadas com diferentes fontes inorgânicas de nitrogênio</b> .....			<b>15</b>
	<b>Resumo</b> .....	<b>16</b>	
	<b>Abstract</b> .....	<b>17</b>	
	<b>Introdução</b> .....	<b>18</b>	
	<b>Material e métodos</b> .....	<b>21</b>	
	<i>Local de estudo</i> 21		
	<i>Espécies de plantas</i> .....	<b>21</b>	
	<i>Crescimento inicial e condições de cultivo</i> .....	<b>21</b>	
	<i>Extração e análise da concentração relativa de nitrogênio mineral do substrato</i> .....	<b>22</b>	
	<i>Análises de crescimento</i> .....	<b>23</b>	
	<i>Análises das trocas gasosas</i> .....	<b>23</b>	
	<i>Análises de fluorescência da clorofila</i> .....	<b>23</b>	
	<i>Extração e análise dos metabólitos primários</i> .....	<b>24</b>	
	<i>Determinação da atividade da enzima nitrato redutase</i> .....	<b>25</b>	
	<i>Coleta e análise da seiva do xilema</i> .....	<b>24</b>	
	<i>Análise estatística</i> .....	<b>25</b>	
	<b>Resultados</b> .....	<b>25</b>	
	<b>Discussão</b> .....	<b>32</b>	
	<b>Referências bibliográficas</b> .....	<b>36</b>	

<b>CAPÍTULO 2 – Avaliação ecofisiológica de mudas de <i>Cecropia pachystachya</i></b>	
<b>Trécul (pioneira) e <i>Eugenia brasiliensis</i> Lam. (não-pioneira) em</b>	
<b>interação com <i>Brachiaria decumbens</i> Stapf .....</b>	<b>42</b>
<b>resumo .....</b>	<b>43</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>44</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>45</b>
<b>Material e métodos .....</b>	<b>47</b>
<i>Local de estudo .....</i>	<i>47</i>
<i>Espécies de plantas .....</i>	<i>47</i>
<i>Crescimento inicial e condições de cultivo .....</i>	<i>48</i>
<i>Montagem do experimento .....</i>	<i>49</i>
<i>Obtenção dos exsudados das raízes de B. decumbens, tratamento AL .....</i>	<i>50</i>
<i>Análises de crescimento .....</i>	<i>51</i>
<i>Análises das trocas gasosas .....</i>	<i>51</i>
<i>Análises de fluorescência da clorofila .....</i>	<i>51</i>
<i>Extração e análise dos metabólitos primários .....</i>	<i>52</i>
<i>Determinação da atividade da enzima nitrato redutase .....</i>	<i>52</i>
<i>Determinação da nitrificação biológica líquida no solo .....</i>	<i>53</i>
<i>Análise estatística .....</i>	<i>53</i>
<b>Resultados .....</b>	<b>53</b>
<b>Discussão .....</b>	<b>60</b>
<b>Referências bibliográficas .....</b>	<b>64</b>
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>69</b>
<b>ANEXO. Guia para autores da revista “Journal of Plant Physiology” .....</b>	<b>71</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 Importância do nitrogênio para o reflorestamento

O bioma Mata Atlântica compõe um rico conjunto de ecossistemas, onde abriga grande parte da diversidade biológica brasileira. Devido ao intenso desmatamento e à elevada degradação de habitats, é considerado um dos biomas mais ameaçados do mundo, tendo atualmente apenas 6,98% de sua cobertura original (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA & INPE 2011). Nas últimas décadas, devido aos impactos ambientais e às mudanças climáticas, a questão ambiental tem sido causa de preocupação, levando a um aumento no surgimento de projetos de recuperação de ambientes degradados. O reflorestamento e/ou a recomposição de áreas degradadas têm se tornado uma alternativa a fim de minimizar os efeitos dos impactos ambientais, além de tentar garantir a manutenção da biodiversidade (FERNANDES *et al.*, 2000).

A necessidade de recomposição de ecossistemas degradados tem levado ao crescente interesse em pesquisas com espécies arbóreas nativas, além do aumento da demanda de mudas dessas espécies (KELLER *et al.*, 2009; SOBRINHO *et al.*, 2010). Os custos dos programas de restauração tornam-se altos devido à necessidade do replantio das mudas, uma vez que elas apresentam elevada mortalidade no campo. A pouca atenção que se tem dado às exigências ecofisiológicas das plantas nativas é uma das razões do insucesso dos plantios dessas mudas (CUNHA *et al.*, 2005), já que estas podem ser expostas a condições ambientais às quais não estão devidamente aclimatadas. Estudos que determinam as características morfológicas, fisiológicas e metabólicas das mudas são de grande importância, pois podem auxiliar na previsão dos fatores que beneficiariam a sobrevivência e o desenvolvimento inicial das mudas no campo, alcançando assim o sucesso dos plantios com espécies arbóreas nativas.

O nitrogênio (N) tem sido apontado como determinante para o desempenho e a distribuição de espécies vegetais em ecossistemas naturais preservados ou não (AIDAR *et al.*, 2003; SIDDIQUE *et al.*, 2010; WANG e MACKO, 2011). Além de ser o nutriente absorvido na forma iônica pelas raízes que compõe os tecidos vegetais em maiores quantidades, o N é um dos recursos mais limitantes à produtividade de muitos ecossistemas (KRAISER *et al.*, 2011; KUSANO *et al.*, 2011). Processos como a fotossíntese, o crescimento e o desenvolvimento vegetal são profundamente influenciados pelo conteúdo de N de uma planta (FOYER *et al.*, 2001; GUO *et al.*, 2007), já que este elemento participa da composição de biomoléculas essenciais como proteínas, ácidos nucleicos e clorofilas (KRAISER *et al.*, 2011; KUSANO *et al.*, 2011).

O N pode ser obtido diretamente do solo, ou através da simbiose com organismos fixadores de N (LEA & AZEVEDO, 2007). O N presente no substrato é absorvido pelas plantas principalmente a partir de fontes inorgânicas, nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), apesar de moléculas orgânicas nitrogenadas também poderem ser utilizadas (BLOOM, 1997; HARRISON *et al.*, 2007; ASHTON *et al.*, 2008). A mineralização é a principal via de produção de N inorgânico, em que organismos transformam a matéria orgânica presente no solo em matéria inorgânica (BARRETO *et al.*, 2006).

Após ser absorvido pelas células da raiz, o  $\text{NO}_3^-$  é reduzido a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) pela enzima nitrato redutase (NR), e este reduzido a  $\text{NH}_4^+$  pela enzima nitrito redutase (NiR). Esse  $\text{NH}_4^+$  recém-formado, assim como aquele diretamente absorvido pelas raízes ou produzido na fotorrespiração, pode ser assimilado em aminoácidos por meio da ação sequencial das enzimas glutamina sintetase e glutamina-2-oxoglutarato aminotransferase (GOGAT), formando glutamina e glutamato, respectivamente (HIREL & LEA, 2001). Esses aminoácidos podem então ser incorporados e formar outros aminoácidos, como asparagina e aspartato, ou podem ser utilizados diretamente na célula (TAIZ & ZEIGER, 2013). A assimilação de N pode ocorrer nas raízes e nas folhas, sendo que a translocação de aminoácidos via xilema na planta caracteriza assimilação de N na raiz (SCHIMIDT & STEWART, 1998), e a translocação de  $\text{NO}_3^-$  indica assimilação de N foliar (AIDAR *et al.*, 2003).

A célula vegetal dispense alta quantidade de energia para absorver e assimilar o N inorgânico. Este custo é mais elevado quando o  $\text{NO}_3^-$  é utilizado, 12 ATPs, em comparação à utilização direta de  $\text{NH}_4^+$  que necessita de 2 ATPs (BLOOM, 1997; BRITTO & KRONZUCKER, 2002), além do uso de poder redutor nas reações catalisadas pelas enzimas NR e NiR, que necessitam de NAD(P)H e ferredoxina reduzida para ocorrerem (OAKS & HIREL, 1985). Apesar da alta quantidade de energia gasta para absorver e assimilar o  $\text{NO}_3^-$ , esta fonte é normalmente mais favorável, pois pode ser estocada e translocada pelo xilema em altas concentrações nas plantas (DECHORGNAT *et al.*, 2011). Diferentemente, o  $\text{NH}_4^+$  pode levar a efeitos tóxicos quando acumulado, devendo ser rapidamente assimilado na raiz após sua absorção ou formação (BLOOM, 1997), caso contrário, poderão ocorrer danos à célula, geralmente associados ao desequilíbrio iônico, hormonal e metabólico (BRITTO & KRONZUCKER, 2002).

A preferência por determinada fonte de N pode diferir entre as espécies de plantas ou grupos funcionais, o que pode representar uma importante resposta adaptativa ao ambiente em que vivem (BRITTO & KRONZUCKER, 2013). Várias espécies arbóreas de

ecossistemas australianos onde há predominância de  $\text{NH}_4^+$  no solo, como em florestas de eucaliptos, mostraram preferência pela utilização desta forma de N (SCHMIDT & STEWART, 1998). Já algumas espécies de *Ficus*, por exemplo, apresentam alta capacidade de utilização de  $\text{NO}_3^-$ , o que está associado à distribuição destas espécies em solos com elevadas taxas de nitrificação, com alta disponibilidade deste ânion no solo (SCHMIDT *et al.*, 1998). Além disso, um estudo com mudas de árvores de ambientes com clima temperado mostrou que as espécies de início de sucessão apresentavam maior sensibilidade à toxicidade de  $\text{NH}_4^+$  quando comparadas com *Picea glauca*, uma conífera encontrada em solos ricos em  $\text{NH}_4^+$  de estádios de sucessão tardia (KRONZUCKER *et al.*, 2003).

As espécies arbóreas apresentam diferentes estratégias para adquirir e transportar o N disponível no ambiente, tornando possível organizá-las em tipos funcionais relacionados ao uso desse elemento (SCHMIDT & STEWART, 1998). Segundo Tabarelli *et al.* (1999), estes grupos funcionais (ou guildas), são referentes à fase de regeneração de uma determinada área, uma vez que as espécies arbóreas predominantes em cada fase sucessional apresentam características ecofisiológicas distintas. Whitmore (1990) reconheceu em uma floresta tropical três fases de regeneração: clareira, regeneração e madura. Quanto as espécies arbóreas tropicais, Swaine e Whitmore (1988) classificaram as espécies em dois grupos qualitativamente distintos, as espécies pioneiras e clímax ou não-pioneiras.

Aidar *et al.* (2003) propuseram um modelo de classificação das espécies arbóreas utilizando as características ecofisiológicas da planta baseado no uso de N. Estes autores puderam observar a relação do uso diferenciado de N com a classificação das espécies em grupos funcionais da sucessão (pioneiras e não-pioneiras). Segundo este modelo, a preferência de utilização de  $\text{NO}_3^-$  como fonte de N pode decrescer a partir de espécies pioneiras até as espécies das fases mais avançadas da sucessão ecológica. De acordo com esse modelo, espécies pioneiras apresentam atividade relativamente alta da enzima NR nas folhas e elevada quantidade de  $\text{NO}_3^-$  na seiva do xilema, enquanto as espécies não-pioneiras apresentam uma menor assimilação de N nas folhas, caracterizada pela baixa atividade da NR foliar, e os aminoácidos são as principais formas de translocação de N pela seiva do xilema (AIDAR *et al.*, 2003).

As espécies arbóreas pioneiras são caracterizadas como intolerantes à sombra, com dependência de maior quantidade de luz para a germinação e desenvolvimento (GANDOLFI, 2000). Estas espécies compõem áreas de clareiras e bordas de floresta, apresentam crescimento rápido e dependem de altos níveis de N (STEWART *et al.*, 1988; AIDAR *et al.*, 2003). A alta disponibilidade de luz nesses ambientes torna vantajosa as

assimilação do N a partir da redução do  $\text{NO}_3^-$  nas folhas, pois o ATP e o poder redutor para a assimilação provém, principalmente, da cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese (SMIRNOFF & STEWART, 1985). Espécies arbóreas não-pioneiras são menos dependentes da luz para a germinação e o desenvolvimento, podendo se desenvolver em ambientes com alto sombreamento (GANDOLFI, 2000). Diferentemente das pioneiras, nos ambientes sombreados onde predominam as espécies não-pioneiras, seria desvantajosa a assimilação foliar de N, favorecendo então a assimilação de  $\text{NH}_4^+$  pelas raízes (AIDAR *et al.*, 2003), dispendendo menor gasto energético.

Estudos posteriores, com a mesma abordagem do estudo inicial de Aidar *et al.* (2003), confirmaram o modelo das estratégias de uso do N ao longo da sucessão em outras regiões da Mata Atlântica com diferentes características edáficas e de altitude (PEREIRA-SILVA, 2008; CAMPOS, 2009; SILVA, 2012). É importante ressaltar que estes experimentos foram realizados com plantas adultas em seu ambiente natural, nos quais analisaram somente a seiva do xilema e as folhas destas plantas. As análises do metabolismo do N nas raízes seriam importantes, mas não puderam ser realizadas nestes experimentos por inviabilidade técnica (AIDAR *et al.*, 2003; PEREIRA-SILVA, 2008; CAMPOS, 2009; SILVA, 2012). Experimentos com plantas jovens (mudas) sob condições controladas são de grande relevância, pois possibilitam analisar o metabolismo do N, nas raízes e nas folhas e relacioná-lo com aspectos do crescimento e da fisiologia vegetal.

Um estudo que reforça a necessidade de se conhecer as relações de N das mudas foi desenvolvido por Kronzucker *et al.* (1997). Estes autores demonstraram que plântulas da conífera *Picea glauca* apresentaram preferência pela absorção e assimilação de  $\text{NH}_4^+$  em relação ao uso de  $\text{NO}_3^-$ . Deste modo, o estabelecimento das mudas dessa espécie para fins de restauração em áreas degradadas com predominância de  $\text{NO}_3^-$  no solo não é indicado, pois é provável que estas plantas apresentem alta mortalidade, enquanto a utilização de mudas de espécies mais bem adaptadas ao uso do  $\text{NO}_3^-$  poderia resultar em reflorestamentos mais bem sucedidos (KRONZUCKER *et al.*, 1997).

A identificação das estratégias de uso do N por mudas de espécies arbóreas é de grande importância econômica e ecológica, já que os critérios de escolha das espécies e as práticas de manejo se basearão nas características nutricionais do solo e da forma de N predominante, a fim de maximizar o sucesso de projetos de restauração da biodiversidade vegetal em áreas degradadas. Além disso, torna-se possível classificar as espécies de plantas em grupos funcionais relacionando as características ecofisiológicas baseadas no uso de N e nas estratégias de regeneração.

## 1.2 Restauração de habitats ocupados por braquiária

Um dos principais desafios a ser vencido no processo de restauração de ambientes degradados consiste no baixo sucesso destes programas em áreas ocupadas por espécies do gênero *Brachiaria* (TOLEDO *et al.*, 1999; TOLEDO *et al.*, 2000; COSTA *et al.*, 2002). Essas gramíneas exóticas, como *Brachiaria decumbens* Stapf (Poaceae) [*Urochloa decumbens* (Stapf) R.D.Webster é um sinônimo desta espécie, segundo o banco de dados The Plant List: [www.theplantlist.org](http://www.theplantlist.org)], o capim-braquiarião, comumente invadem áreas de pastagens abandonadas e limitam o crescimento de espécies arbóreas nativas devido à sua elevada agressividade, intensa capacidade de produção e longevidade de sementes (COSTA *et al.*, 2002). Além dessas características, a alta competitividade e persistência apresentada pela maioria das espécies invasoras também envolve a indução de alterações no ciclo do N (EHRENFELD, 2003; CORBIN & D'ANTONIO, 2004).

A principal forma de interferência destas gramíneas invasoras sobre as espécies florestais é a competição por recursos essenciais para o crescimento e desenvolvimento das árvores, como nutrientes, água, luz, oxigênio e gás carbônico, além da competição por espaço físico no solo (DONALD 1963; PITELI *et al.*, 1988). Outro fator responsável pela dominância das plantas invasoras, assim como a competição por recursos, é a alelopatia (FERREIRA *et al.*, 2008).

A alelopatia pode ser definida como a interação bioquímica entre vegetais e microorganismos, a qual pode ser estimulante ou inibidora, através da liberação de compostos químicos no ambiente (RICE, 1984, 1995; BAIS *et al.*, 2003). As substâncias químicas vegetais que atuam nessa interação, conhecidas como aleloquímicos, são provenientes principalmente do metabolismo secundário, podendo também ter origem no metabolismo primário (FERREIRA & AQUILA, 2000). Os aleloquímicos podem pertencer a diversos grupos químicos como terpenóides, esteróides, alcalóides, taninos, fenóis e flavonoides. São encontrados e distribuídos em concentrações variadas nos diferentes órgãos da planta e durante o seu ciclo de vida. Os aleloquímicos são produzidos pelas plantas para a autodefesa contra herbívoros e plantas vizinhas, podendo ser liberados para o ambiente através da volatilização, lixiviação, exsudação e decomposição dos resíduos vegetais (JOHN & SARADA, 2012). Depois de serem liberados no ambiente, os aleloquímicos podem causar efeitos indiretos, como alterações nas propriedades nutricionais do solo e na população e/ou atividade de microorganismos, e efeitos diretos nas plantas (JOHN & SARADA, 2012).

Os efeitos diretos compreendem as alterações na germinação, no crescimento e no metabolismo vegetal (RIZVI *et al.*, 1992), como modificações no

funcionamento de membranas, na absorção de nutrientes e nas relações hídricas, além de alterações nos níveis de fitormônios, na fotossíntese e na respiração (RICE, 1984; RIZVI *et al.*, 1992). A alelopatia é um fenômeno que pode influenciar a sucessão secundária, a estrutura de comunidades vegetais, assim como a dominância de algumas espécies vegetais, o que pode afetar a biodiversidade local (CHOU *et al.*, 1986; RIZVI *et al.*, 1992; REIGOSA *et al.*, 1999).

Alguns estudos relataram a atividade alelopática de *B. decumbens* sobre várias espécies, como o comprometimento do crescimento de plantas cultivadas em solo com histórico de ocupação por essa gramínea (SOUZA *et al.*, 2006), além do efeito inibitório sobre plântulas submetidas ao extrato metanólico de folhas de *B. decumbens* (KOBAYASHI & KATO-NOGUCHI, 2015). Estes estudos sugerem que esta espécie invasora possui substâncias com atividade alelopática direta. O aleloquímico isolado das folhas de *B. decumbens* e identificado por espectrometria de massa, o (6R,9S)-3-oxo- $\alpha$ -ionol, foi apontado como contribuinte para a alelopatia direta causada pelo extrato de folhas (KOBAYASHI & KATO-NOGUCHI, 2015). No entanto, não há registros do isolamento e da identificação de aleloquímicos com efeito direto proveniente do exsudato das raízes de *B. decumbens*, o que torna evidente a necessidade de estudos relacionado às raízes.

Já foi demonstrado, em trabalho de campo e em casa de vegetação, que *B. humidicola* é capaz de exsudar substâncias alelopáticas pelas raízes, as quais inibem a nitrificação biológica do solo (SUBBARAO *et al.*, 2007), tendo ação indireta sobre as demais plantas. O composto mais abundantemente exsudado por *Brachiaria* spp., denominado brachialactona, caracterizado quimicamente como um diterpeno cíclico, apresenta capacidade de inibir as vias da mono-oxigenase e da hidroxilamina oxidorreductase em *Nitrosomonas* spp (SUBBARAO *et al.*, 2009), envolvidas na oxidação do amônio. A consequente diminuição da nitrificação biológica, causada pela liberação da brachialactona, resulta na queda dos níveis de  $\text{NO}_3^-$  no solo, acompanhada de um aumento no conteúdo de  $\text{NH}_4^+$  (SUBBARAO *et al.*, 2007; SUBBARAO *et al.*, 2009).

Em um estudo realizado nas savanas australianas por Rossiter-Rachor *et al.* (2009), foi observado que outra gramínea de origem africana, *Andropogon gayanus*, inibiu a nitrificação e provocou deficiência de  $\text{NO}_3^-$  no solo. Isto prejudicou o crescimento de gramíneas nativas, que são adaptadas ao uso de  $\text{NO}_3^-$ , enquanto a gramínea invasora, *A. gayanus*, foi favorecida por ter grande capacidade de utilização de  $\text{NH}_4^+$  (ROSSITER-RACHOR *et al.*, 2009). Variações na característica do solo, como o acúmulo de  $\text{NH}_4^+$ , decorrente da invasão por *Brachiaria* no ambiente (SUBBARAO *et al.*, 2009), assim como

por *A. gayanus* (ROSSITER-RACHOR *et al.*, 2009), poderiam refletir numa mudança no padrão da sucessão ecológica e no crescimento de espécies arbóreas com diferentes estratégias de uso do N.

Áreas florestais degradadas ou áreas de cultivo agrícola abandonadas, apresentam um predomínio de  $\text{NO}_3^-$  no solo (BRADLEY, 2001), diferente das pastagens invadidas por *Brachiaria* que acumulam  $\text{NH}_4^+$  (SUBBARAO *et al.*, 2009), característica típica de estágios sucessionais mais tardios (KRONZUCKER *et al.*, 2003). Os resultados destes estudos sugerem que o desempenho de espécies com maior capacidade de utilização de  $\text{NH}_4^+$  seria menos afetado, diferente daquelas adaptadas ao uso de  $\text{NO}_3^-$ , as quais seriam fortemente prejudicadas pela braquiária.

Um estudo em casa de vegetação relatou que mudas de espécies pioneiras apresentaram maior comprometimento de seu desenvolvimento quando cultivadas juntamente com *Brachiaria brizantha*, em comparação com as mudas de espécies não-pioneiras (ZANGARO *et al.*, 2016). Esse maior comprometimento do desenvolvimento das espécies pioneiras foi relacionado à menor capacidade de competição por recursos na presença da braquiária, devido ao menor diâmetro das raízes apresentado por estas espécies (RONDINA *et al.*, 2014). Já para as espécies de fim de sucessão, a alta densidade e o maior diâmetro da raiz garantem uma menor sensibilidade ao cultivo simultâneo com gramíneas exóticas (ZANGARO *et al.*, 2016). Estudos que testem a menor sensibilidade das espécies não-pioneiras à atividade alelopática por gramíneas não foram registradas.

Novos estudos são essenciais para verificar quais efeitos as alterações nas relações de N do solo induzidas por *Brachiaria* teriam sobre as características do metabolismo, da fisiologia e do crescimento de mudas de espécies arbóreas pioneiras e não-pioneiras. Um melhor entendimento desses mecanismos será crucial para prover a base para o desenvolvimento de práticas de manejo de ecossistemas invadidos por *Brachiaria* e aumentar o sucesso de programas de reflorestamento nessas áreas.

## **2. OBJETIVOS GERAIS**

A partir do exposto torna-se evidente que a caracterização ecofisiológica das mudas de espécies arbóreas, a partir de análises de crescimento, da fisiologia e do uso de N, assim como a caracterização dos efeitos causados por gramíneas nessas mudas, são de grande importância em atividades de restauração, e essenciais para a escolha adequada de espécies para plantios em diferentes locais.

Levando isso em consideração, o objetivo deste trabalho foi caracterizar as estratégias de uso de N de mudas de espécies arbóreas nativas, uma pioneira [*Cecropia pachystachya* Trécul (Urticaceae)] e uma não-pioneira [*Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae)], cultivadas em areia com adição controlada de N inorgânico. Além disso, pretendeu-se demonstrar os efeitos causados pela interação com *B. decumbens* nessas espécies nativas, em cultivo simultâneo e com adição de exsudatos de raízes produzidos por essa gramínea. Deste modo, pretendeu-se atender os seguintes objetivos específicos:

- Determinar as fontes inorgânicas de N ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ou  $\text{NH}_4^+$ ) mais benéficas para cada espécie arbórea nativa, a partir de análises fisiológicas e de crescimento;
- Relacionar as estratégias de uso de N dessas mudas com as classes sucessionais dessas espécies arbóreas, através da determinação da atividade da enzima NR, análise da seiva do xilema e dosagem dos metabólitos primários;
- Verificar o efeito causado pela interação com *B. decumbens* sobre o metabolismo, a fisiologia e o crescimento dessas mudas arbóreas;
- Confirmar o efeito causado por *B. decumbens* na nitrificação do solo de cultivo dessas mudas, através da determinação da taxa de nitrificação biológica líquida do solo.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIDAR, M. P. M.; SCHMIDT, S.; MOSS, G.; STEWART, G. R.; JOLY, C. A. (2003). Nitrogen use strategies of Neotropical rainforest trees in threatened Atlantic Forest. **Plant Cell and Environment**, 26(3), 389-399.
- ASHTON, I. W.; MILLER, A. E.; BOWMAN, W. D.; SUDING, K. N. (2008). Nitrogen preferences and plant-soil feedbacks as influenced by neighbors in the alpine tundra. **Oecologia**, 156(3), 625-636.
- BAIS, H. P.; VEPACHEDU, R.; GILROY, S.; CALLAWAY, R. M.; VIVANCO, J. M. (2003). Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. **Science**, 301(5638), 1377-1380.
- BARRETO, A. C.; LIMA, F. H. S.; FREIRE, M. B. G. S.; ARAÚJO, Q. R.; FREIRE, F. J. (2006). Características químicas e físicas de um solo sob floresta, sistema agroflorestal e pastagem no sul da Bahia. **Revista Caatinga**, 19(4), 415-425.

BLOOM, A. J. (1997). Nitrogen as a limiting factor: Crop acquisition of ammonium and nitrate. In: JACKSON, L.E. (ed). **Ecology in Agriculture**. San Diego, Academic Press, 145-172.

BRADLEY, R. L. (2001). An alternative explanation for the post-disturbance  $\text{NO}_3^-$  flush in some forest ecosystems. **Ecology Letters**, 4(5), 412-416.

BRITTO, D. T. & KRONZUCKER, H. J. (2002).  $\text{NH}_4^+$  toxicity in higher plants: a critical review. **Journal of Plant Physiology**, 159(6), 567-584.

BRITTO, D. T. & KRONZUCKER, H. J. (2013). Ecological significance and complexity of N-source preference in plants. **Annals of botany**, 112(6), 957-963.

CAMPOS, M. M. S. (2009). **Ecofisiologia de uso do N em espécies arbóreas da Floresta Ombrófila Densa das Terras Baixas, Ubatuba, SP**. Tese de doutorado, Instituto de Botânica, São Paulo.

CHOU, C. H.; PUTNAM, A. L.; TANG, C. S. (1986). The role of allelopathy in subtropical agroecosystems in Taiwan. **The science of allelopathy**, 57-73.

CORBIN, J. D. & D'ANTONIO, C. M. (2004). Effects of exotic species on soil nitrogen cycling: implications for restoration 1. **Weed Technology**, 18(sp1), 1464-1467.

COSTA, E. A. D. D.; MATALLO, M. B.; CARVALHO, J. C.; ROZANSK, A. (2002). Eficácia de nova formulação do herbicida oxyfluorfen no controle de plantas daninhas em área de *Pinus caribea* Morelet var. *hondurensis* Barr. et Golf. **Revista Árvore**, 26(6), 683-89.

CUNHA, A. O.; ANDRADE, L. D.; BRUNO, R. D. L. A.; SILVA, J. D.; SOUZA, V. D. (2005). Efeitos de substratos e das dimensões dos recipientes na qualidade das mudas de *Tabebuia impetiginosa* (Mart. Ex DC) Standl. **Revista Árvore**, 29(4), 507-516.

DECHORGNAT, J.; NGUYEN, C. T.; 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. **Journal of Experimental Botany**, 62(4), 1349-1359.

- DONALD, C. M. (1963). Competition among crop and pasture plants. **Advances in agronomy**, 15, 1-118.
- EHRENFELD, J. G. (2003). Effects of exotic plant invasions on soil nutrient cycling processes. **Ecosystems**, 6(6), 503-523.
- FERNANDES, L. A.; FURTINI NETO, A. E.; FONSECA, F. C.; VALE, F. D. (2000). Crescimento inicial, níveis críticos de fósforo e frações fosfatadas em espécies florestais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 35(6), 1191-1198.
- FERREIRA, A. G. & AQUILA, M. E. (2000). Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 12(1), 175-204.
- FERREIRA, N. R.; MEDEIROS, R. D.; SOARES, G. L. G. (2008). Potencial alelopático do capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) na germinação de sementes de gramíneas perenes estivais. **Revista Brasileira de Sementes**, 30(2), 43-53.
- FOYER, C. H.; FERRARIO-MERY, S.; NOCTOR, G. (2001). Interactions between carbon and nitrogen metabolism. **Plant Nitrogen**, 237-254. Springer Berlin Heidelberg
- FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA & INPE. (2011). **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica - Período 2008-2010**. São Paulo, Fundação SOS Mata Atlântica/Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais.
- GANDOLFI, S. (2000). História natural de uma floresta estacional semidecidual no município de Campinas (São Paulo, Brasil).
- 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 Biology**, 9(01), 21-29.
- HARRISON, K. A.; BOL, R.; BARDGETT, R. D. (2007). Preferences for different nitrogen forms by coexisting plant species and soil microbes. **Ecology**, 88(4), 989-999.

- HIREL, B. & LEA, P. J. (2001). Ammonia assimilation. **Plant Nitrogen**, 79-99. Springer Berlin Heidelberg,
- JOHN, J. & SARADA, S. (2012). Role of phenolics in allelopathic interactions. **Allelopathy Journal**, 29(2), 215-229.
- KELLER, L.; LELES, P. S. D. S.; OLIVEIRA NETO, S. N.; COUTINHO, R. P.; NASCIMENTO, D. F. (2009). Sistema de blocos prensados para produção de mudas de três espécies arbóreas nativas. **Revista Árvore**, 33(2), 305-314.
- KOBAYASHI, A. & KATO-NOGUCHI, H. (2015). Phytotoxic substance with allelopathic activity in *Brachiaria decumbens*. **Natural product communications**, 10(5), 761-763.
- KRAISER, T.; GRAS, D. E.; GUTIÉRREZ, A. G.; GONZÁLEZ, B.; GUTIÉRREZ, R. A. (2011). A holistic view of nitrogen acquisition in plants. **Journal of Experimental Botany**, 62(4), 1455-1466.
- KRONZUCKER, H. J.; SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D. (1997). Conifer root discrimination against soil nitrate and the ecology of forest succession. **Nature**, 385(6611), 59-61.
- KRONZUCKER, H. J.; SIDDIQI, M. Y., GLASS, A. D. M.; BRITTO, D. T. (2003). Root ammonium transport efficiency as a determinant in forest colonization patterns: an hypothesis. **Physiol. Plantarum**, 117(2), 164-170.
- KUSANO, M.; FUKUSHIMA, A.; REDESTIG, H.; SAITO, K. (2011). Metabolomic approaches toward understanding nitrogen metabolism in plants. **Journal of Experimental Botany**, 62(4), 1439-1453.
- LEA, P. J. & AZEVEDO, R. A. (2007). Nitrogen use efficiency. 2. Amino acid metabolism. **Annals of Applied Biology**, 151(3), 269-275.
- OAKS, A. & HIREL, B. (1985). Nitrogen metabolism in roots. **Annual Review of Plant Physiology**, 36(1), 345-365.

PEREIRA-SILVA, E. F. L. (2008). **Estratégias ecofisiológicas no uso de nitrogênio em espécies arbóreas de floresta ombrófila densa submontana e estacional semidecidual, SP.** Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

PITELLI, R.; RODRIGUES, J.; KARAM, D.; COELHO, J.; ZANUNCIO, I.; ZANUNCIO, C. (1988). Efeitos de períodos de convivência e do controle de plantas daninhas na cultura de Eucalyptus. **Seminário técnico sobre plantas daninhas e o uso de herbicidas em reflorestamento, 1**, 110-123.

REIGOSA, M. J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.; GONZÁLEZ, L. (1999). Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Science, 18**(5), 577-608.

RICE, E.L. (1984). **Allelopathy.** 2nd ed., New York, Academic Press.

RICE, E. L. (1995). **Biological Control of Weeds and Plant Diseases: Advances in Applied Allelopathy.** University of Oklahoma Press.

RIZVI, S. J. H.; HAQUE, H.; SINGH, U. K.; RIZVI, V. (1992). A discipline called allelopathy. **Allelopathy**, 1-10. Springer Netherlands.

RONDINA, A. B. L.; LESCANO, L. E. A. M.; ALVES, R. A.; MATSUURA, E. M., NOGUEIRA, M. A.; ZANGARO, W. (2014). Arbuscular mycorrhizas increase survival, precocity and flowering of herbaceous and shrubby species of early stages of tropical succession in pot cultivation. **Journal of Tropical Ecology, 30**(06), 599–614.

ROSSITER-RACHOR, N. A.; SETTERFIELD, S. A.; DOUGLAS, M. M.; HUTLEY, L. B.; COOK, G. D.; SCHMIDT, S. (2009). Invasive *Andropogon gayanus* (gamba grass) is an ecosystem transformer of nitrogen relations in Australian savanna. **Ecological Applications, 19**(6), 1546-1560.

SCHMIDT, S. & STEWART, G. R. (1998). Transport, storage and mobilization of nitrogen by trees and shrubs in the wet/dry tropics of northern Australia. **Tree Physiology, 18**(6), 403-410.

SCHMIDT, S.; STEWART, G. R.; TURNBULL, M. H.; ERSKINE, P. D.; ASHWATH, N. (1998). Nitrogen relations of natural and disturbed communities in tropical Australia. **Oecologia**, 117(1-2), 95-104.

SIDDIQUE, I.; VIEIRA, I. C.; SCHMIDT, S.; LAMB, D.; CARVALHO, C. J. R.; FIGUEIREDO, R. D. O.; BLOMBERG, S.; DAVIDSON, E. A. (2010). Nitrogen and phosphorus additions negatively affect tree species diversity in tropical forest regrowth trajectories. **Ecology**, 91(7), 2121-2131.

SILVA, J. G. (2012). **Ecofisiologia do uso de nitrogênio em espécies arbóreas da Floresta Ombrófila Densa, Caraguatatuba, SP**. Dissertação (Mestrado em botânica) - Instituto de Botânica/SMA, São Paulo.

SMIRNOFF, N. & STEWART, G. R. (1985). Nitrate assimilation and translocation by higher plants: comparative physiology and ecological consequences. **Physiologia Plantarum**, 64(2), 133-140.

SOBRINHO, S. P.; DA LUZ, P. B.; SILVEIRA, T. L.; RAMOS, D. T.; NEVES, L. G.; BARELLI, M. A. (2010). Substratos na produção de mudas de três espécies arbóreas do cerrado. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, 5(2), 238-243.

SOUZA, L. S.; VELINI, E. D.; MARTINS, D.; ROSOLEM, C. A. (2006). Allelopathic effects of *Brachiaria decumbens* on the initial development of seven crops. **Planta Daninha**, 24(4), 657-668.

STEWART, G. R.; HEGARTY, E. E.; SPECHT, R. L. (1988). Inorganic nitrogen assimilation in plants of Australian rainforest communities. **Physiologia Plantarum**, 74(1), 26-33.

SUBBARAO, G. V.; RONDON, M.; ITO, O.; ISHIKAWA, T.; RAO, I. M.; NAKAHARA, K.; BERRY, W. L. (2007). Biological nitrification inhibition (BNI) – is it a widespread phenomenon? **Plant and Soil**, 294(1-2), 5-18.

SUBBARAO, G. V.; NAKAHARA, K.; HURTADO, M. D. P.; ONO, H.; MORETA, D. E.; SALCEDO, A. F.; YOSHIDA, M. (2009). Evidence for biological nitrification inhibition in

*Brachiaria* pastures. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 106(41), 17302-17307.

SWAINE, M. D. & WHITMORE, T. C. (1988). On the definition of ecological species groups in tropical rain forests. **Plant Ecology**, 75(1), 81-86.

TABARELLI, M.; MANTOVANI, W.; PERES, C. A. (1999). Effects of habitat fragmentation on plant guild structure in the montane Atlantic forest of southeastern Brazil. **Biological Conservation**, 91(2), 119-127.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. (2013). **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed. p. 918.

TOLEDO, R. E. B.; ALVES, P. L. C. A.; VALLE, C. F.; ALVARENGA, S. F. (1999). Manejo de *Brachiaria decumbens* e seu reflexo no desenvolvimento de *Eucalyptus grandis*. **Scientia Forestalis**, 129-141.

TOLEDO, R. E. B.; VICTÓRIA-FILHO, R.; ALVES, P. L. C. A.; PITELLI, R. A.; CADINI, M. T. D. (2000). Efeitos da faixa de controle do capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) no desenvolvimento inicial de plantas de eucalipto. **Planta Daninha**, 383-393.

WANG, L. & MACKO, S. A. (2011). Constrained preferences in nitrogen uptake across plant species and environments. **Plant, Cell and Environment**, 34(3), 525-534.

WHITMORE, T.C. (1990). **An introduction to the tropical rain forests**. Clarendon. Press.

ZANGARO, W.; LESCANO, L. E. A. M.; MATSUURA, E. M.; RONDINA, A. B. L.; NOGUEIRA, M. A. (2016). Differences between root traits of early-and late-successional trees influence below-ground competition and seedling establishment. **Journal of Tropical Ecology**, 32, 300-313.

## **CAPÍTULO 1**

**Avaliação ecofisiológica de mudas de *Cecropia pachystachya* Trécul (pioneira) e *Eugenia brasiliensis* Lam. (não-pioneira) cultivadas com diferentes fontes inorgânicas de nitrogênio**

Ligia Maria Inocência da Silva<sup>1</sup>, Halley Caixeta de Oliveira<sup>2</sup> e Renata Stolf Moreira<sup>2</sup>

**Revista a ser submetida**

**Plant Physiology**

**Avaliação ecofisiológica de mudas de *Cecropia pachystachya* Trécul (pioneira) e *Eugenia brasiliensis* Lam. (não-pioneira) cultivadas com diferentes fontes inorgânicas de nitrogênio**

**Resumo**

Apesar da importância do nitrogênio (N) para a restauração de ambientes degradados, poucos estudos analisaram as estratégias desenvolvidas por mudas de espécies arbóreas neotropicais para absorver, assimilar e translocar este nutriente. Este estudo teve como objetivo caracterizar as estratégias de uso de N de mudas de duas espécies pertencentes a diferentes grupos funcionais utilizadas em reflorestamentos da Mata Atlântica: *Cecropia pachystachya* Trécul (pioneira) e *Eugenia brasiliensis* Lam. (não-pioneira). Os efeitos do cultivo com diferentes fontes de N ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{NH}_4^+$ ) na fisiologia, crescimento e metabolismo do N foram avaliados nas mudas destas espécies. As mudas de *C. pachystachya* cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  apresentaram maior atividade da enzima Nitrato Redutase (NR) nas folhas quando comparadas com suas raízes. Diferentemente, *E. brasiliensis* apresentou menor atividade da enzima NR foliar, o que indica que esta espécie assimila  $\text{NH}_4^+$  principalmente nas raízes. Apesar disso, as mudas desta espécie também foram capazes de usar  $\text{NO}_3^-$  como fonte de N, assim como *C. pachystachya* foi capaz de utilizar  $\text{NH}_4^+$ . As análises fisiológicas e de crescimento demonstraram alta tolerância de *E. brasiliensis* ao  $\text{NH}_4^+$ , diferente de *C. pachystachya*, que apresentou sensibilidade a este cátion. A forma nitrogenada predominantemente translocada pela seiva do xilema nas mudas de *C. pachystachya* foi  $\text{NO}_3^-$ , sendo alterada somente nas mudas cultivadas com  $\text{NH}_4^+$ , que translocaram principalmente aminoácidos. Já para *E. brasiliensis*, aminoácidos foram translocados em altas proporções pela seiva do xilema, independentemente da forma de N utilizada. Estes resultados estão de acordo com o modelo de uso de N proposto por Aidar (2003), o que indica que o modelo pode ser extrapolado para mudas de espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica. Os resultados deste estudo permitem inferir que as mudas da espécie pioneira teriam maior sucesso em solos com predominância de  $\text{NO}_3^-$ , diferente da espécie não-pioneira, que se desenvolveria melhor em solos contendo predominantemente  $\text{NH}_4^+$ , característico de locais em estágio avançado da sucessão florestal.

**Palavras-chave:** nitrato; amônio; nitrato redutase; metabolismo do nitrogênio; reflorestamento.

**Echophysiological evaluation of seedlings of *Cecropia pachystachya* Trécul (pioneer) and *Eugenia brasiliensis* Lam. (non-pioneer) cultivated with different inorganic nitrogen sources**

**Abstract**

Despite the importance of nitrogen (N) for the restoration of degraded lands, few studies have analyzed the strategies developed by seedlings of neotropical tree species to absorb, assimilate and translocate this nutrient. The objective of this study was to characterize the strategies of N metabolism in two species belonging to different functional groups used in Atlantic Forest reforestation: *Cecropia pachystachya* Trécul (pioneer) and *Eugenia brasiliensis* Lam. (non-pioneer). The effects of cultivation using different N sources ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  and  $\text{NH}_4^+$ ) on the physiology, growth and N metabolism, were evaluated in the seedlings of these species. The seedlings of *C. pachystachya* cultivated under  $\text{NO}_3^-$  showed higher Nitrate Reductase enzyme (NR) activity in leaves when compared to the roots. Differently, *E. brasiliensis* presented low NR activity in leaves, indicating that this species mainly assimilates  $\text{NH}_4^+$  in the roots. In addition, the seedlings of this species were also able to use  $\text{NO}_3^-$  as N source, while *C. pachystachya* was able to use  $\text{NH}_4^+$ . The physiological and growth analyzes showed high tolerance of *E. brasiliensis* to  $\text{NH}_4^+$ , different from *C. pachystachya*, which showed sensitivity to this cation. The nitrogen form predominantly translocated through the xylem sap in *C. pachystachya* seedlings was  $\text{NO}_3^-$ , being altered only in the seedlings cultivated under  $\text{NH}_4^+$ , which carried mainly amino acids. For *E. brasiliensis*, amino acids were translocated in high proportions by xylem sap, regardless of the N form used. These results are in agreement with the model of N use proposed by Aidar (2003), which indicates that it can be extrapolated to seedlings of Atlantic Forest native trees. The results of this study allow us to infer that seedlings of the pioneer species would be more successfully established in soils with a predominance of  $\text{NO}_3^-$ , different from the non-pioneer species, which would be better developed in soils containing  $\text{NH}_4^+$  predominantly, characteristics of advanced stages of forest succession.

**Keywords:** nitrate; ammonium; nitrate reductase; nitrogen metabolism; reforestation.

## Introdução

A necessidade de recomposição de ecossistemas florestais degradados tem levado à maior demanda por mudas de espécies arbóreas neotropicais e ao crescente interesse em pesquisas com essas espécies (KELLER *et al.*, 2009). Apesar da relevância do Nitrogênio (N) para o estabelecimento de mudas utilizadas na restauração de ambientes degradados, poucos estudos abordam as estratégias de uso deste nutriente por mudas de espécies arbóreas nativas.

O N é o nutriente absorvido na forma iônica pelas raízes que compõe os tecidos vegetais em maiores quantidades (KUSANO *et al.*, 2011), reconhecido como determinante na distribuição e performance das espécies de plantas em ecossistemas naturais (WANG & MACKO, 2011; BRITTO & KRONZUCKER, 2013; DIAS *et al.*, 2014). Processos como a fotossíntese, o crescimento e o desenvolvimento vegetal são profundamente influenciados pelo conteúdo de N de uma planta (FOYER *et al.*, 2001; GUO *et al.*, 2007a; KUSANO *et al.*, 2011), já que este elemento participa da composição de biomoléculas essenciais como proteínas, ácidos nucléicos e clorofilas (KRAISER *et al.*, 2011; KUSANO *et al.*, 2011).

Nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) são as principais formas de N inorgânico presentes no substrato utilizadas pelas plantas (MILLER & CRAMER, 2004; HARRISON *et al.*, 2007; ASHTON *et al.*, 2008). Após ser absorvido pelas células da raiz, o  $\text{NO}_3^-$  é reduzido a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) pela enzima nitrato redutase (NR), e em seguida o  $\text{NO}_2^-$  é reduzido a  $\text{NH}_4^+$  pela enzima nitrito redutase (NiR). O  $\text{NH}_4^+$  recém-formado, assim como aquele diretamente absorvido pelas raízes, é assimilado como glutamina ou glutamato por meio da ação sequencial das enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamina-2-oxoglutarato aminotransferase (GOGAT) (KRAPP, 2015). A célula vegetal dispense alta quantidade de energia para absorver e assimilar o N inorgânico, e este custo é mais elevado quando o  $\text{NO}_3^-$  é utilizado, 12 ATPs, em comparação à utilização direta de  $\text{NH}_4^+$  que necessita de 2 ATPs (BLOOM, 1997; BRITTO & KRONZUCKER, 2002), além do uso de NAD(P)H e ferredoxina reduzida necessários nas reações catalisadas pelas enzimas NR e NiR (OAKS & HIREL, 1985). Apesar disso, a absorção e assimilação de  $\text{NO}_3^-$  é mais favorável, pois este ânion pode ser estocado e translocado pela seiva do xilema em altas concentrações (DECHORGNAT *et al.*, 2011). Diferentemente, o  $\text{NH}_4^+$  pode levar a efeitos tóxicos quando acumulado, comumente associados ao desequilíbrio iônico e metabólico (BRITTO & KRONZUCKER, 2002),

devendo ser rapidamente assimilado na raiz após sua absorção ou formação na raiz ou na folha (BLOOM, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2013; SALASKETA *et al.*, 2016).

A preferência por determinada fonte de N pode diferir entre as espécies de plantas ou grupos funcionais, o que pode representar uma importante resposta adaptativa ao ambiente em que vivem (BRITTO & KRONZUCKER, 2013). Várias espécies arbóreas de ecossistemas australianos, onde há predominância de  $\text{NH}_4^+$  no solo, apresentam preferência pela utilização desta forma de N (SCHMIDT & STEWART, 1998). Já algumas espécies de *Ficus*, por exemplo, apresentam alta capacidade de utilização de  $\text{NO}_3^-$ , o que está associado com sua distribuição em solos com elevadas taxas de nitrificação onde a disponibilidade deste ânion no solo é alta (SCHMIDT *et al.*, 1998). Além disso, um estudo com mudas de árvores de ambiente de clima temperado mostrou que as espécies de início de sucessão apresentavam maior sensibilidade à toxicidade de  $\text{NH}_4^+$  quando comparadas com *Picea glauca*, uma conífera encontrada em solos ricos em  $\text{NH}_4^+$  de estádios de sucessão tardia (KRONZUCKER *et al.*, 2003).

As espécies arbóreas utilizam diferentes estratégias para adquirir e transportar o N disponível no ambiente, tornando possível organizá-las em tipos funcionais relacionados ao uso desse elemento (SCHMIDT & STEWART, 1998). Segundo Aidar *et al.* (2003), a preferência de utilização de  $\text{NO}_3^-$  como fonte de N pode decrescer a partir de espécies pioneiras até as espécies das fases mais avançadas da sucessão ecológica. De acordo com esse modelo, espécies pioneiras apresentam atividade relativamente alta da enzima NR nas folhas e elevada quantidade de  $\text{NO}_3^-$  na seiva do xilema, enquanto em espécies não-pioneiras esses níveis de atividade enzimática e translocação de  $\text{NO}_3^-$  são menores. A alta disponibilidade de luz nas clareiras e bordas de florestas, onde as espécies pioneiras habitam (STEWART *et al.*, 1988; AIDAR *et al.*, 2003), é vantajosa para assimilação do  $\text{NO}_3^-$  nas folhas, pois a energia para a assimilação provém, principalmente, da cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese (SMIRNOFF & STEWART, 1985). Diferentemente, nos ambientes sombreados onde predominam as não-pioneiras, seria desvantajosa a assimilação foliar de N, favorecendo então a assimilação de  $\text{NH}_4^+$  pelas raízes (AIDAR *et al.*, 2003), dispendendo menor gasto energético.

Pereira-Silva, (2008), Campos (2009) e Silva (2012) confirmaram o modelo das estratégias de uso do N ao longo da sucessão, em estudos com a mesma abordagem do estudo inicial de Aidar *et al.* (2003). Porém, estes estudos foram realizados com indivíduos adultos em seu ambiente natural, dos quais se analisaram somente a seiva do xilema e as folhas. As análises do metabolismo do N nas raízes seriam importantes, mas não puderam ser

realizadas por inviabilidade técnica (AIDAR *et al.*, 2003; PEREIRA-SILVA, 2008; CAMPOS, 2009; SILVA, 2012).

Experimentos com plantas jovens (mudas) sob condições controladas são de grande relevância pois possibilitam analisar o metabolismo do N juntamente com aspectos do crescimento e da fisiologia vegetal. Além de permitir a análise das raízes e a resposta à tolerância ao  $\text{NH}_4^+$ , é possível também verificar se o modelo proposto por Aidar *et al.* (2003) poderia ser extrapolado para mudas de espécies arbóreas nativas neotropicais. A identificação das estratégias de uso do N por mudas de espécies arbóreas é de grande importância econômica e ecológica, já que os critérios de escolha das espécies e as práticas de manejo se basearão na forma de N predominante no solo, a fim de maximizar o sucesso de projetos de restauração da biodiversidade vegetal em áreas degradadas.

Este estudo teve como objetivo caracterizar as estratégias de uso de N de mudas de duas espécies utilizadas em reflorestamentos da Mata Atlântica, uma pioneira [*Cecropia pachystachya* Trécul (Urticaceae)] e uma não-pioneira [*Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae)]. Para isso, foram avaliados o efeito do cultivo com  $\text{NO}_3^-$  e/ou  $\text{NH}_4^+$  sobre o crescimento, a fisiologia e o metabolismo do N nessas mudas, a fim de se determinar as fontes inorgânicas de N mais benéficas para cada espécie, além de relacionar as estratégias de uso de N com as classes sucessionais dessas espécies. Foram levantadas duas hipóteses: 1- Mudas da espécie pioneira apresentam sensibilidade ao  $\text{NH}_4^+$ , diferente da espécie não-pioneira que é insensível. 2- A capacidade de assimilação de N a partir da redução do  $\text{NO}_3^-$  nas folhas é maior na espécie pioneira do que na espécie não-pioneira.

## **Material e métodos**

### ***Local de estudo***

A parte experimental e as análises fisiológicas deste estudo foram desenvolvidas no viveiro de mudas pertencentes ao Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas (LABRE) e em casa de vegetação pertencentes ao Departamento de Biologia Animal e Vegetal da Universidade Estadual de Londrina (UEL) durante o período de janeiro a maio de 2015, e as análises morfológicas e metabólicas foram realizadas no Laboratório de Ecofisiologia Vegetal da UEL.

### ***Espécies de plantas***

Foram utilizadas duas espécies arbóreas empregadas em programas de reflorestamento da Mata Atlântica desenvolvidos pelo viveiro do LABRE, da UEL. As

espécies arbóreas pertencem a grupos ecológicos distintos. Uma espécie representa a fase inicial da sucessão, *C. pachystachya* (Embaúba-do-brejo), uma espécie pioneira (intolerante à sombra), importante na regeneração de áreas degradadas, uma vez que coloniza clareiras rapidamente, atrai animais dispersores e melhora as propriedades do solo, o que propicia condições mais favoráveis ao estabelecimento de outras espécies (MOSSRI, 1997). A outra espécie é representante da fase final da sucessão, *E. brasiliensis* (Grumixama), uma espécie não-pioneira (tolerante à sombra), apresenta desenvolvimento lento, é perenifólia e seletiva higrófila, característica de mata pluvial atlântica (LORENZI, 2002).

As sementes das plantas utilizadas nos experimentos foram coletadas no período de outubro a dezembro de 2014. As sementes de *C. pachystachya* foram coletadas na Mata São José, Ibiaci/ PR, já as sementes de *E. brasiliensis* foram coletadas no campus da UEL. As sementes de *C. pachystachya* foram armazenadas em geladeira com temperatura aproximada de 5 °C até a semeadura. Já as sementes de *E. brasiliensis* foram semeadas logo após a coleta, uma vez que não podem ser armazenadas.

#### ***Crescimento inicial e condições de cultivo***

Foram utilizados vasos plásticos de 400 cm<sup>3</sup> (10,5 cm de altura, 9,5 cm de diâmetro inferior e 14 cm de diâmetro superior), e areia esterilizada como substrato, obtido pelo aquecimento de areia peneirada a 100 °C em estufa por 8 horas. A areia foi obtida comercialmente.

As sementes das espécies arbóreas foram semeadas em areia e mantidas em sementeiras no viveiro de mudas da UEL, por aproximadamente 60 dias, com irrigação diária. As plântulas das duas espécies arbóreas, com o primeiro par de folhas completamente expandidas, foram transferidas para vasos plásticos individuais contendo areia esterilizada, para serem submetidas aos tratamentos, de acordo com a forma de N com a qual as plantas foram nutridas ao longo do experimento: 1) NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; 2) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e 3) NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

Os vasos foram regados duas vezes por semana com 90 ml de solução nutritiva (pH entre 5,0 e 5,5) livre de N (Tabela 1) suplementada com as seguintes fontes inorgânicas de N: somente KNO<sub>3</sub> 4 mM (tratamento NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), somente (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 mM (tratamento NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ou (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 mM + KNO<sub>3</sub> 2 mM (tratamento NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>). Quando necessário, as plantas foram regadas com água destilada, prevenindo o dessecamento e visando lavar o excesso de sais do substrato.

Para garantir que as mudas expostas ao tratamento NH<sub>4</sub><sup>+</sup> tivessem somente amônio como fonte de N, foi adicionada à solução deste tratamento N-aliltiouréia 5 mM junto

com o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , a fim de inibir o processo de nitrificação, pelo qual alguns grupos de bactérias do substrato convertem o  $\text{NH}_4^+$  em  $\text{NO}_2^-$  e este em  $\text{NO}_3^-$ . Como precaução, fez-se um teste prévio em que as mudas de ambas as espécies arbóreas nativas foram submetidas ao tratamento com solução contendo  $\text{KNO}_3$  juntamente com N-aliltiouréia. Verificou-se que o inibidor utilizado não altera o crescimento da planta, agindo somente na inibição da formação de  $\text{NO}_3^-$  no substrato (dados não mostrados).

**Tabela 1.** Composição da solução nutritiva padrão livre de nitrogênio utilizada na rega da areia dos vasos em que foram cultivadas as mudas de *Cecropia pachystachya* e *Eugenia brasiliensis*.

Sal	Concentração final (mM)
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,00
$\text{K}_2\text{SO}_4$	2,00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,00
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,00
$\text{FeSO}_4$ -EDTA	0,1
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,0925
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,018
$\text{ZnCl}_2$	0,0015
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0005
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,00065

Para cada espécie arbórea, foram feitas nove repetições por tratamento, totalizando 27 vasos para cada espécie arbórea. Todos os vasos com as mudas foram distribuídos aleatoriamente e mantidos em casa de vegetação por aproximadamente 60 dias. As avaliações dos parâmetros metabólicos, fisiológicos e morfológicos foram realizadas no final do experimento.

#### ***Extração e análise da concentração relativa de nitrogênio mineral do substrato***

Foi coletado cerca de 100 g de substrato de cada vaso, totalizando quatro amostras de solo por tratamento para cada espécie arbórea. O N mineral presente em 10 g de amostra de substrato seco foi extraído através de agitação com 50 ml de KCl 2 M por 1 hora (SUBBARAO *et al.*, 2007). Após centrifugação e filtragem do sobrenadante, este foi utilizado para determinação dos níveis de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  através dos métodos analíticos citados no item “Extração e análise dos metabólitos primários”. Os resultados foram expressos como a concentração relativa (%) de cada forma combinada de N (N-  $\text{NO}_3^-$  e N-  $\text{NH}_4^+$ ) em função da quantidade total de N recuperado do substrato.

### ***Análises de crescimento***

Foram avaliados os seguintes parâmetros morfológicos: comprimento da raiz e da parte aérea (PA) (em cm); massa seca (MS) da raiz e da PA (em g) e taxa de crescimento relativo (TCR) da raiz e da PA (em  $\text{mg g}^{-1} \text{dia}^{-1}$ ). Para a determinação da MS, 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 razão raiz/PA referente à MS foi obtida pela divisão dos valores de MS da raiz pela MS da PA.

A TCR foi calculada utilizando a equação  $\ln MS_f - \ln MS_i / t$ , em que  $MS_f$  = massa seca final,  $MS_i$  = massa seca inicial e  $t$  = representa o tempo de duração do experimento. A  $MS_i$  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 sete indivíduos de cada espécie foi determinada.

### ***Análises das trocas gasosas***

Foram determinadas as taxas de fotossíntese líquida ( $A$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração ( $E$ ) e concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ). A eficiência instantânea de carboxilação ( $k$ ) foi calculada através da razão  $A/C_i$  multiplicada por 10,75. As análises de trocas gasosas foram realizadas entre 8 e 10 h, utilizando-se um analisador portátil de gás por infravermelho (Irga) modelo LICOR 6400 XT (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) conectado a uma câmara de 6  $\text{cm}^2$ . A densidade de fluxo fotônico fotossintético (PPFD) ideal para as análises foi de 1.900  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , conforme estudo prévio (CALZAVARA *et al.*, 2015), e o fluxo de 400  $\text{mL min}^{-1}$ .

### ***Análises de fluorescência da clorofila***

Os parâmetros de fluorescência da clorofila foram medidos na superfície adaxial da epiderme da folha, utilizando um fluorômetro OS1p (Opti-Sciences, Hudson, NH, EUA). A eficiência máxima do fotossistema II, expresso como  $F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m$  (MURCHIE & LAWSON, 2013), foi medida entre 8 e 10 h. Após 20 min de adaptação ao escuro, mediu-se a fluorescência mínima ( $F_0$ ) utilizando uma luz fraca modulada e determinou-se a fluorescência máxima ( $F_m$ ) com um pulso de luz saturante de 0,8 s de 8,250  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . O rendimento quântico efetivo do fotossistema II foi calculado como  $Y(\text{II}) = (F_m' - F') / F_m'$ , onde  $F'$  é o rendimento da fluorescência em estado estacionário e  $F_m'$  a fluorescência máxima no estado adaptado à luz. A taxa de transporte de elétrons fotossintéticos foi calculada como  $\text{ETR} = 0,5 \times \text{PPFD} \times Y(\text{II}) \times 0,84$ , assumindo uma partição

igual (0,5) de energia de excitação entre os fotossistemas e que apenas uma fração (0,84) da luz incidente foi absorvida pelos fotossistemas (RASCHE *et al.*, 2000).

### ***Extração e análise dos metabólitos primários***

Para a extração dos metabólitos, foram coletadas raízes finas e folhas novas completamente expandidas. As amostras foram maceradas em N<sub>2</sub> líquido e os compostos de baixo peso molecular (aminoácidos, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) foram extraídos com MCW (metanol:clorofórmio:água, 12:5:3, v/v/v) de acordo com o protocolo descrito por Oliveira & Sodek (2013). As proteínas foram extraídas a partir do resíduo resultante da extração com MCW através de agitação contínua por quatro horas com NaOH (0,1 M). Para a extração das clorofilas, as folhas foram maceradas no escuro em acetona 80% contendo carbonato de magnésio 0,05 % e o extrato foi centrifugado antes das análises (PORRA, 2002).

O NO<sub>3</sub><sup>-</sup> foi determinado através da sua redução a NO<sub>2</sub><sup>-</sup> pelo catalisador cloreto de vanádio, e o NO<sub>2</sub><sup>-</sup> resultante foi detectado pelo reagente de Griess (sulfanilamida 1% em HCl 1,5 N seguida da adição de N-(naftil)-etilenodiamina 0,02 %) (MIRANDA *et al.*, 2001). O NH<sub>4</sub><sup>+</sup> foi quantificado pela leitura da absorbância a 625 nm após a reação de Berthelot (MCCULLOUGH, 1967). O conteúdo de proteínas e aminoácidos livres totais foi determinado espectrofotometricamente com o reagente Coomassie Blue (BRADFORD, 1976) e pela reação com ninhidrina (YEMM *et al.*, 1955), respectivamente. Os teores de clorofilas *a* e *b* foram determinados através da análise das absorbâncias em 646,6 e 663,6 nm e as concentrações dos pigmentos calculadas por meio das equações propostas por Porra (2002). Em todas as análises espectrofotométricas acima citadas, a leitura das absorbâncias foi realizada utilizando-se um espectrofotômetro Shimadzu UV-1203.

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

As raízes e as folhas foram coletadas e imediatamente utilizadas para a análise enzimática. A atividade da enzima NR foi determinada *in vivo* baseando-se no método proposto por Stewart *et al.* (1986). Amostras de raízes e folhas foram cortadas em segmentos e transferidas para seringas contendo o meio de reação (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,05 M pH 7,5; propanol 1%; KNO<sub>3</sub> 0,05 M). As seringas foram mantidas a temperatura ambiente sob vácuo (para a infiltração do meio de reação nos tecidos) e no escuro e, após 40 minutos, uma alíquota do meio foi coletada para a dosagem do NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, formado a partir do substrato NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, utilizando-se o reagente de Griess (HAGEMAN & REED, 1980).

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

A seiva do xilema foi extraída a partir de caules com folhas 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  $\text{NH}_4^+$ , seguindo os métodos citados no item “Extração e análise dos metabólitos primários”.

### **Análise estatística**

Nas duas espécies, os tratamentos foram dispostos de forma aleatória. Nove repetições foram utilizadas para as análises de crescimento e de trocas gasosas, enquanto quatro repetições foram utilizadas para os parâmetros de fluorescência da clorofila e metabólicos. A normalidade e a homocedasticidade foram testadas, e quando necessário os dados foram transformados em log. Os dados foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) de um fator, para comparar o efeito dos tratamentos em cada espécie, e a uma ANOVA de dois fatores, para comparar as raízes e folhas das duas espécies nativas. Posteriormente, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. Todas as análises estatísticas foram feitas no programa Statistica v. 10.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

## **Resultados**

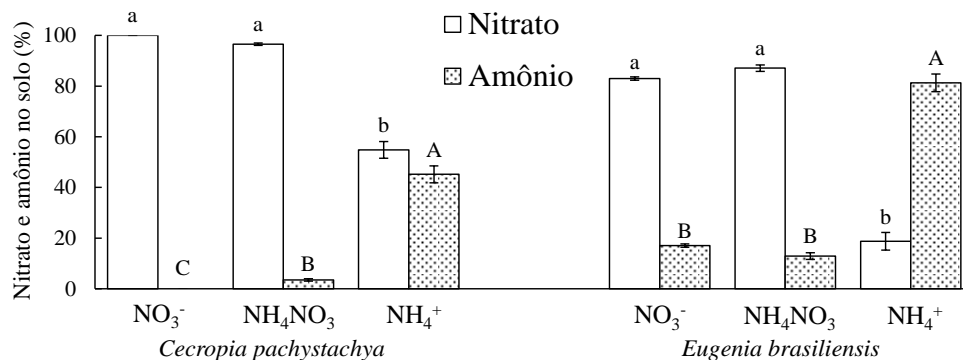
### *N no substrato de cultivo*

Observou-se que, independente da espécie, as proporções relativas de nitrato no substrato submetido ao tratamento  $\text{NH}_4^+$  foram menores comparativamente aos demais tratamentos, não diferindo entre os tratamentos  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  nos solos de ambas as espécies vegetais (Figura 1). A maior proporção relativa de amônio no substrato das mudas de *C. pachystachya* foi verificada no tratamento  $\text{NH}_4^+$  (45%), seguido pelo tratamento contendo ambas as fontes de N (3%) e a menor naquele tratado com  $\text{NO}_3^-$  (0%) (Figura 1). O substrato da espécie não-pioneira não apresentou diferenças na quantidade relativa de amônio entre os tratamentos  $\text{NO}_3^-$  (17%) e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (13%), sendo maior nos tratados com  $\text{NH}_4^+$  (81%) (Figura 1), os quais apresentaram a menor proporção de nitrato, evidenciando o efeito na inibição da nitrificação onde uma mínima concentração de  $\text{NH}_4^+$  foi convertida a  $\text{NO}_3^-$ .

### *Crescimento de mudas cultivadas com $\text{NO}_3^-$ e/ou $\text{NH}_4^+$*

A suplementação com  $\text{NO}_3^-$  e/ou  $\text{NH}_4^+$  no substrato afetou o crescimento das mudas (Tabela 2). O comprimento da raiz foi maior nas mudas de *C. pachystachya* tratadas

com  $\text{NO}_3^-$ , enquanto em *E. brasiliensis* o comprimento da raiz foi menor nas mudas submetidas a este tratamento. O comprimento da PA das mudas de *C. pachystachya* foi diminuído quando estas foram expostas ao tratamento  $\text{NO}_3^-$ . Já para as mudas de *E. brasiliensis* foi observado que o comprimento da PA diferiu entre os tratamentos  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ , sendo menor quando tratado apenas com  $\text{NH}_4^+$ . A razão raiz/PA referente à MS nas plantas de *C. pachystachya* foi decrescente entre os tratamentos avaliados, seguindo a sequência  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{NH}_4^+$ . As mudas de *E. brasiliensis* não apresentaram diferenças na relação raiz/PA entre as diferentes formas combinadas de N testadas (Tabela 2). A TCR da raiz diferiu entre as fontes isoladas de N para *C. pachystachya*, sendo maior naquelas tratadas com  $\text{NO}_3^-$ . A TCR da PA para esta espécie apresentou-se maior nas mudas tratadas com  $\text{NO}_3^-$  e menor nas mudas tratadas com  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Estes parâmetros não apresentaram diferenças para a espécie não-pioneira quando tratadas com  $\text{NO}_3^-$  e/ou  $\text{NH}_4^+$  (Tabela 2).



**Figura 1.** Quantificação relativa (%) de nitrato e amônio no substrato de cultivo das mudas de *Cecropia pachystachya* e *Eugenia brasiliensis* cultivadas em areia acrescida de diferentes fontes inorgânicas de nitrogênio ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{NH}_4^+$ ). As análises estatísticas envolveram somente comparações intraespecíficas. Letras minúsculas comparam a porcentagem de nitrato, assim como letras maiúsculas comparam a porcentagem de amônio. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

#### Análises fisiológicas de mudas cultivadas com $\text{NO}_3^-$ e/ou $\text{NH}_4^+$

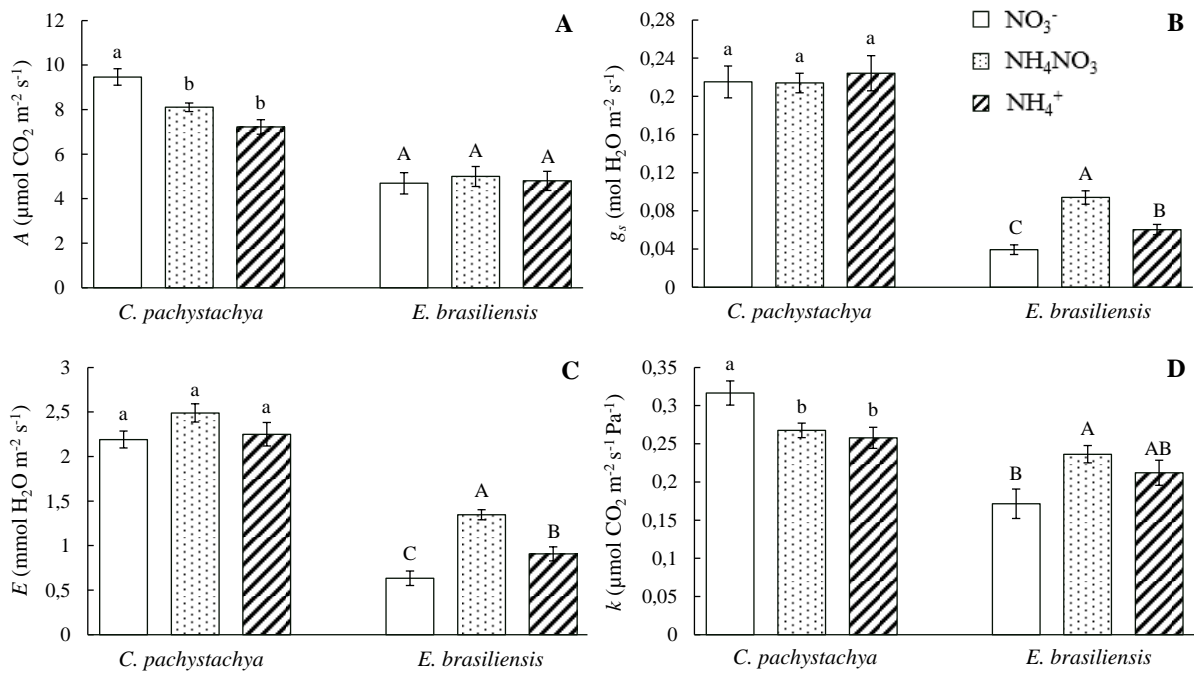
A A diferiu apenas nas mudas de *C. pachystachya* tratadas com  $\text{NO}_3^-$ , apresentando os maiores valores de A observados (Figura 2A). A  $g_s$  e a E das mudas de *E. brasiliensis* apresentaram diferenças entre os três tratamentos, onde a maior média se deu no tratamento com ambas as fontes de N, seguido pelo tratamento  $\text{NH}_4^+$  e com a menor média no tratamento  $\text{NO}_3^-$  (Figuras 2B, C). Diferente de *E. brasiliensis*, as mudas de *C. pachystachya* não apresentaram diferenças em  $g_s$  e E quando submetidas aos diferentes tratamentos (Figuras 2B, C). A k foi maior nas mudas tratadas com  $\text{NO}_3^-$  na espécie pioneira, já para *E. brasiliensis* este parâmetro foi prejudicado quando tratado com esta fonte de N (Figura 2D).

**Tabela 2.** Médias e erros-padrão de parâmetros referentes ao crescimento de mudas de *Cecropia pachystachya* (*Cp*) e *Eugenia brasiliensis* (*Eb*) cultivadas com diferentes fontes inorgânicas de nitrogênio ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{NH}_4^+$ ). As análises estatísticas envolveram somente comparações intraespecíficas. Letras minúsculas na linha comparam os tratamentos em *Cp*, assim como letras maiúsculas na linha comparam os tratamentos em *Eb*. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

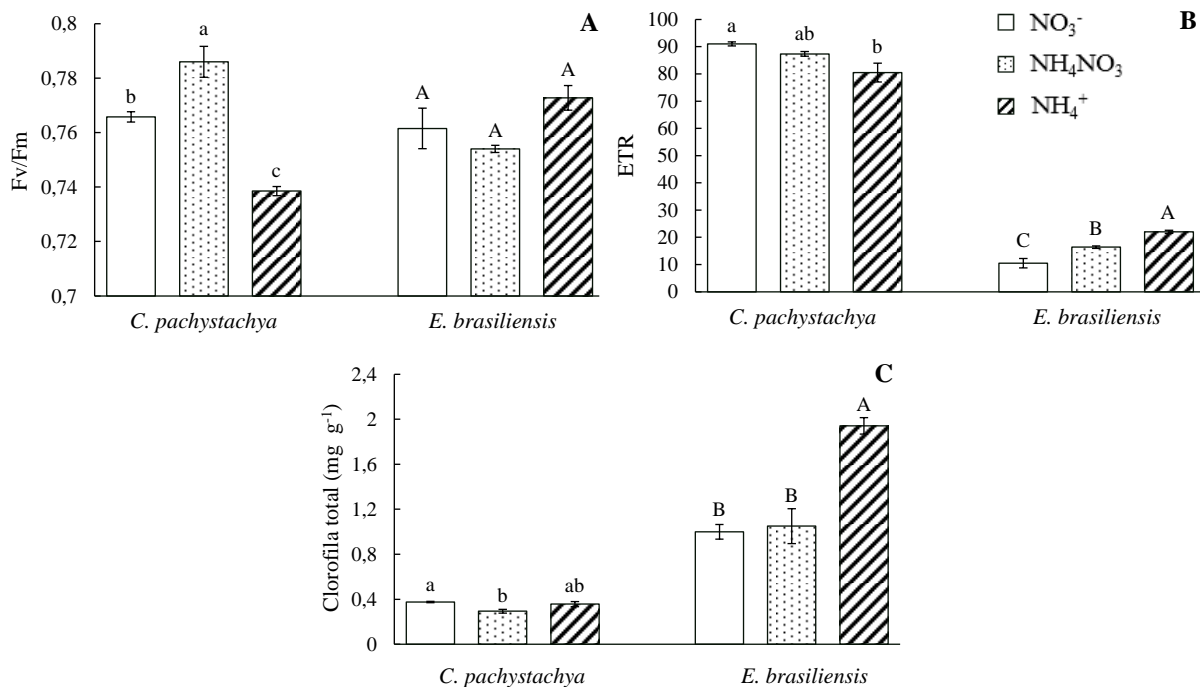
Variável	Espécie	Tratamento		
		$\text{NO}_3^-$	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	$\text{NH}_4^+$
Comprimento da raiz (cm)	<i>Cp</i>	20,0 ± 0,936 a	16,9 ± 0,881 b	15,4 ± 0,689 b
	<i>Eb</i>	8,31 ± 0,596 B	11,2 ± 0,329 A	11,3 ± 0,550 A
Comprimento da PA (cm)	<i>Cp</i>	10,9 ± 0,510 b	12,8 ± 0,380 a	14,1 ± 0,489 a
	<i>Eb</i>	9,98 ± 0,286 A	9,67 ± 0,273 AB	8,83 ± 0,381 B
Razão raiz/PA da massa seca	<i>Cp</i>	0,353 ± 0,016 a	0,296 ± 0,014 b	0,217 ± 0,006 c
	<i>Eb</i>	0,404 ± 0,051 A	0,354 ± 0,033 A	0,286 ± 0,035 A
TCR da raiz ( $\text{mg g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ )	<i>Cp</i>	72,3 ± 1,24 a	70,7 ± 2,34 ab	64,17 ± 2,22 b
	<i>Eb</i>	7,02 ± 1,07 A	9,87 ± 1,35 A	7,57 ± 1,20 A
TCR da PA ( $\text{mg g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ )	<i>Cp</i>	68,03 ± 1,31 a	62,41 ± 1,59 b	64,05 ± 1,23 ab
	<i>Eb</i>	5,18 ± 1,17 A	7,29 ± 1,11 A	6,76 ± 1,61 A

A eficiência máxima do fotossistema II, obtida pelos valores de  $F_v/F_m$  das mudas de *C. pachystachya*, apresentou diferenças entre os tratamentos, sendo que o maior valor foi observado nas mudas tratadas com  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , seguido por  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ , respectivamente. Os valores deste parâmetro para *E. brasiliensis* não variaram (Figura 3A). A ETR apresentou diferenças entre os tratamentos  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  em *C. pachystachya*, sendo o maior valor observado no tratamento com N-nítrico. Para *E. brasiliensis*, houve diferença entre os três tratamentos, com o maior valor nas mudas tratadas com  $\text{NH}_4^+$ , e com a menor ETR nas mudas tratadas com  $\text{NO}_3^-$  (Figura 3B).

As mudas de *C. pachystachya* apresentaram diferenças na concentração de clorofila total (clorofila *a* + clorofila *b* = clorofila total) quando tratadas com  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , observando-se os menores valores nas mudas cultivadas com ambas as fontes de N. Em *E. brasiliensis*, foi observado um aumento do conteúdo de clorofila total nas mudas tratadas com  $\text{NH}_4^+$  (Figura 3C).



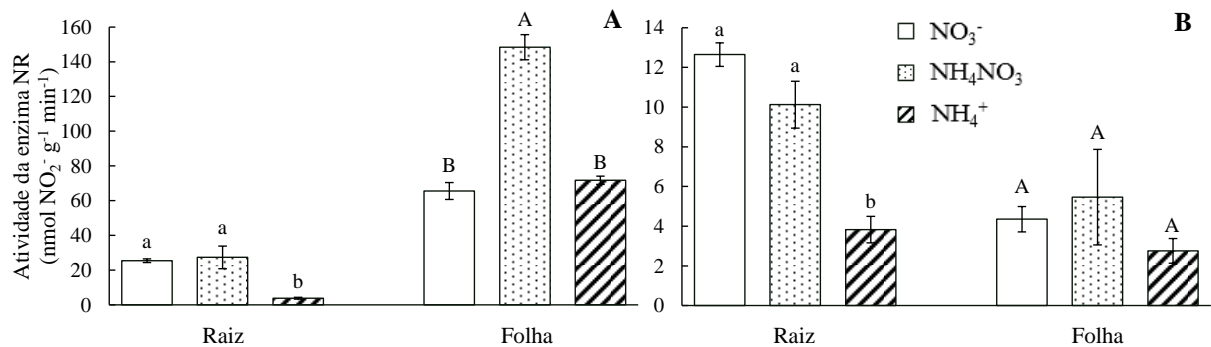
**Figura 2.** Trocas gasosas foliares de mudas de *Cecropia pachystachya* e *Eugenia brasiliensis* cultivadas com diferentes fontes inorgânicas de nitrogênio ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{NH}_4^+$ ). A- fotossíntese líquida (A); B- condutância estomática ( $g_s$ ); C- transpiração (E); e D- eficiência instantânea de carboxilação (k). As análises estatísticas envolveram somente comparações intraespecíficas. Letras minúsculas comparam os tratamentos em *C. pachystachya*, assim como letras maiúsculas comparam os tratamentos em *E. brasiliensis*. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 3.** Fluorescência da clorofila e conteúdo de clorofila total de folhas de mudas de *Cecropia pachystachya* e *Eugenia brasiliensis* cultivadas com diferentes fontes inorgânicas de nitrogênio ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{NH}_4^+$ ). A- eficiência máxima do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ); B- taxa de transporte de elétrons (E<sub>TR</sub>); e C- conteúdo de clorofila a + clorofila b (clorofila total). As análises estatísticas envolveram somente comparações intraespecíficas. Letras minúsculas comparam os tratamentos em *C. pachystachya*, assim como letras maiúsculas comparam os tratamentos em *E. brasiliensis*. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

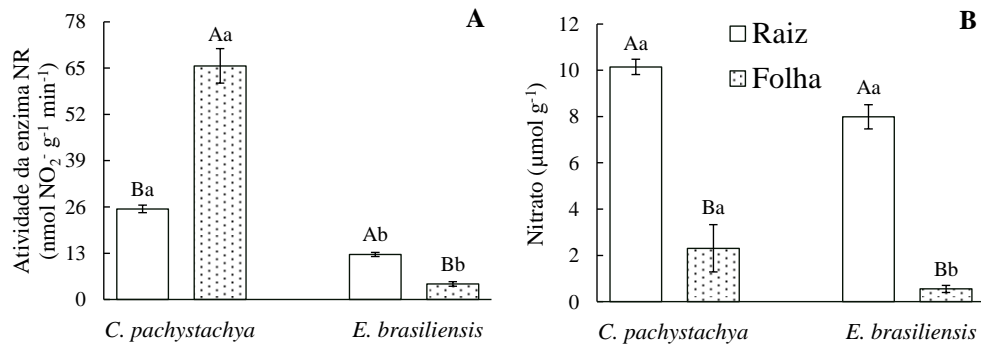
*Metabolismo do N em raízes e folhas de mudas cultivadas com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e/ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>*

Os tratamentos contendo NO<sub>3</sub><sup>-</sup> induziram o aumento na atividade da enzima NR nas raízes das mudas das duas espécies arbóreas (Figura 4). Já nas folhas, somente as mudas de *C. pachystachya* tratadas com NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> apresentaram um aumento na atividade da NR (Figura 4A). Quando consideradas somente as mudas cultivadas com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Figura 5A), uma maior atividade da NR foliar foi observada em *C. pachystachya*, sendo 2,6 vezes maior do que a atividade da NR de suas raízes. Já na espécie não-pioneira, uma maior atividade da NR foi observada nas raízes, sendo 3 vezes maior do que a atividade nas folhas (Figura 5A). Além disso, a comparação entre as espécies mostrou que a atividade da NR das mudas de *C. pachystachya* foi 2 e 15 vezes maior na raiz e na folha, respectivamente, quando comparadas com *E. brasiliensis* (Figura 5A).



**Figura 4.** Atividade da enzima Nitrato Redutase (NR), em raiz e folha de mudas de *Cecropia pachystachya* (A) e *Eugenia brasiliensis* (B) cultivadas com diferentes fontes inorgânicas de nitrogênio (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). As análises estatísticas envolveram somente comparações intraespecíficas. Letras minúsculas nas raízes, assim como letras maiúsculas nas folhas comparam os tratamentos. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

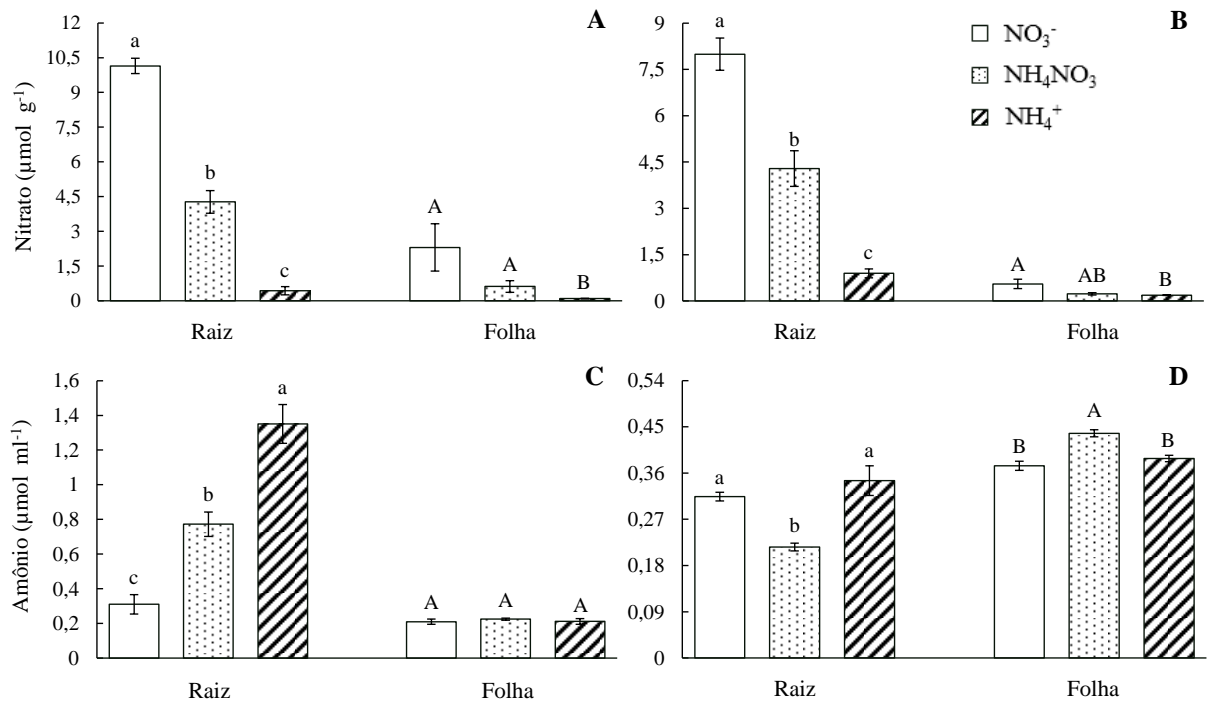
Nas mudas tratadas com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> as raízes de ambas as espécies apresentaram maiores concentrações de nitrato, seguido pelo tratamento NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e por fim pela menor concentração de nitrato nas mudas tratadas com NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Figuras 6A, B). Nas folhas da espécie pioneira, aquelas tratadas com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> apresentaram maior conteúdo de nitrato quando comparadas com aquelas submetidas ao tratamento NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Figura 6A). Na espécie não-pioneira, o conteúdo de nitrato na folha apresentou-se menor nas mudas tratadas com NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e maior nas tratadas com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Figura 6B). Para ambas as espécies, quando consideradas somente as mudas cultivadas com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> pode-se observar que o acúmulo de nitrato foi maior nas raízes, sendo 8 vezes maior do que nas folhas (Figura 5B). Além disso, observou-se uma maior concentração de nitrato nas folhas da espécie pioneira, sendo 4 vezes maior do que nas folhas de *E. brasiliensis* (Figura 5B).



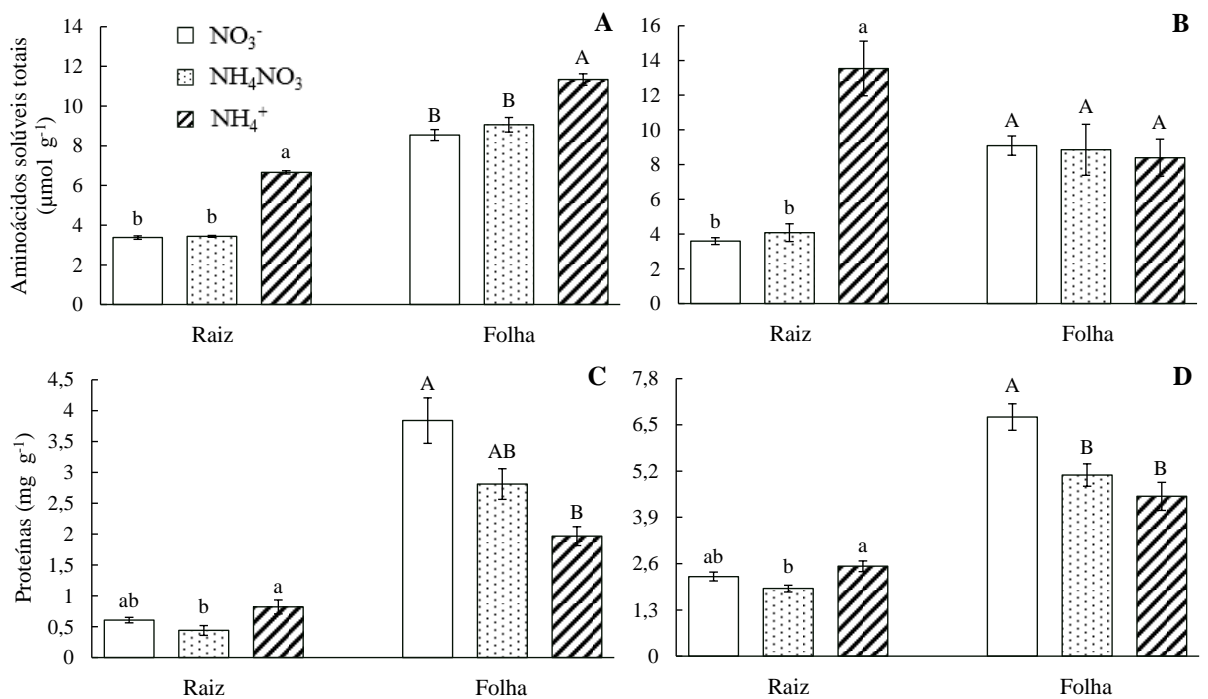
**Figura 5.** Atividade da enzima Nitrato Redutase (NR) (A) e Conteúdo de nitrato (B) em raiz e folha de mudas de *Cecropia pachystachya* e *Eugenia brasiliensis* cultivadas com  $\text{NO}_3^-$ . As análises estatísticas envolveram comparações intraespecíficas e interespecíficas. Letras maiúsculas comparam raiz e folha em cada espécie. Letras minúsculas comparam as espécies em cada órgão vegetal. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

A concentração de amônio nas raízes de *C. pachystachya* foi aumentada quando as mudas foram tratadas com  $\text{NH}_4^+$  e diminuídas quando tratadas com  $\text{NO}_3^-$ , em comparação com o tratamento  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Nas folhas desta espécie, a concentração de amônio não se alterou, independente dos tratamentos (Figura 6C). Na espécie não-pioneira, a menor concentração de amônio na raiz foi observada nas mudas tratadas com  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , já nas folhas, as mudas submetidas a este tratamento apresentaram a maior concentração de amônio (Figura 6D).

Mudas cultivadas com  $\text{NH}_4^+$  apresentaram altos níveis de aminoácidos solúveis totais nas raízes, em ambas as espécies. O cultivo com  $\text{NH}_4^+$  também levou a um aumento nos níveis de aminoácidos solúveis totais nas folhas de *C. pachystachya* (Figura 7A), enquanto que em *E. brasiliensis* o conteúdo de aminoácidos nas folhas não se alterou (Figura 7B). As concentrações de proteínas nas raízes de ambas as espécies apresentaram diferenças entre os dois tratamentos contendo  $\text{NH}_4^+$ , onde as maiores concentrações foram observadas nas mudas tratadas apenas com  $\text{NH}_4^+$  e o menores naquelas tratadas com  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (Figuras 7C, D). Nas folhas, os tratamentos com as formas isoladas de N apresentaram diferenças na espécie pioneira, onde a maior concentração de proteínas foi observada nas mudas tratadas com  $\text{NO}_3^-$  (Figura 7C). Para *E. brasiliensis* as mudas tratadas com  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{NH}_4^+$  apresentaram as menores concentrações de proteínas nas folhas (Figura 7D).



**Figura 6.** Conteúdo de Nitrato (A e B) e Amônio (C e D) em raiz e folha de mudas de *Cecropia pachystachya* (A e C) e *Eugenia brasiliensis* (B e D) cultivadas com diferentes fontes inorgânicas de nitrogênio ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{NH}_4^+$ ). As análises estatísticas envolveram somente comparações intraespecíficas. Letras minúsculas nas raízes, assim como letras maiúsculas nas folhas comparam os tratamentos. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 7.** Conteúdo de Aminoácidos solúveis totais (A e B) e Proteínas totais (C e D) em raiz e folha de mudas de *Cecropia pachystachya* (A e C) e *Eugenia brasiliensis* (B e D) cultivadas com diferentes fontes inorgânicas de nitrogênio ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{NH}_4^+$ ). As análises estatísticas envolveram somente comparações intraespecíficas. Letras minúsculas nas raízes, assim como letras maiúsculas nas folhas comparam os tratamentos. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

*Translocação de N na seiva do xilema de mudas cultivadas com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e/ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>*

A proporção relativa (em mol %) de nitrato, amônio e aminoácidos translocados pela seiva do xilema foram afetadas pela fonte de N nessas plantas (Tabela 3). Nitrato foi a forma predominantemente translocada pela seiva do xilema nas mudas de *C. pachystachya* cultivadas com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, o que está de acordo com a alta concentração de nitrato nas folhas desta espécie (Figura 6A). Quando cultivadas com NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, as mudas de *C. pachystachya* translocaram predominantemente aminoácidos pela seiva do xilema, da mesma forma que as mudas de *E. brasiliensis*, que translocaram aminoácidos independentemente da forma de N no substrato (Tabela 3). As mudas das duas espécies nativas apresentaram uma menor proporção de nitrato na seiva quando submetidas ao NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. A proporção de amônio na seiva apresentou diferença somente entre os tratamentos NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> na espécie não-pioneira, onde a maior proporção de amônio se deu naquelas tratadas com NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. As distintas fontes de N não alteraram as proporções de aminoácidos na seiva das mudas de *E. brasiliensis*. Porém, na espécie pioneira, as mudas submetidas ao tratamento NH<sub>4</sub><sup>+</sup> apresentaram um aumento na proporção de aminoácidos translocados na seiva do xilema (Tabela 3).

**Tabela 3.** Médias e erros-padrão da porcentagem (mol %) de Nitrato, Amônio e Aminoácidos solúveis totais na seiva do xilema de mudas de *Cecropia pachystachya* (*Cp*) e *Eugenia brasiliensis* (*Eb*) cultivadas com diferentes fontes inorgânicas de nitrogênio (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). As análises estatísticas envolveram somente comparações intraespecíficas. Letras minúsculas na linha comparam os tratamentos em *Cp*, assim como letras maiúsculas na linha comparam os tratamentos em *Eb*. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Variável	Espécie	Tratamento		
		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
Nitrato (%)	<i>Cp</i>	58,6 ± 6,15 a	52,3 ± 1,66 a	1,88 ± 0,317 b
	<i>Eb</i>	28,4 ± 2,20 A	28,0 ± 4,13 A	6,62 ± 0,798 B
Amônio (%)	<i>Cp</i>	6,44 ± 0,093 a	5,98 ± 0,483 a	5,17 ± 0,995 a
	<i>Eb</i>	10,3 ± 3,46 AB	3,11 ± 1,44 B	19,0 ± 1,18 A
Aminoácidos (%)	<i>Cp</i>	34,9 ± 6,22 b	41,7 ± 1,87 b	92,9 ± 1,28 a
	<i>Eb</i>	61,3 ± 4,37 A	68,9 ± 3,05 A	74,4 ± 1,97 A

## Discussão

Este estudo avaliou o efeito do cultivo com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e/ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup> no crescimento, na fisiologia e no metabolismo do N de mudas de uma espécie arbórea pioneira, *C.*

*pachystachya*, e de uma não-pioneira, *E. brasiliensis*. Foram observadas diferenças na sensibilidade ao  $\text{NH}_4^+$ , na assimilação de N nas raízes e folhas e na translocação de N pela seiva do xilema, entre as duas espécies analisadas.

Com as análises de crescimento e dos parâmetros fisiológicos, foi possível observar respostas distintas à sensibilidade por  $\text{NH}_4^+$  nas duas espécies arbóreas (Tabela 2; Figuras 2 e 3). *C. pachystachya* apresentou sensibilidade ao  $\text{NH}_4^+$ , diferente das mudas de *E. brasiliensis*, que demonstraram baixa sensibilidade a este cátion. A utilização de  $\text{NH}_4^+$  como fonte inorgânica de N foi prejudicial para o crescimento e para a fisiologia das mudas de *C. pachystachya*, sendo evidenciados pelos menores valores de TCR da raiz,  $A$ ,  $k$ ,  $F_v/F_m$  e ETR (Tabela 2; Figuras 2 e 3), o que indica que esta espécie possui uma maior sensibilidade ao  $\text{NH}_4^+$ . A diminuição da concentração de proteínas nas folhas (Figura 7C) pode estar associada à redução da  $A$  induzida pelo tratamento com  $\text{NH}_4^+$  nas mudas de *C. pachystachya*. Já quando cultivadas com maior proporção de  $\text{NO}_3^-$ , os parâmetros de crescimento e da fisiologia das mudas desta espécie apresentaram os maiores valores, o que pode ser explicado pela maior capacidade de plantas pioneiras em utilizar  $\text{NO}_3^-$  (STEWART *et al.*, 1993).

Apesar da redução da  $g_s$  e da  $E$  nas mudas de *E. brasiliensis* submetidas ao  $\text{NH}_4^+$ , a  $A$  e  $k$  não foram afetadas (Figura 2), não interferindo no crescimento destas mudas, exceto para o comprimento da PA (Tabela 2). As mudas desta espécie não-pioneira apresentaram uma redução do comprimento das raízes e da ETR quando submetidas ao  $\text{NO}_3^-$  (Tabela 2 e Figura 3B). Já quando tratadas com  $\text{NH}_4^+$ , o comprimento das raízes, a ETR e a concentração de clorofila total foram aumentados (Tabela 2, Figuras 3B, C). Isto pode estar relacionado à preferência pela absorção de N na forma de  $\text{NH}_4^+$  e à baixa sensibilidade a este cátion.

A toxicidade causada pelo  $\text{NH}_4^+$ , além de alterar os parâmetros fisiológicos e de crescimento das plantas, pode estar relacionada aos desequilíbrios iônicos, hormonais e metabólicos causados por este cátion, como deficiência de potássio, produção de etileno e esgotamento de esqueletos de carbono devido à intensa assimilação de  $\text{NH}_4^+$  em aminoácidos nas raízes (BRITTO & KRONZUCKER, 2002). Além disso, uma das principais causas de toxicidade causada por  $\text{NH}_4^+$  consideradas para espécies sensíveis é a incapacidade de as células da raiz controlar o influxo deste cátion (BRITTO *et al.*, 2001; KRONZUCKER *et al.*, 2003), como observado nas raízes de *C. pachystachya* que acumularam  $\text{NH}_4^+$  (Figura 6C).

Em comparação com outras espécies pioneiras, como *Trema micrantha* (INOCÊNCIO, 2014) e *Heliocarpus popayanensis* (FREITAS, 2015) que tiveram seus parâmetros fisiológicos e de crescimento altamente prejudicados pelo cultivo com  $\text{NH}_4^+$ , *C.*

*pachystachya* apresentou uma sensibilidade relativamente baixa ao  $\text{NH}_4^+$ , o que sugere que esta espécie apresenta plasticidade no uso de fontes de N, podendo utilizar  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ . A baixa sensibilidade ao  $\text{NH}_4^+$  nesta espécie, em comparação com outras espécies pioneiras, pode estar relacionada à adaptação aos locais encharcados (BATISTA *et al.*, 2008), uma vez que estes ambientes úmidos resultam de uma alta concentração de  $\text{NH}_4^+$  devido às baixas taxas de nitrificação em solos hipóxicos, já que a oxidação do  $\text{NH}_4^+$  necessita de oxigênio para ocorrer (CRAWFORD, 1982).

A principal diferença entre espécies pioneiras e não-pioneiras está relacionada à assimilação de N nas folhas. As espécies pioneiras, conforme observado em *C. pachystachya*, são caracterizadas pela maior redução de  $\text{NO}_3^-$  na folha, relacionada à elevada atividade da NR foliar (Figura 5A). Já nas espécies não-pioneiras, como observado em *E. brasiliensis*, tem sido observado menor atividade assimilatória nas folhas, caracterizada pela baixa atividade da NR foliar (Figura 5A), o que está de acordo com o estudo de Aidar *et al.* (2003) com árvores adultas na Mata Atlântica. A baixa capacidade de assimilação de N nas folhas destas espécies tem relação com o uso de  $\text{NH}_4^+$  como fonte primária de N e com a assimilação de N a partir do  $\text{NH}_4^+$  ou do  $\text{NO}_3^-$  pelas raízes (Figura 5A) (SMITH & RICE, 1983). Espécies pioneiras são encontradas em locais com alta disponibilidade de luz e  $\text{NO}_3^-$ , como clareiras e bordas de florestas, o que é favorável à assimilação de N na folha a partir da redução do  $\text{NO}_3^-$ , uma vez que a redução de  $\text{NO}_2^-$  pode ser movida pelo transporte de elétrons da fotossíntese (GUO *et al.*, 2007b). Porém, em ambientes sombreados, onde predominam as espécies não-pioneiras, a assimilação de N nas folhas seria desvantajosa devido ao alto custo energético (AIDAR *et al.*, 2003).

A presença de alta concentração de  $\text{NO}_3^-$  nas raízes das mudas de *E. brasiliensis* demonstra que esta espécie, assim como *Guarea kunthiana* (INOCÊNCIO, 2014) e *Cariniana estrellensis* (FREITAS, 2015), absorve  $\text{NO}_3^-$  pelas raízes. Além disso, as dosagens de amônio, aminoácidos e proteínas nas raízes e nas folhas das mudas de *E. brasiliensis* (Figuras 6D, 7B e D) indicam que ocorreu assimilação N a partir da redução do  $\text{NO}_3^-$  e que, apesar da baixa atividade da enzima NR nas raízes e folhas dessas mudas (Figura 4B), esta parece ser suficiente para atender à baixa atividade metabólica e à demanda de N nesta espécie tolerante à sombra (STEWART *et al.*, 1992). Estudos com espécies de florestas tropicais estão de acordo com os resultados deste trabalho, nos quais palmeiras de sub-bosque demonstraram flexibilidade no uso de  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  do solo (ANDERSEN & TURNER, 2013), e uma espécie arbórea de sucessão tardia, *Eperua falcata* foi capaz de usar  $\text{NO}_3^-$  como fonte de N (SCHIMANN *et al.*, 2008).

A espécie *E. brasiliensis* apresentou atividade da NR menor nas folhas do que nas raízes (Figura 5A), predominância de aminoácidos translocados pela seiva do xilema (Tabela 3), acumulação de  $\text{NO}_3^-$  nas raízes e baixa concentração deste íon nas folhas (Figura 6B), o que indica que a redução de  $\text{NO}_3^-$  ocorreu principalmente nas raízes dessa espécie. Isto pode estar relacionado à adaptação desta espécie de sub-bosque à sombra, uma vez que evitaria a concorrência entre a assimilação de carbono e N por ATP e poder redutor, NADH e ferredoxina reduzida, nas folhas (BLOOM *et al.*, 2010).

As duas espécies arbóreas foram capazes de absorver e assimilar  $\text{NH}_4^+$ , como observado pela dosagem de amônio, aminoácidos e proteínas nas raízes e nas folhas de mudas suplementadas com este cátion (Figuras 6 e 7). Foi observada alta concentração de aminoácidos nas raízes de ambas as espécies em resposta ao cultivo com  $\text{NH}_4^+$  (Figuras 6A, B), o que indica uma intensa assimilação deste cátion, reduzindo assim o seu acúmulo (OLIVEIRA *et al.*, 2013, SARASKETA *et al.*, 2016). Além disso, a suplementação com  $\text{NH}_4^+$  levou a um aumento da concentração relativa de aminoácidos translocados pela seiva do xilema (Tabela 3), o que sugere que a assimilação do  $\text{NH}_4^+$  absorvido ocorreu principalmente nas raízes, como já relatado em plantas de soja cultivadas com  $\text{NH}_4^+$  (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Os resultados deste estudo permitem supor que as mudas de *C. pachystachya* apresentariam maior sucesso em solos com predominância de  $\text{NO}_3^-$ , em contraste com *E. brasiliensis* que cresceria melhor em solos contendo  $\text{NH}_4^+$  como fonte principal de N, já que esta espécie apresentou maior tolerância a este cátion. *C. pachystachya* apresentou uma maior TCR quando cultivada com  $\text{NO}_3^-$ , enquanto que o fornecimento de  $\text{NH}_4^+$ , assim como a forma combinada de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , demonstrou-se eficiente para *E. brasiliensis*. A aplicação de ambas as fontes de N no campo é indicada para ambas as espécies, uma vez que a coexistência de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  no solo pode causar um efeito sinérgico positivo em plantas (KRONZUCKER *et al.*, 1997), já que estas geralmente se desenvolvem melhor em solos com composições mistas de N (STEWART *et al.*, 1993), onde as perdas de  $\text{NO}_3^-$  por lixiviação e emissões gasosas (DAVIDSON *et al.*, 2000) podem ser repostas via nitrificação do  $\text{NH}_4^+$  disponível no solo.

### Referências bibliográficas

- AIDAR, M. P. M.; SCHMIDT, S.; MOSS, G.; STEWART, G. R.; JOLY, C. A. (2003). Nitrogen use strategies of Neotropical rainforest trees in threatened Atlantic Forest. **Plant Cell and Environment**, 26(3), 389-399.
- ANDERSEN, K. M. & TURNER, B. L. (2013). Preferences or plasticity in nitrogen acquisition by understorey palms in a tropical montane forest. **Journal of Ecology**, 101(3), 819-825.
- ASHTON, I. W.; MILLER, A. E.; BOWMAN, W. D.; SUDING, K. N. (2008). Nitrogen preferences and plant-soil feedbacks as influenced by neighbors in the alpine tundra. **Oecologia**, 156(3), 625-636.
- BATISTA C. U. N.; MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; MEDRI, C.; PIMENTA, J. A. (2008). Flood tolerance in *Cecropia pachystachya* Trécul. (Cecropiaceae): ecophysiological and morpho-anatomical aspects. **Acta Botanica Brasilica**, 22(1), 91-98.
- BLOOM, A. J. (1997). Nitrogen as a limiting factor: Crop acquisition of ammonium and nitrate. In: JACKSON, L.E. (ed). **Ecology in Agriculture**. San Diego, Academic Press, 145-172.
- BLOOM, A. J.; BURGER, M.; ASENSIO, J. S. R.; COUSINS, A. B. (2010). Carbon dioxide enrichment inhibits nitrate assimilation in wheat and Arabidopsis. **Science**, 328(5980), 899-903.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72(1-2), 248-254.
- BRITTO, D.T.; SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D.; KRONZUCKER, H. J. (2001). Futile transmembrane NH<sub>4</sub><sup>+</sup> cycling: a cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 98(7), 4255-4258.

BRITTO, D. T. & KRONZUCKER, H. J. (2002).  $\text{NH}_4^+$  toxicity in higher plants: a critical review. **Journal of Plant Physiology**, *159*(6), 567-584.

BRITTO, D. T. & KRONZUCKER, H. J. (2013). Ecological significance and complexity of N-source preference in plants. **Annals of botany**, *112*(6), 957-963.

CALZAVARA, A. K.; BIANCHINI, E.; MAZZANATTI, T.; OLIVEIRA, H. C.; PIMENTA, J. A. (2015). Morphoanatomy and ecophysiology of tree seedlings in semideciduous forest during high-light acclimation in nursery. **Photosynthetica**, *53*(4), 597-608.

CAMPOS, M. M. S. (2009). **Ecofisiologia de uso do N em espécies arbóreas da Floresta Ombrófila Densa das Terras Baixas, Ubatuba, SP**. Tese de doutorado, Instituto de Botânica, São Paulo.

CRAWFORD, R. M. M. (1982). Physiological responses to flooding. **Physiological plant ecology II**, 453-477. Springer Berlin Heidelberg.

DAVIDSON, E. A.; KELLER, M.; ERICKSON, H. E.; VERCHOT, L. V.; VELDKAMP, E. (2000). Testing a conceptual model of soil emissions of nitrous and nitric oxides. **Biosciences**, *50*(8), 667-680.

DECHORGNAT, J.; NGUYEN, C. T.; 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. **Journal of Experimental Botany**, *62*(4), 1349-1359.

DIAS, T.; CLEMENTE, A.; MARTINS-LOUÇÃO, M. A.; SHEPPARD, L.; BOBBINK, R.; CRUZ, C. (2014). Ammonium as a driving force of plant diversity and ecosystem functioning: observations based on 5 years manipulation of N dose and form in a Mediterranean ecosystem. **PloS One**, *9*(4), 92517.

FOYER, C. H.; FERRARIO-MERY, S.; NOCTOR, G. (2001). Interactions between carbon and nitrogen metabolism. **Plant Nitrogen**, 237-254. Springer Berlin Heidelberg

FREITAS, L. D. (2015). **Estratégias de uso do nitrogênio por mudas de *Heliocarpus popayanensis* KUNTH e *Cariniana estrellensis* (RADDI) KUNTZE**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

GUO, S.; ZHOU, Y.; GAO, Y.; LI, Y.; SHEN, Q. (2007a) New insights into the nitrogen form effect on photosynthesis and photorespiration, **Pedosphere**, 17(5), 601-610.

GUO, S.; ZHOU, Y.; SHEN, Q.; ZHANG, F. (2007b). Effect of ammonium and nitrate nutrition on some physiological processes in higher plants-growth, photosynthesis, photorespiration, and water relations. **Plant Biology**, 9(01), 21-29.

HAGEMAN, R. H. & REED, A. J. (1980). Nitrate reductase from higher plants. **Methods in enzymology**, 69, 270-280.

HARRISON, K. A.; BOL, R.; BARDGETT, R. D. (2007). Preferences for different nitrogen forms by coexisting plant species and soil microbes. **Ecology**, 88(4), 989-999.

INOCENCIO, L. M. S. (2014). **Efeito de diferentes fontes inorgânicas de nitrogênio em mudas de espécies arbóreas tropicais**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Estadual de Londrina, 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. **Journal of Experimental Botany**, 60(15), 4335-4345.

KELLER, L.; LELES, P. S. D. S.; OLIVEIRA NETO, S. N.; COUTINHO, R. P.; NASCIMENTO, D. F. (2009). Sistema de blocos prensados para produção de mudas de três espécies arbóreas nativas. **Revista Árvore**, 33(2), 305-314.

KRAISER, T.; GRAS, D. E.; GUTIÉRREZ, A. G.; GONZÁLEZ, B.; GUTIÉRREZ, R. A. (2011). A holistic view of nitrogen acquisition in plants. **Journal of Experimental Botany**, 62(4), 1455-1466.

KRAPP, A. (2015). Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces. **Current Opinion in Plant Biology**, 25, 115-122.

KRONZUCKER, H. J.; SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D. (1997). Conifer root discrimination against soil nitrate and the ecology of forest succession. **Nature**, 385(6611), 59-61.

KRONZUCKER, H. J.; SIDDIQI, M. Y., GLASS, A. D. M.; BRITTO, D. T. (2003). Root ammonium transport efficiency as a determinant in forest colonization patterns: an hypothesis. **Physiol. Plantarum**, 117(2), 164-170.

KUSANO, M.; FUKUSHIMA, A.; REDESTIG, H.; SAITO, K. (2011). Metabolomic approaches toward understanding nitrogen metabolism in plants. **Journal of Experimental Botany**, 62(4), 1439-1453.

LORENZI, H. (2002). **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 368 p.

MCCULLOUGH, H. (1967). The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. **Clínica chimica acta**, 17(2), 297-304.

MILLER, A. J. & CRAMER, M. D. (2004). Root nitrogen acquisition and assimilation. **Plant and Soil**, 274, 1-36.

MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric Oxide**, 5(1), 62-71.

MOSSRI, B. B. (1997). **Germinação e crescimento inicial de *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (Hayne) Lee & Lang. E *Cecropia pachystachya* Trec.: duas espécies de níveis sucessionais diferentes de mata de galeria**. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade de Brasília, Brasília.

MURCHIE, E. H. & LAWSON, T. (2013). Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. **Journal of experimental botany**, 64(13), 3983-3998.

OLIVEIRA, H. C. & SODEK, L. (2013). Effect of oxygen deficiency on nitrogen assimilation and amino acid metabolism by soybean root segments. **Amino Acids**, 44(2), 743-755.

OLIVEIRA, H. C.; FRESCHI, L.; SODEK, L. (2013). Nitrogen metabolism and translocation in soybean plants subjected to root oxygen deficiency. **Plant Physiol. Biochem**, 66, 141-149.

PEREIRA-SILVA, E. F. L. (2008). **Estratégias ecofisiológicas no uso de nitrogênio em espécies arbóreas de floresta ombrófila densa submontana e estacional semidecidual, SP**. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

PORRA, R.J. (2002). The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. **Photosynthesis Research**, 73(1-3), 149-156.

RASCHER, U.; LIEBIG, M.; LÜTTGE, U. (2000). Evaluation of instant light-response curves of chlorophyll fluorescence parameters obtained with a portable chlorophyll fluorometer on site in the field. **Plant, Cell & Environment**, 23(12), 1397-1405.

SARASKETA, A.; GONZÁLEZ-MORO, M. B.; GONZÁLEZ-MURUA, C.; MARINO, D. (2016). Nitrogen source and external medium pH interaction differentially affects root and shoot metabolism in Arabidopsis. **Frontiers in plant science**, 7, 29-29.

SCHIMANN, H.; PONTON, S.; HATTENSCHWILER, S.; FERRY, B.; LENS, R.; DOMENACH, A. M.; ROGGY, J. C. (2008). Differing nitrogen use strategies of two tropical rainforest late successional tree species in French Guiana: evidence from  $^{15}\text{N}$  natural abundance and microbial activities. **Soil Biology and Biochemistry**, 40(2), 487-494.

SCHMIDT, S. & STEWART, G. R. (1998). Transport, storage and mobilization of nitrogen by trees and shrubs in the wet/dry tropics of northern Australia. **Tree Physiology**, 18(6), 403-410.

SCHMIDT, S.; STEWART, G. R.; TURNBULL, M. H.; ERSKINE, P. D.; ASHWATH, N. (1998). Nitrogen relations of natural and disturbed communities in tropical Australia. **Oecologia**, 117(1-2), 95-104.

SILVA, J. G. (2012). **Ecofisiologia do uso de nitrogênio em espécies arbóreas da Floresta Ombrófila Densa, Caraguatatuba, SP**. Dissertação (Mestrado em botânica) - Instituto de Botânica/SMA, São Paulo.

SMIRNOFF, N. & STEWART, G. R. (1985). Nitrate assimilation and translocation by higher plants: comparative physiology and ecological consequences. **Physiologia Plantarum**, *64*(2), 133-140.

SMITH, J. L. & RICE, E. L. (1983). Differences in nitrate reductase activity between species of different stages in old field succession. **Oecologia**, *57*(1-2), 43-48.

STEWART, G. R.; POPP, M.; HOLZAPFEL, I.; STEWART, J. A.; DICKIE-ESKEW, A. N. N. (1986). Localization of nitrate reduction in ferns and its relationship to environment and physiological characteristics. **New phytologist**, *104*(3), 373-384.

STEWART, G. R.; HEGARTY, E. E.; SPECHT, R. L. (1988). Inorganic nitrogen assimilation in plants of Australian rainforest communities. **Physiologia Plantarum**, *74*(1), 26-33.

STEWART, G. R.; JOLY, C. A.; 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*(4), 511-517.

STEWART, G. R.; PATE, J. S.; UNCKOVICH, M. (1993). Characteristics of inorganic nitrogen assimilation of plants in fire-prone Mediterranean-type vegetation. **Plant, Cell and Environment**, *16*(4), 351-363.

SUBBARAO, G. V.; RONDON, M.; ITO, O.; ISHIKAWA, T.; RAO, I. M.; NAKAHARA, K.; BERRY, W. L. (2007). Biological nitrification inhibition (BNI) – is it a widespread phenomenon? **Plant and Soil**, *294*(1-2), 5-18.

WANG, L. & MACKO, S. A. (2011). Constrained preferences in nitrogen uptake across plant species and environments. **Plant, Cell and Environment**, *34*(3), 525-534.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C.; RICKETTS, R. E. (1955). The determination of amino acid with ninhydrin. **Analyst**, *80*(948), 209-214.

## CAPÍTULO 2

**Avaliação ecofisiológica de mudas de *Cecropia pachystachya* Trécul (pioneira) e *Eugenia brasiliensis* Lam. (não-pioneira) em interação com *Brachiaria decumbens* Stapf**

Ligia Maria Inocência da Silva<sup>1</sup>, Halley Caixeta de Oliveira<sup>2</sup> e Renata Stolf Moreira<sup>2</sup>

**Revista a ser submetida**

**Plant Physiology**

**Avaliação ecofisiológica de mudas de *Cecropia pachystachya* Trécul (pioneira) e *Eugenia brasiliensis* Lam. (não-pioneira) em interação com *Brachiaria decumbens* Stapf**

**Resumo**

Um dos principais desafios a ser vencido no processo de restauração de ambientes degradados é o estabelecimento de mudas em áreas ocupadas por espécies de gramíneas invasoras. Estas gramíneas são altamente agressivas, podendo prejudicar o crescimento de espécies nativas em função da elevada competição por recursos e pela ação alelopática. Este estudo teve como objetivo verificar o efeito causado pela alelopátia e pela competição de *Brachiaria decumbens* Stapf no metabolismo, no crescimento e na fisiologia de mudas de duas espécies de diferentes estágios sucessionais utilizadas em reflorestamentos da Mata Atlântica: *Cecropia pachystachya* Trécul (pioneira) e *Eugenia brasiliensis* Lam. (não-pioneira). Além disso, pretendeu-se comprovar que *B. decumbens* inibe a taxa de nitrificação do solo (TNS). As mudas das espécies arbóreas foram cultivadas em solo fértil na presença (cultivo simultâneo: tratamento B) ou ausência (controle: C) de braquiária, além do cultivo com suplementação de exsudados das raízes de *B. decumbens* em solo previamente cultivado com esta gramínea (cultivo prévio + exsudado das raízes: tratamento AL). *C. pachystachya* teve seus parâmetros fisiológicos, seu crescimento e seu metabolismo afetados quando expostos ao tratamento AL, apresentando uma baixa concentração de nitrato e amônio nas raízes e uma reduzida assimilação em aminoácidos, devido aos efeitos causados pelos aleloquímicos que inibiram a absorção de nutrientes. Diferentemente, as mudas de *E. brasiliensis* se mostraram pouco sensíveis aos aleloquímicos, não demonstrando redução na absorção de N. Quando cultivadas juntas com *B. decumbens*, ambas as espécies arbóreas tiveram seus parâmetros fisiológicos e seu crescimento reduzidos, o que deve estar relacionado à competição por nutrientes em adição ao efeito alelopático ao qual estas mudas estavam expostas. A concentração de nitrato e amônio nas raízes, assim como a assimilação em aminoácidos, foi reduzida nas duas espécies, uma vez que a disponibilidade de N no solo foi afetada pela presença da gramínea. Na presença de *B. decumbens* ocorreu redução da TNS, confirmando o efeito alelopático indireto de *B. decumbens* no solo. Já no tratamento AL, somente o solo de cultivo das mudas de *E. brasiliensis* apresentou uma redução da TNS, sugerindo que este efeito depende da interação entre os aleloquímicos e a espécie alvo.

**Palavras-chave:** braquiária; aleloquímicos; competição; metabolismo do nitrogênio; nitrificação; *Urochloa decumbens*.

**Echophysiological evaluation of seedlings of *Cecropia pachystachya* Trécul (pioneer) and *Eugenia brasiliensis* Lam. (non-pioneer) interacting with *Brachiaria decumbens* Stapf**

**Abstract**

One of the main challenges to overcome in the restoration of degraded environments is related to the establishment of seedlings in areas occupied by invasive grasses. Such grasses are highly aggressive, and may hamper the growth of native tree species through intense competition for resources as well as by allelopathic activity. This study aimed to verify the effect caused by allelopathy and the competition of *Brachiaria decumbens* Stapf on the metabolism, growth and physiology of seedlings of two species of different successional stages used in Atlantic Forest reforestation: *Cecropia pachystachya* Trécul (pioneer) and *Eugenia Brasiliensis* Lam. (non-pioneer). In addition, it was intended to prove that *B. decumbens* inhibits the soil nitrification rate (SNR). The seedlings of both tree species were cultivated in fertile soil in the presence (simultaneous cultivation: treatment B) or absence (control: C) of the grass, besides cultivation with *B. decumbens* root exudates in a soil previously cultivated with this grass (previous cultivation + root exudate: treatment AL). *C. pachystachya* had its physiological parameters, its growth and its metabolism compromised when exposed to the AL treatment, presenting a low concentration of nitrate and ammonium in the roots and a reduced assimilation into amino acids, due to the effects caused by the allelochemicals, which probably inhibited the absorption of nutrients. Differently, *E. brasiliensis* seedlings were less sensitive to allelochemicals, since no depletion of N metabolites was detected. When cultivated together with *B. decumbens*, both tree species had their physiological parameters and their growth reduced, which could be related to the competition for nutrients in addition to the allelopathic effect to which these seedlings were exposed. The concentration of nitrate and ammonium in the roots, as well as the assimilation into amino acids, was reduced in the two tree species, since the N availability in the soil was affected by the presence of the grass. In the presence of *B. decumbens* there was a reduction in SNR, confirming the indirect allelopathic effect of *B. decumbens*. In the AL treatment, only the soil where *E. brasiliensis* seedlings was grown presented a reduction in the SNR, suggesting that this effect depends on the interaction between the allelochemicals and the target species.

**Keywords:** grass; allelochemicals; competition; nitrogen metabolism; nitrification; *Urochloa decumbens*.

## Introdução

A recuperação de ambientes ocupados por espécies de *Brachiaria* é um dos principais desafios a ser vencido no processo de restauração de ambientes degradados, devido ao baixo sucesso no estabelecimento de mudas arbóreas nessas áreas ocupadas (TOLEDO *et al.*, 1999, 2000; COSTA *et al.*, 2002). Essas gramíneas exóticas, como *Brachiaria decumbens* Stapf (Poaceae) [*Urochloa decumbens* (Stapf) R.D.Webster é um sinônimo desta espécie, segundo o banco de dados The Plant List: [www.theplantlist.org](http://www.theplantlist.org)], comumente invadem áreas de pastagens abandonadas e limitam o crescimento de espécies arbóreas nativas devido à sua elevada agressividade, intensa capacidade de produção e longevidade de sementes (COSTA *et al.*, 2002). Além dessas características, a alta competitividade e persistência apresentada pela maioria das espécies invasoras também envolve a indução de alterações no ciclo do N (EHRENFELD, 2003; CORBIN e D'ANTONIO, 2004).

A principal forma de interferência destas gramíneas invasoras sobre as espécies florestais é a competição por recursos essenciais para o crescimento e desenvolvimento das árvores, como nutrientes, água, luz, oxigênio e gás carbônico (DONALD 1963; PITELI *et al.*, 1988). A alelopátia, um tipo de interação bioquímica entre vegetais e microorganismos (LOVETT & RYUNTYU, 1992) através da liberação de aleloquímicos (FERREIRA & AQUILA, 2000), é considerada outro fator responsável pela dominância das plantas invasoras (FERREIRA *et al.*, 2008)

A ação conjunta de vários aleloquímicos é o que geralmente resulta na alelopátia (EINHELLING, 1999). Uma vez liberados para o ambiente, os aleloquímicos podem causar efeitos indiretos, como alterações nas propriedades do solo e na população e/ou atividade de microorganismos, e efeitos diretos nas plantas (JOHN & SARADA, 2012), como alterações no crescimento e no metabolismo (RIZVI *et al.*, 1992), incluindo modificações no funcionamento de membranas e na absorção de nutrientes, além de alterações nos níveis de fitormônios, na fotossíntese e na respiração (RICE, 1984; RIZVI *et al.*, 1992). A alelopátia pode influenciar a sucessão secundária, a estrutura de comunidades vegetais, assim como a dominância de algumas espécies vegetais, o que pode afetar a biodiversidade local (CHOU *et al.*, 1986; RIZVI *et al.*, 1992; REIGOSA *et al.*, 1999).

Alguns estudos relataram a atividade alelopática de *B. decumbens* sobre várias espécies, como o comprometimento do crescimento de plantas cultivadas em solo com histórico de ocupação por essa gramínea (SOUZA *et al.*, 2006). Além disso, foi verificado que o extrato metanólico de folhas de *B. decumbens* inibe o crescimento de plântulas, sugerindo que esta espécie invasora possui substâncias com atividade alelopática direta

(KOBAYASHI & KATO-NOGUCHI, 2015). Um dos aleloquímicos identificados por espectrometria, o (6R,9S)-3-oxo- $\alpha$ -ionol, foi apontado como contribuinte para a alelopatia direta causada pelo extrato de folhas de *B. decumbens* (KOBAYASHI & KATO-NOGUCHI, 2015). No entanto, não há registros do isolamento e da identificação de aleloquímicos com efeito direto proveniente do exsudato das raízes de *B. decumbens*, o que torna evidente a necessidade de estudos relacionado às raízes.

O composto mais abundantemente exsudado por raízes de *Brachiaria* spp., denominado brachialactona, apresenta capacidade de inibir as vias da mono-oxigenase e da hidroxilamina oxidorreductase em *Nitrosomonas* spp. (SUBBARAO *et al.*, 2009), envolvidas na oxidação do amônio. O decréscimo da nitrificação biológica, causada pela liberação da brachialactona, resulta na queda dos níveis de nitrato e no aumento dos níveis de amônio no solo (SUBBARAO *et al.*, 2007, 2009). Em um estudo realizado nas savanas australianas por Rossiter-Rachor *et al.* (2009), foi observado que outra gramínea de origem africana, *Andropogon gayanus*, inibiu a nitrificação e provocou deficiência de nitrato no solo, o que prejudicou o crescimento de gramíneas nativas que são adaptadas ao uso de nitrato, enquanto *A. gayanus* foi favorecida por ter grande capacidade de utilização de amônio (ROSSITER-RACHOR *et al.*, 2009).

Variações na característica do solo, como o acúmulo de amônio, decorrente da invasão por *Brachiaria* no ambiente (SUBBARAO *et al.*, 2009), assim como por *A. gayanus* (ROSSITER-RACHOR *et al.*, 2009), poderiam refletir numa mudança no padrão da sucessão ecológica e no crescimento de espécies arbóreas com diferentes estratégias de uso do N. Áreas florestais degradadas ou áreas de cultivo agrícola abandonadas apresentam um predomínio de nitrato no solo (BRADLEY, 2001), diferente das pastagens invadidas por *Brachiaria* que acumulam amônio (SUBBARAO *et al.*, 2009), característica típica de estágios sucessionais mais tardios (KRONZUCKER *et al.*, 2003). Os resultados destes estudos sugerem que o desempenho de espécies com maior capacidade de utilização de amônio seria menos afetado, diferente daquelas adaptadas ao uso de nitrato, que seriam fortemente prejudicadas pela braquiária.

Um estudo em casa de vegetação relatou que mudas de espécies pioneiras apresentaram maior comprometimento de seu desenvolvimento quando cultivadas juntamente com *Brachiaria brizantha*, em comparação com as mudas de espécies não-pioneiras. Esse maior comprometimento do desenvolvimento das espécies pioneiras foi relacionado à menor capacidade de competição por recursos na presença da braquiária, devido ao menor diâmetro das raízes apresentadas pelas espécies pioneiras (RONDINA *et al.*, 2014). Já para as espécies

de fim de sucessão, a alta densidade e o maior diâmetro da raiz garantem uma menor sensibilidade ao cultivo simultâneo com gramíneas exóticas (ZANGARO *et al.*, 2016).

Estudos que testem a menor sensibilidade das espécies não-pioneiras à atividade alelopática por gramíneas não foram registrados. Portanto, é essencial verificar quais efeitos as alterações nas relações de N do solo induzidas por *Brachiaria* teriam sobre as mudas de espécies arbóreas pioneiras e não-pioneiras. Um melhor entendimento desses mecanismos será crucial para o desenvolvimento de práticas de manejo de ecossistemas invadidos por *Brachiaria* e aumentar o sucesso de programas de reflorestamento nessas áreas.

Este estudo teve como objetivo demonstrar os efeitos causados pelo cultivo simultâneo e pela interação com exsudatos de raiz de *B. decumbens* em mudas de espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica, uma pioneira: *Cecropia pachystachya* Trécul (Urticaceae), e uma não-pioneira: *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae), a partir de análises metabólicas, morfológicas e fisiológicas. Além disso, pretendeu-se confirmar o efeito causado por *B. decumbens* na nitrificação biológica no solo. Considerando que a caracterização dos efeitos causados pela alelopátia e pela competição de *B. decumbens* sobre as mudas nativas é importante, foram levantadas três hipóteses: 1- Mudas da espécie pioneira são mais afetadas negativamente pelos aleloquímicos exsudados pelas raízes de *B. decumbens*, em comparação com mudas não-pioneiras. 2- Quando cultivadas juntamente com *B. decumbens*, as mudas de *C. pachystachya* são mais prejudicadas do que as de *E. brasiliensis*. 3- Devido à alelopátia, a gramínea invasora diminui a taxa de nitrificação do solo, e favorece as espécies que utilizam amônio como fonte preferencial de N.

## **Material e Métodos**

### ***Local de estudo***

A parte experimental e as análises fisiológicas deste estudo foram desenvolvidas no viveiro de mudas pertencentes ao Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas (LABRE) e em casa de vegetação pertencentes ao Departamento de Biologia Animal e Vegetal da Universidade Estadual de Londrina (UEL) durante o período de janeiro a novembro de 2015. As análises morfológicas e metabólicas foram realizadas no Laboratório de Ecofisiologia Vegetal da UEL.

### ***Espécies de plantas***

Foram utilizadas duas espécies arbóreas empregadas em programas de reflorestamento desenvolvidos pelo viveiro do LABRE da UEL, além de uma espécie de

gramínea. As espécies arbóreas pertencem a grupos ecológicos distintos, uma representando a fase inicial da sucessão, *C. pachystachya* (Embaúba-do-brejo), uma espécie pioneira (intolerante à sombra), e outra representando a fase final da sucessão, *E. brasiliensis* (Grumixama), uma espécie não-pioneira (tolerante à sombra).

*C. pachystachya* é uma espécie muito importante na regeneração de áreas degradadas, uma vez que coloniza clareiras rapidamente, atrai animais dispersores e melhora as propriedades do solo, o que propicia condições mais favoráveis ao estabelecimento de outras espécies (MOSSRI, 1997). *E. brasiliensis* apresenta desenvolvimento lento, é perenifólia e seletiva higrófita, característica de mata pluvial atlântica (LORENZI, 2002).

A espécie exótica de gramínea utilizada foi a *B. decumbens* (braquiária), uma espécie do leste da África, de porte baixo com alta capacidade de aclimação (CRISPIM & BRANCO, 2002), introduzida no Brasil em 1950 graças a sua alta palatabilidade para bovinos, produtividade e resistência (KISSMANN, 1997). É considerada uma das espécies de plantas invasoras mais importantes em áreas de reflorestamento, uma vez que é altamente agressiva e competitiva, apresentando intensa capacidade de produção e longevidade de sementes (COSTA *et al.*, 2002).

As sementes das plantas arbóreas utilizadas nos experimentos foram coletadas no período de outubro a dezembro de 2014. As sementes da gramínea *B. decumbens*, cultivar Basillisk, foram obtidas comercialmente. As sementes de *C. pachystachya* foram coletadas na Mata São José, Ibiaci/ PR, e as sementes de *E. brasiliensis* foram coletadas no campus da UEL. As sementes de *C. pachystachya* e *B. decumbens* foram devidamente identificadas e armazenadas em geladeira com temperatura aproximada de 5 °C até a sementeira. As sementes de *E. brasiliensis* foram imediatamente semeadas após a coleta, uma vez que não podem ser armazenadas.

### ***Crescimento inicial e condições de cultivo***

Foi utilizada uma mistura de solo fértil, areia e vermiculita (2:1:1, v/v/v) para verificação do efeito do cultivo da braquiária sobre as mudas nativas. O solo fértil foi coletado na UEL, caracterizado como Latossolo Vermelho eutrófico (EMBRAPA, 1999), enquanto a areia e a vermiculita expandida foram obtidas comercialmente.

Inicialmente, a mistura de solo fértil foi distribuída em 54 vasos plásticos de 1000 cm<sup>3</sup>. As sementes de *B. decumbens* foram diretamente germinadas em dois terços dos recipientes (36 vasos), estes foram irrigados diariamente com água e quinzenalmente com 50 ml de solução nutritiva (Tabela 1), após 15, 30 e 45 dias da sementeira. Depois de um período

de aproximadamente 60 dias de desenvolvimento da braquiária, os indivíduos desta espécie foram retirados de metade dos recipientes (18 vasos). Os 18 vasos em que os indivíduos de braquiária foram retirados (cultivo prévio) foram utilizados como o tratamento com aleloquímicos liberados pela gramínea durante o período em que foi cultivada naquele solo (tratamento AL). Os 18 vasos em que os indivíduos de *B. decumbens* foram mantidos foram utilizados para o tratamento de cultivo simultâneo (tratamento B). Os demais 18 vasos que não foram semeados com a braquiária foram utilizados como controle, sem braquiária (C). Assim, houve, para cada espécie arbórea nativa, três tratamentos: 1) controle (C); 2) cultivo prévio/aleloquímicos (AL) e 3) cultivo simultâneo/braquiária (B).

As sementes das espécies arbóreas foram semeadas em areia e mantidas em viveiro, por aproximadamente 60 dias, com irrigação diária. Plântulas das espécies nativas, com o primeiro par de folhas totalmente expandido, foram transferidas da areia para recipientes plásticos individuais de 0,6 L contendo a mistura de solo fértil, areia e vermiculita. Após o transplante, as mudas foram mantidas por 60 dias em viveiro com irrigação periódica, a fim de atingirem maior tamanho para então serem transplantadas para os vasos contendo solo fértil. Nos dias 0, 20 e 40 após o 1º transplante para os recipientes plásticos utilizados para formação de mudas arbóreas, as mudas foram suplementadas com 10 ml de solução nutritiva (Tabela 1) diluída 4 vezes, acrescida de KNO<sub>3</sub> 4 mM.

### ***Montagem do experimento***

Os 18 vasos utilizados para o tratamento AL foram preparados a partir dos vasos onde *B. decumbens* foi cultivada por  $\pm$  60 dias, removendo-se completamente as plantas (raízes e PA); entretanto, aleloquímicos liberados pela gramínea foram mantidos no solo. As raízes dos indivíduos de braquiária retirados dos vasos foram lavadas com cuidado e mantidas imersas em um balde com água, para coleta dos exsudados (item abaixo). Para o tratamento B, foi feita uma coroa no solo retirando somente as gramíneas do centro do vaso, onde as mudas nativas foram transplantadas, totalizando 9 vasos para cada espécie arbórea contendo braquiária. As mudas de *C. pachystachya* e *E. brasiliensis*, com aproximadamente 20 e 15 cm de altura de parte aérea (PA), respectivamente, presentes nos recipientes plásticos, com 60 dias após a o 1º transplante, foram transferidas para os vasos fazendo um orifício de 15 cm de profundidade no solo, onde foram submetidas ao cultivo livre de *B. decumbens* (C), e aos tratamentos AL e B.

**Tabela 1.** Composição da solução nutritiva padrão utilizada na rega do solo fértil em que foram cultivados os indivíduos de *Brachiaria decumbens* e as mudas de *Cecropia pachystachya* e *Eugenia brasiliensis*.

Sal	Concentração final (mM)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8,00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,00
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8,00
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,00
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	8,00
FeSO <sub>4</sub> -EDTA	0,4
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,37
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,072
ZnCl <sub>2</sub>	0,006
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,002
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,0026

Os vasos dos diferentes tratamentos foram regados semanalmente com 50 ml de solução nutritiva (Tabela 1), a fim de garantir que os efeitos do tratamento AL não fossem causados pelo esgotamento de nutrientes do solo. Uma vez por semana, os vasos do tratamento AL foram regados com 80 ml da solução aquosa contendo exsudato de raízes da gramínea com aleloquímicos, a fim de garantir a estas mudas o contato constante com esses compostos. Quando necessário, todas as mudas foram regadas com água a fim de evitar o dessecamento.

Foram feitas nove repetições para cada tratamento em cada espécie nativa, totalizando 54 vasos. Todos os vasos com as mudas foram distribuídos aleatoriamente e mantidos em casa de vegetação, por aproximadamente 60 dias. As avaliações dos parâmetros metabólicos, fisiológicos e morfológicos foram realizadas no final do experimento.

#### ***Obtenção dos exsudados das raízes de B. decumbens, tratamento AL***

Raízes das plantas de *B. decumbens* mantidas em água, previamente retiradas dos vasos com solo fértil, foram transferidas para 9 frascos opacos preenchidos com 500 ml de solução nutritiva (Tabela 1) diluída 4 vezes. Os frascos foram aerados periodicamente e completados com água quando necessário.

Semanalmente, as plantas de braquiária foram transferidas dos frascos de hidroponia, durante 24 horas, para outros frascos de vidro opacos, também aerados, contendo 180 ml de solução de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 mM, a fim de estimular a exsudação dos aleloquímicos, principalmente a brachialactona, pelas raízes da braquiária a partir da presença de amônio na solução (SUBBARAO *et al.*, 2007). Após esse período, as plantas de braquiária foram

transferidas de volta para os frascos de hidroponia contendo solução nutritiva nova completa. As soluções de todos os frascos contendo exsudato foram misturadas em um recipiente maior, e então as mudas do tratamento AL de ambas as espécies foram regadas com 80 ml dessa solução de exsudato por vaso. As mudas do tratamento B e do C foram regadas uma vez por semana com 40 mL da solução de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,5 mM, menor quantidade do que as do tratamento AL para eliminar a diferença de concentração de amônio nos tratamentos, devido à absorção pela gramínea nestas 24 horas de estímulo à exsudação de aleloquímicos pelas raízes.

### ***Análises de crescimento***

Foram avaliados os seguintes parâmetros morfológicos: comprimento da raiz e da PA (em cm); área foliar total (em  $\text{cm}^2$ ) utilizando-se de um integrador de área foliar portátil, modelo LI-3000C (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA); massa seca (MS) da raiz e da PA (em g) e taxa de crescimento relativo (TCR) da raiz e da PA (em  $\text{mg g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ). Para a determinação da MS, os componentes das mudas foram separados, acondicionados em sacos de papel e secos em estufa à temperatura de  $60^\circ\text{C}$  por quatro dias até atingirem peso constante.

A TCR foi calculada utilizando a equação  $\ln\text{MSf} - \ln\text{MSi}/t$ , em que MSf = massa seca final, MSi = massa seca inicial e t = representa o tempo de duração do experimento. A MSi foi obtida no dia zero do experimento, antes de as mudas serem submetidas aos tratamentos, determinando-se a média da MS da raiz e da PA de sete indivíduos de cada espécie.

### ***Análises das trocas gasosas***

Foram determinadas as taxas de fotossíntese líquida (A), condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração (E) e concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  (Ci). A eficiência instantânea de carboxilação (k) foi calculada através da razão  $A/C_i$  multiplicada por 10,75. As análises de trocas gasosas foram realizadas entre 8 e 10 h, utilizando-se um analisador portátil de gás por infravermelho (Irga) modelo LICOR 6400 XT (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) conectado a uma câmara de  $6 \text{ cm}^2$ . A densidade de fluxo fotônico fotossintético (PPFD) ideal para as análises foi de  $1.900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , conforme estudo prévio (CALZAVARA *et al.*, 2015), e o fluxo de  $400 \text{ mL min}^{-1}$ .

### ***Análises de fluorescência da clorofila***

Os parâmetros de fluorescência da clorofila foram medidos na superfície adaxial da epiderme da folha, utilizando um fluorômetro OS1p (Opti-Sciences, Hudson, NH, EUA). A eficiência máxima do fotossistema II, expresso como  $F_v / F_m = (F_m - F_0) / F_m$  (MURCHIE & LAWSON, 2013), foi medida entre 8 e 10h. Após 20 min de adaptação ao escuro, mediu-se a fluorescência mínima ( $F_0$ ) utilizando uma luz fraca modulada e determinou-se a fluorescência máxima ( $F_m$ ) com um pulso de luz saturante de 0,8 s de  $8.250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### ***Extração e análise dos metabólitos primários***

Para a extração dos metabólitos, foram coletadas raízes finas e folhas novas completamente expandidas. As amostras foram maceradas em  $\text{N}_2$  líquido e os compostos de baixo peso molecular (aminoácidos,  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ ) foram extraídos com MCW (metanol:clorofórmio:água, 12:5:3, v/v/v) de acordo com o protocolo descrito por Oliveira & Sodek (2013). As proteínas foram extraídas a partir do resíduo resultante da extração com MCW através de agitação contínua com NaOH (0,1 M) durante 4 horas. Para a extração das clorofilas, as folhas foram maceradas no escuro em acetona 80% contendo carbonato de magnésio 0,05 % e o extrato foi centrifugado antes das análises (PORRA, 2002).

O nitrato foi determinado através da sua redução a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) pelo catalisador cloreto de vanádio, e o  $\text{NO}_2^-$  resultante foi detectado pelo reagente de Griess (sulfanilamida 1% em HCl 1,5 N seguida da adição de N- (naftil)-etilenodiamina 0,02 %) (MIRANDA *et al.*, 2001). O amônio foi quantificado pela leitura da absorbância a 625 nm após a reação de Berthelot (MCCULLOUGH, 1967). O conteúdo de proteínas e aminoácidos livres totais foi determinado espectrofotometricamente com o reagente Coomassie Blue (BRADFORD, 1976) e pela reação com ninhidrina (YEMM *et al.*, 1955), respectivamente. Os teores de clorofilas *a* e *b* foram determinados através da análise das absorbâncias em 646,6 e 663,6 nm e as concentrações dos pigmentos calculadas por meio das equações propostas por Porra (2002). Em todas as análises espectrofotométricas acima citadas, a leitura das absorbâncias foi realizada utilizando-se um espectrofotômetro Shimadzu UV-1203.

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

As raízes e as folhas foram coletadas e imediatamente utilizadas para a análise enzimática. A atividade da enzima NR foi determinada *in vivo* baseando-se no método proposto por Stewart *et al.* (1986). Amostras de raízes e folhas foram cortadas em segmentos e transferidas para seringas contendo o meio de reação ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,05 M pH 7,5; propanol 1%;  $\text{KNO}_3$  0,05 M). As seringas foram mantidas a temperatura ambiente sob vácuo (para a

infiltração do meio de reação nos tecidos) e no escuro e, após 40 minutos, uma alíquota do meio foi coletada para a dosagem do  $\text{NO}_2^-$ , formado a partir do substrato nitrato, utilizando-se o reagente de Griess (HAGEMAN & REED, 1980).

### ***Determinação da nitrificação biológica líquida no solo***

A análise da nitrificação biológica líquida no solo foi realizada conforme o protocolo proposto por Subbarao et al. (2007) com algumas modificações. Amostras de solo foram coletadas e deixadas secar naturalmente por aproximadamente quatro dias ao ar. Após seco, incubaram-se em frascos plásticos 10 g de solo peneirado com 364  $\mu\text{L}$  de solução de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (23,6 g/L), de forma a fornecer 182  $\mu\text{g N g}^{-1}$  de solo seco. A umidade do solo foi mantida a 60% da capacidade de campo (SUBBARAO *et al.*, 2007). Os frascos foram incubados em um saco plástico úmido no escuro por dez dias em temperatura ambiente. Após dez dias de incubação, o N do solo foi extraído com 50 ml de KCl 2 M por uma hora. Após centrifugação e filtragem do sobrenadante, este foi utilizado para determinação dos níveis de nitrato através dos métodos analíticos citados no item referente à extração e análise dos metabólitos primários. A taxa líquida de nitrificação foi estimada como a diferença entre as concentrações final e inicial de nitrato nas amostras dividida pelo número de dias de incubação. A concentração inicial de nitrato foi obtida através da extração do solo no dia 0 da incubação do experimento.

### ***Análise estatística***

Nas duas espécies, os tratamentos foram dispostos de forma aleatória. Nove repetições foram utilizadas para as análises de crescimento e de trocas gasosas, enquanto quatro repetições foram utilizadas para as análises metabólicas. A normalidade e a homocedasticidade foram testadas, e quando necessário os dados foram transformados em log. Os dados foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) de um fator, para comparar o efeito dos tratamentos em cada espécie nativa. Posteriormente, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. Todas as análises estatísticas foram feitas no programa Statistica v. 10.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

## **Resultados**

### ***Análises de crescimento das mudas***

O comprimento da raiz foi menor nas mudas de *C. pachystachya* cultivadas simultaneamente com braquiária em relação ao controle (C). Já em *E. brasiliensis* o comprimento da raiz foi menor também nas mudas submetidas ao tratamento AL (Tabela 2).

O comprimento da PA de ambas as espécies nativas foram diminuídos quando estas foram submetidas aos tratamentos AL e B, sendo o menor valor observado no último tratamento. A área foliar das mudas de ambas as espécies foi diminuída, comparada com o controle, quando expostas aos tratamentos AL (*Cp* 63%, *Eb* 19%) (porcentagem de redução em relação ao C em cada espécie) e B (*Cp* 93%, *Eb* 80%), sendo as menores médias observadas no tratamento B (Tabela 2).

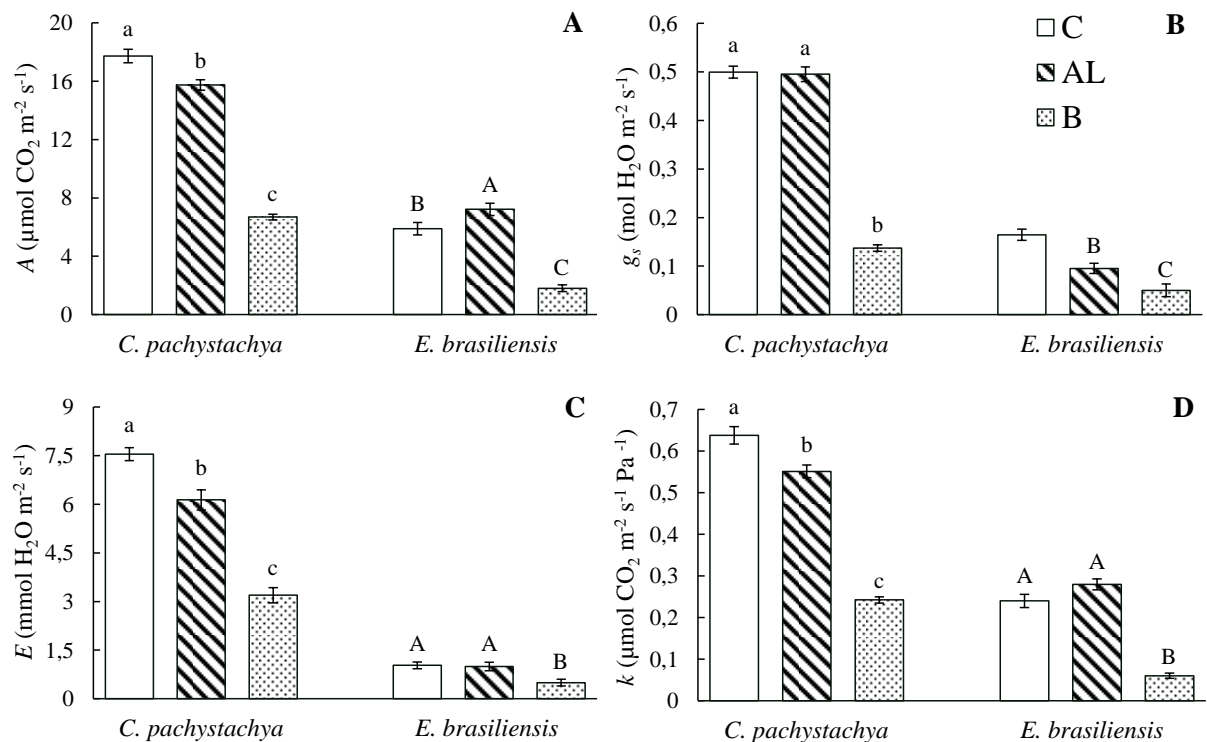
A TCR da raiz foi diminuída nas mudas tratadas com aleloquímicos (35%) e ainda mais reduzida naquelas do tratamento B (55%) na espécie pioneira. As mudas de *E. brasiliensis* do tratamento B apresentaram uma diminuição de 58% da TCR da raiz, comparada com o controle, ao passo que aquelas do tratamento AL não diferiram de C. A TCR da PA apresentou uma redução de 30% no tratamento AL e de 72% nas mudas do tratamento B, na espécie pioneira. Já para a espécie não-pioneira, a TCR da PA não apresentou diferenças quando tratadas com aleloquímicos, porém no tratamento B houve uma redução de 72% (Tabela 2).

**Tabela 2.** Médias e erros-padrão de parâmetros referentes ao crescimento de mudas de *Cecropia pachystachya* (*Cp*) e *Eugenia brasiliensis* (*Eb*) cultivadas em conjunto com *Brachiaria decumbens* (B), submetidas ao tratamento com aleloquímicos exsudados pelas raízes da gramínea (AL) ou sem tratamento (C: controle). As análises estatísticas envolveram somente comparações intraespecíficas. Letras minúsculas na linha comparam os tratamentos em *Cp*, assim como letras maiúsculas na linha comparam os tratamentos em *Eb*. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Variável	Espécie	Tratamento		
		C	AL	B
Comprimento da raiz (cm)	<i>Cp</i>	47,9 ± 1,30 a	46,4 ± 2,74 a	32,8 ± 1,96 b
	<i>Eb</i>	15,5 ± 0,339 A	12,5 ± 0,724 B	11,5 ± 1,06 B
Comprimento da PA (cm)	<i>Cp</i>	48,3 ± 0,778 a	24,7 ± 1,12 b	10,4 ± 0,496 c
	<i>Eb</i>	12,1 ± 0,233 A	10,8 ± 0,371 B	9,52 ± 0,245 C
Área foliar (cm <sup>2</sup> )	<i>Cp</i>	1385 ± 57,0 a	518 ± 13,4 b	99,6 ± 9,57 c
	<i>Eb</i>	84,7 ± 5,27 A	68,7 ± 3,62 B	17,4 ± 2,08 C
TCR da raiz (mg g <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> )	<i>Cp</i>	53,9 ± 1,31 a	35,2 ± 1,77 b	24,3 ± 2,99 c
	<i>Eb</i>	14,2 ± 1,13 A	11,9 ± 1,13 A	5,96 ± 2,61 B
TCR da PA (mg g <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> )	<i>Cp</i>	73,8 ± 0,785 a	51,1 ± 1,10 b	20,7 ± 2,80 c
	<i>Eb</i>	25,2 ± 0,925 A	22,2 ± 0,900 A	7,17 ± 1,20 B

### Análises fisiológicas das mudas

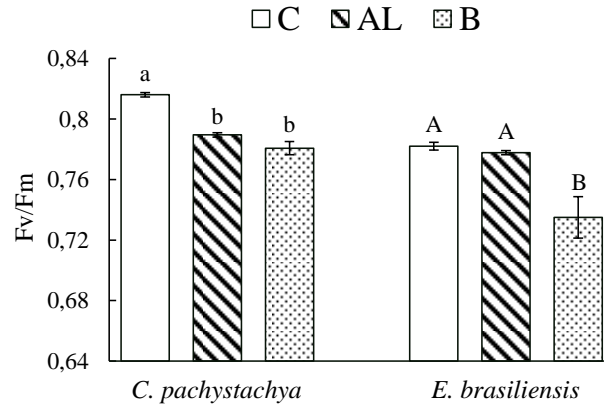
Comparadas com o controle, as mudas de *C. pachystachya* apresentaram uma redução de  $A$  nos tratamentos AL (11%) e B (62%), sendo menor no tratamento B. Já nas mudas da espécie não-pioneira, a  $A$  foi aumentada quando tratadas com aleloquímicos (22%) e diminuída quando cultivadas juntamente com a braquiária (69%) (Figura 1A). A  $g_s$  diminuiu apenas nas mudas de *C. pachystachya* submetidas ao tratamento simultâneo com *B. decumbens*. As mudas de *E. brasiliensis* apresentaram diferenças entre os três tratamentos, sendo os maiores valores de  $g_s$  observados nas mudas do controle, seguido pelo tratamento AL (Figura 1B). A  $E$  e a  $k$  foram diminuídas quando as mudas de *C. pachystachya* foram tratadas com aleloquímicos e a braquiária, sendo os menores valores observados no tratamento B. Diferentemente, para *E. brasiliensis* a  $E$  e  $k$  foram diminuídas apenas quando as mudas foram tratadas com braquiária (Figuras 1C, D).



**Figura 1.** Trocas gasosas foliares de mudas de *Cecropia pachystachya* e *Eugenia brasiliensis* cultivadas em conjunto com *Brachiaria decumbens* (B), submetidas ao tratamento com aleloquímicos exsudados pelas raízes da gramínea (AL) ou sem tratamento (C: controle). A- fotossíntese líquida ( $A$ ); B- condutância estomática ( $g_s$ ); C- transpiração ( $E$ ); e D- eficiência instantânea de carboxilação ( $k$ ). As análises estatísticas envolveram somente comparações intraespecíficas. Letras minúsculas comparam os tratamentos em *C. pachystachya*, assim como letras maiúsculas comparam os tratamentos em *E. brasiliensis*. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

A eficiência máxima do fotossistema II (obtida pelos valores de  $F_v/F_m$ ) das mudas de *C. pachystachya* foi diminuída nos tratamentos AL e B. Já em *E. brasiliensis* o

$F_v/F_m$  não apresentou diferenças quando as mudas foram tratadas com aleloquímicos, comparado com o controle, mas as mudas submetidas ao tratamento B tiveram uma diminuição deste parâmetro (Figura 2).



**Figura 2.** Eficiência máxima do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) de folhas de mudas de *Cecropia pachystachya* e *Eugenia brasiliensis* cultivadas em conjunto com *Brachiaria decumbens* (B), submetidas ao tratamento com aleloquímicos exsudados pelas raízes da gramínea (AL) ou sem tratamento (C: controle). As análises estatísticas envolveram somente comparações intraespecíficas. Letras minúsculas comparam os tratamentos em *C. pachystachya*, assim como letras maiúsculas comparam os tratamentos em *E. brasiliensis*. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

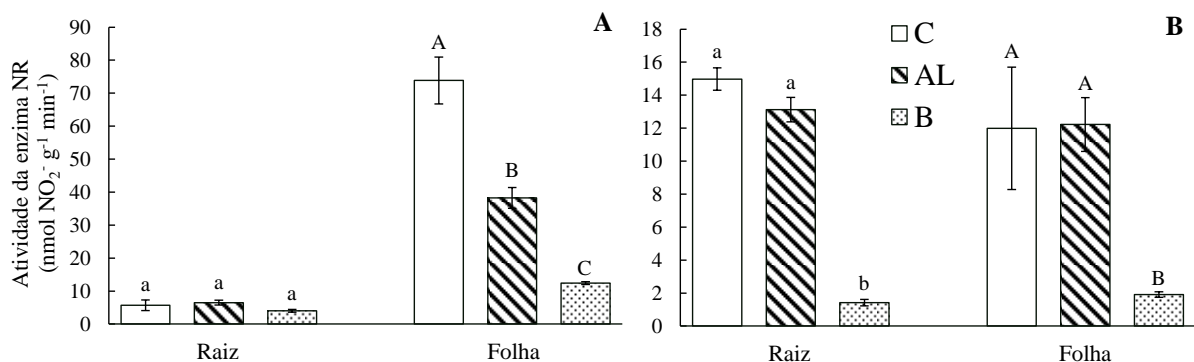
A proporção de Chla e Chlb das mudas de *C. pachystachya* cultivadas com braquiária apresentaram diferenças em relação as mudas do controle. A proporção de Chla aumentou e a de Chlb diminuiu nas mudas tratadas com B. Já para as mudas da espécie não-pioneira, essas proporções diferiram apenas entre os tratamentos AL e B, tendo maior proporção de Chla e uma menor de Chlb nas mudas do tratamento B. A concentração de clorofila total (Chla+Chlb) foi reduzida nas mudas do tratamento AL (29%) e naquelas tratadas com braquiária (63%) na espécie pioneira, sendo o menor valor observado nas mudas do tratamento B. Para *E. brasiliensis*, foi observada uma diminuição de 38% da concentração de clorofila total nas mudas cultivadas com braquiária (Tabela 3).

#### Análise do metabolismo do N nas mudas

A atividade da enzima NR nas raízes não foi alterada nas mudas de *C. pachystachya* submetidas ao cultivo simultâneo ou com adição de exsudatos de raiz da braquiária. Nas folhas, a atividade da NR foi negativamente afetada em ambos os tratamentos, sendo observada uma menor atividade nas mudas do tratamento B (Figura 3A). Para a espécie não-pioneira, a atividade da enzima NR nas raízes e nas folhas foi diminuída apenas quando as mudas nativas foram cultivadas juntamente com a braquiária (Figura 3B).

**Tabela 3.** Médias e erros-padrão da porcentagem de Clorofila *a* (Chla) e Clorofila *b* (Chlb), e da concentração de Clorofila total (Chla+Chlb) em folhas de mudas de *Cecropia pachystachya* (Cp) e *Eugenia brasiliensis* (Eb) cultivadas em conjunto com *Brachiaria decumbens* (B), submetidas ao tratamento com aleloquímicos exsudados pelas raízes da gramínea (AL) ou sem tratamento (C: controle). As análises estatísticas envolveram somente comparações intraespecíficas. Letras minúsculas na linha comparam os tratamentos em *C. pachystachya*, assim como letras maiúsculas na linha comparam os tratamentos em *E. brasiliensis*. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

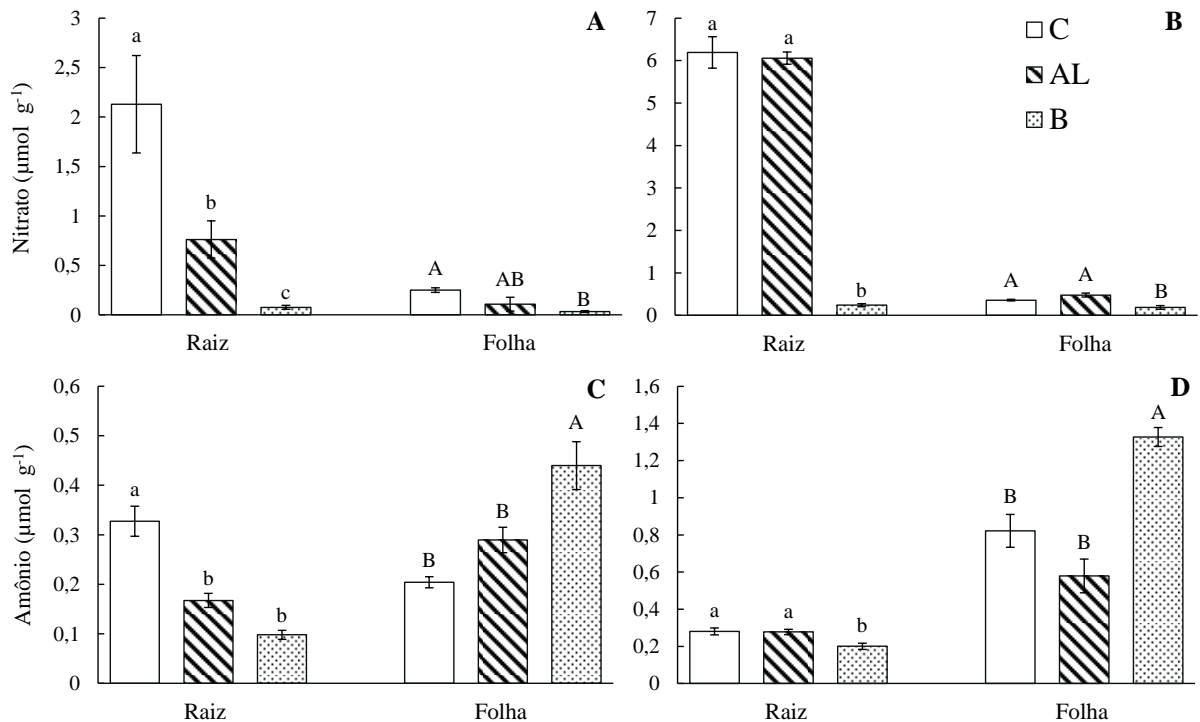
Variável	Espécie	Tratamento		
		C	AL	B
Chla (%)	Cp	49,2 ± 2,20 b	57,4 ± 2,27 ab	63,8 ± 4,54 a
	Eb	70,6 ± 1,17 ab	62,9 ± 3,31 b	78,0 ± 3,68 a
Chlb (%)	Cp	50,8 ± 2,2 a	42,6 ± 2,27 ab	36,2 ± 4,54 b
	Eb	29,4 ± 1,17 ab	37,1 ± 3,31 a	22,0 ± 3,68 b
Chla+Chlb ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Cp	1621 ± 74,2 a	1149 ± 36,2 b	595 ± 25,3 c
	Eb	1022 ± 89,1 a	1168 ± 34,4 a	629 ± 57,2 b



**Figura 3.** Atividade da enzima Nitrato Redutase (NR) em raiz e folha de mudas de *Cecropia pachystachya* (A) e *Eugenia brasiliensis* (B) cultivadas em conjunto com *Brachiaria decumbens* (B), submetidas ao tratamento com aleloquímicos exsudados pelas raízes da gramínea (AL) ou sem tratamento (C: controle). As análises estatísticas envolveram somente comparações intraespecíficas. Letras minúsculas comparam os tratamentos nas raízes, assim como letras maiúsculas comparam os tratamentos nas folhas. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

As mudas de *C. pachystachya* apresentaram uma diminuição na concentração de nitrato nas raízes quando submetidas aos tratamentos AL e B, sendo os menores valores encontrados nas mudas cultivadas com a gramínea. Nas folhas da espécie pioneira, a concentração de nitrato foi diminuída quando cultivadas com *B. decumbens*, em comparação com o controle (Figura 4A). Os teores de nitrato nas raízes e folhas nas mudas de *E. brasiliensis* foram menores apenas naquelas cultivadas com braquiária, diferindo das mudas do controle e do tratamento AL (Figura 4B).

As concentrações de amônio nas raízes das mudas de *C. pachystachya* diminuíram naquelas submetidas aos tratamentos AL e B. Já nas folhas, os maiores valores foram observados nas mudas cultivadas com braquiária (Figura 4C). Em *E. brasiliensis*, as mudas do tratamento B diferiram das mudas dos demais tratamentos, apresentando menores valores de amônio nas raízes e maior conteúdo de amônio nas folhas (Figura 4D).

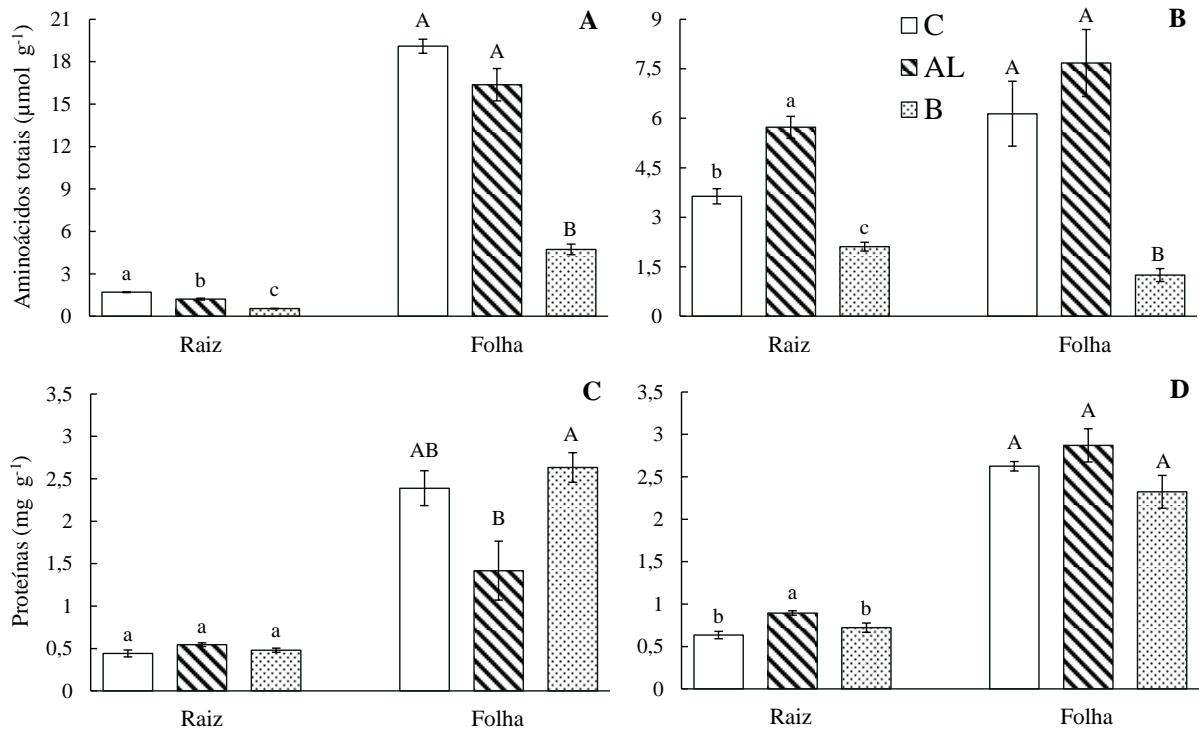


**Figura 4.** Conteúdo de Nitrato (A e B) e Amônio (C e D) em raiz e folha de mudas de *Cecropia pachystachya* (A e C) e *Eugenia brasiliensis* (B e D) cultivadas em conjunto com *Brachiaria decumbens* (B), submetidas ao tratamento com aleloquímicos exsudados pelas raízes da gramínea (AL) ou sem tratamento (C: controle). As análises estatísticas envolveram somente comparações intraespecíficas. Letras minúsculas comparam os tratamentos nas raízes, assim como letras maiúsculas comparam os tratamentos nas folhas. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

O teor de aminoácidos solúveis totais nas raízes das mudas de *C. pachystachya* diminuiu nos tratamentos AL e B, tendo os menores valores nas mudas cultivadas com braquiária. Nas folhas das mudas desta espécie, a concentração de aminoácidos foi diminuída naquelas cultivadas com braquiária (Figura 5A). Para *E. brasiliensis*, quando comparado com o controle, houve um aumento de aminoácidos nas raízes nas mudas do tratamento AL e um decréscimo no tratamento B. Nas folhas, houve uma diminuição de aminoácidos apenas nas mudas tratadas com braquiária, na espécie não-pioneira (Figura 5B).

A concentração de proteína nas raízes de *C. pachystachya* não alterou nos diferentes tratamentos, enquanto que nas folhas houve maior concentração de proteínas nas

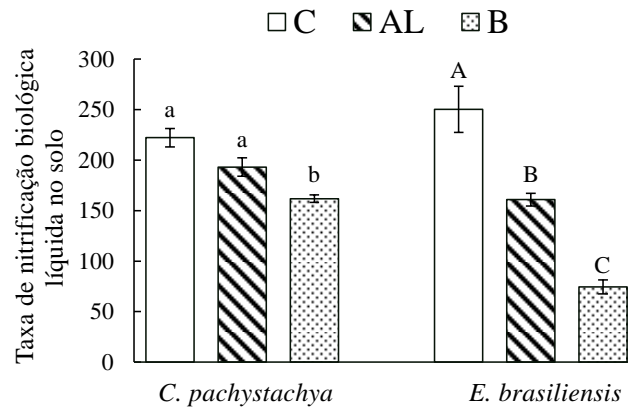
mudas cultivadas com braquiária, comparado com as mudas do tratamento AL (Figura 5C). Para *E. brasiliensis*, as mudas do tratamento AL apresentaram as maiores concentrações de proteínas nas raízes, ao passo que nas folhas esse parâmetro não se alterou (Figura 5D).



**Figura 5.** Conteúdo de Aminoácidos solúveis totais (A e B) e Proteínas totais (C e D) em raiz e folha de mudas de *Cecropia pachystachya* (A e C) e *Eugenia brasiliensis* (B e D) cultivadas em conjunto com *Brachiaria decumbens* (B), submetidas ao tratamento com aleloquímicos exsudados pelas raízes da gramínea (AL) ou sem tratamento (C: controle). As análises estatísticas envolveram somente comparações intraespecíficas. Letras minúsculas comparam os tratamentos nas raízes, assim como letras maiúsculas comparam os tratamentos nas folhas. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

#### Análise da taxa de nitrificação do solo de cultivo das mudas

A taxa de nitrificação do solo (TNS) onde as mudas de *C. pachystachya* foram cultivadas foi diminuída no tratamento B (27%), quando comparadas com o C, e apesar de demonstrar uma tendência à diminuição da TNS no tratamento AL, esta não foi significativa (13%). No solo de cultivo das mudas de *E. brasiliensis* foi observada uma diminuição na TNS nos tratamentos AL (35%) e B (70%), em comparação com o solo das mudas do controle (Figura 6).



**Figura 6.** Taxa de nitrificação biológica líquida no solo de cultivo das mudas de *Cecropia pachystachya* e *Eugenia brasiliensis* cultivadas em conjunto com *Brachiaria decumbens* (B), submetidas ao tratamento com aleloquímicos exsudados pelas raízes da gramínea (AL) ou sem tratamento (C: controle). As análises estatísticas envolveram somente comparações intraespecíficas. Letras minúsculas comparam os tratamentos em *C. pachystachya*, assim como letras maiúsculas comparam os tratamentos em *E. brasiliensis*. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

## Discussão

### *Efeito alelopático dos exsudatos das raízes de B. decumbens nas mudas do tratamento AL*

As duas espécies arbóreas nativas apresentaram sensibilidade distinta aos exsudatos das raízes de *B. decumbens*, ratificando a hipótese inicial de que a espécie pioneira é mais prejudicada pelos aleloquímicos em comparação com a espécie não-pioneira.

As análises de crescimento, como a TCR da raiz e da PA (Tabela 2), e as análises fisiológicas indicaram que a espécie pioneira foi mais sensível à alelopatia causada pelos exsudatos das raízes da gramínea, e que a espécie não-pioneira foi menos sensível. A redução da  $A$ ,  $E$ ,  $k$  e eficiência máxima do fotossistema II nas mudas de *C. pachystachya* do tratamento AL (Figuras 1 e 2), sugere um efeito direto dos aleloquímicos na fisiologia das plantas, uma vez que estas substâncias podem atuar na inibição ou até mesmo causar danos ao aparelho fotossintético (YU *et al.*, 2006). Diferentemente, as mudas de *E. brasiliensis* foram menos prejudicadas pelo tratamento AL, tendo um aumento de  $A$ , apesar da diminuição da  $g_s$  (Figura 1), quando expostas aos aleloquímicos, o que indica que esta espécie foi menos sensível à alelopatia causada pelos exsudatos da raiz de *B. decumbens*, podendo ainda atuar como um fator benéfico à fisiologia dessas mudas.

A fotossíntese pode ser prejudicada pela ação dos aleloquímicos fenólicos, os quais influenciam a redução do teor de clorofila e a taxa fotossintética (JOHN & SARADA, 2012). Patterson (1981) relatou que os ácidos cumárico, ferúlico, cinâmico e vanílico inibiram a fotossíntese e reduziram conteúdo de clorofila nas folhas de soja,

prejudicando o crescimento dessas plantas. Estes aleloquímicos entram através da membrana celular e alteram a atividade e as funções de algumas enzimas, podendo inibir a atividade das fosforilases, das ATPases e das peroxidases (RICE, 1984).

Segundo Yu et al. (2006), os aleloquímicos aceleram a decomposição de pigmentos fotossintéticos, o que pode explicar os resultados apresentados pelas mudas de *C. pachystachya*, as quais apresentaram uma redução da concentração de clorofila total (Tabela 3), e conseqüente redução da *A* (Figura 1A) nas mudas do tratamento AL. A espécie não-pioneira não apresentou redução da concentração de clorofila total, se mostrando menos sensível à alelopatia (Tabela 3).

O tratamento AL causou modificações no metabolismo do N das mudas das espécies arbóreas nativas (Figuras 3, 4 e 5). A atividade da enzima NR foliar reduzida, juntamente com a baixa concentração de nitrato nas raízes das mudas de *C. pachystachya* do tratamento AL (Figura 3A e 4A), indicam uma baixa absorção de nitrato pelas raízes dessas mudas.

Já se sabe que mudas de *C. pachystachya* são capazes de absorver e assimilar amônio nas raízes, apesar da preferência na absorção e assimilação de nitrato quando presentes no solo de cultivo (ver CAPÍTULO 1). Da mesma forma que o nitrato, observou-se uma baixa concentração de amônio endógeno (Figura 4A), levando à redução da assimilação em aminoácidos nas raízes dessas mudas expostas ao tratamento AL, além de apresentar uma redução na concentração de proteínas nas folhas (Figuras 5A, C). Provavelmente isso aconteceu devido à sensibilidade da espécie pioneira aos aleloquímicos presentes no exsudato das raízes da gramínea, que inibiram diretamente a absorção de nitrato e amônio do solo.

As análises das TNS indicaram que a alelopatia indireta, causada pelos aleloquímicos exsudados pelas raízes de *B. decumbens* no solo, depende da interação entre a espécie alvo com os aleloquímicos, uma vez que a TNS não foi significativamente reduzida quando exposta ao tratamento AL no solo de cultivo de *C. pachystachya*, apesar de ter mostrado uma tendência à redução (Figura 6). Diferentemente, o solo de cultivo de *E. brasiliensis* apresentou uma redução da TNS quando expostas ao tratamento AL (Figura 6), demonstrando que esta espécie de *Brachiaria* possui alequímicos exsudados pelas raízes responsáveis pela inibição da nitrificação do solo (SUBBARAO *et al.*, 2007).

Estes resultados permitem supor que o principal efeito dos aleloquímicos sobre as mudas de *C. pachystachya* se deem de forma direta, e não indiretamente através da redução de nitrato no solo causada pela redução da TNS. Estudos que elucidem os

mecanismos de ação direta dos aleloquímicos em mudas de *C. pachystachya* devem ser realizados, tais como a análise de absorção de N e a dosagem do conteúdo de outros nutrientes (como P, S, K, Mg, Mn) em raízes e folhas. Além disso, a caracterização dos aleloquímicos presentes nos exsudatos das raízes de *B. decumbens* é essencial.

Diferentemente, mudas de *E. brasiliensis* não apresentaram redução nos níveis de nitrato e amônio nas raízes (Figuras 4B, D). Além disso, estas mudas apresentaram um aumento na concentração de aminoácidos e proteínas totais nas raízes quando tratadas com aleloquímicos (Figuras 5B, D). Isto pode estar relacionado à maior quantidade de amônio no solo, devido à atuação da alelopatia indireta na redução da nitrificação do solo (Figura 6), e à preferência pela absorção de amônio por essa espécie (ver CAPÍTULO 1).

#### *Efeito do cultivo simultâneo com indivíduos de B. decumbens*

Quando cultivadas em conjunto com os indivíduos da gramínea, as mudas de ambas as espécies arbóreas nativas apresentaram sensibilidade similar à competição com as raízes de *B. decumbens*, não ratificando a hipótese proposta de que *C. pachystachya* é mais afetada negativamente, em relação à *E. brasiliensis*.

Diferente do observado no estudo de Zangaro et al. (2016) com mudas arbóreas nativas cultivadas juntamente com *B. brizantha*, aqui a espécie pioneira e a espécie não-pioneira apresentaram comprometimento similar do seu desenvolvimento quando cultivadas simultaneamente com *B. decumbens*. Isto pode ter acontecido, pois as mudas de *E. brasiliensis* possuem raízes relativamente finas e de baixa densidade, assim como *C. pachystachya*, o que faz com que ambas as espécies sejam sensíveis ao cultivo simultâneo com essa espécie de *Brachiaria*. Sendo assim, mais estudos com outras espécies não-pioneiras são necessários a fim de verificar se a generalização de que espécies não-pioneiras são menos sensíveis ao cultivo com gramíneas exóticas do que as espécies pioneiras é indicada.

O comprimento e a TCR da raiz e da PA, assim como a área foliar (Tabela 2) e os parâmetros fisiológicos (Figuras 1 e 2) demonstraram que ambas as espécies arbóreas foram prejudicadas pelo cultivo simultâneo com *B. decumbens*, o que pode ser devido à competição existente por recursos como luz e nutrientes em adição ao efeito alelopático. A competição por água pode ser excluída, uma vez que o solo dos vasos foi mantido em capacidade de campo, não sendo um fator limitante para a redução da taxa fotossintética nessas mudas.

A concentração de clorofila total diminuiu nas duas espécies arbóreas quando expostas à competição por nutrientes e luz no tratamento B (Tabela 3), o que pode ser

uma resposta à menor absorção de N e conseqüente baixa assimilação em aminoácidos (Figuras 4 e 5). Além disso, a baixa taxa fotossintética (A) (Figura 1) dessas mudas, pode ser uma resposta direta à baixa concentração de clorofila total.

A competição por luz e nutrientes, principalmente o nitrato, nas mudas submetidas ao tratamento B levou a uma diminuição da atividade da NR foliar de ambas as espécies e da NR nas raízes da espécie não-pioneira (Figura 3), uma vez que a síntese da enzima NR é induzida indiretamente pela presença de  $\text{NO}_3^-$ , e sua atividade estimulada pela luz, que pode ativar a enzima ou fornecer energia e poder redutor, ATP e NADH, para a assimilação do nitrato, oriunda da fotossíntese (SMIRNOFF *et al.*, 1984).

As concentrações de nutrientes presentes nos tecidos das plantas podem ser influenciadas pela presença de *B. decumbens* no solo (PIRES *et al.*, 2012). Concentrações reduzidas de nitrato nas raízes e folhas, e de amônio nas raízes, assim como os baixos teores de aminoácidos nas raízes e folhas de ambas as espécies do tratamento B, indicam uma baixa absorção de N pelas raízes dessas mudas (Figuras 4 e 5). Esta baixa absorção de N, provavelmente seja devido à baixa disponibilidade de nitrato e amônio no solo, graças à alta utilização dessas fontes de N pela gramínea. O aumento da concentração de amônio nas folhas dessas mudas cultivadas juntamente com *B. decumbens* (Figuras 5A, B), pode ser explicado pela produção de amônio nas folhas, proveniente da fotorrespiração, o que está relacionado com a queda da  $A$  e  $g_s$  (Figuras 1A, B) a qual favoreceu a atividade oxigenase da rubisco nessas mudas, uma vez que a absorção de nitrato e amônio observada foi muito baixa.

Quando as mudas das espécies arbóreas foram cultivadas juntamente com a gramínea, a TNS foi reduzida no solo de cultivo de ambas as espécies (Figura 6). O efeito alelopático indireto dos aleloquímicos presentes no exsudato das raízes de *B. decumbens*, assim como a existência de competição entre as plantas e os microrganismos por nutrientes, resultaram na redução da atividade enzimática dos microrganismos nitrificantes no solo (Figura 6), diminuindo assim a TNS nestes solos de cultivo.

Os resultados deste estudo permitem supor que as mudas de *E. brasiliensis* apresentariam maior sucesso em solos com histórico de ocupação por *B. decumbens* e na presença de aleloquímicos exsudados pelas raízes dessa gramínea, uma vez que se mostrou menos sensível aos aleloquímicos, os quais podem ainda atuar como um fator benéfico à fisiologia dessas mudas. Diferentemente, as mudas de *C. pachystachya* provavelmente não teriam sucesso nesses solos, já que esta espécie apresentou alta sensibilidade a estes aleloquímicos, permitindo supor que o principal efeito dos aleloquímicos nestas mudas se deem de forma direta, uma vez que a TNS não foi reduzida de maneira significativa. Já em

áreas de reflorestamento suscetível a presença de braquiária, nenhuma das espécies arbóreas é indicada para ser utilizada, uma vez que ambas as espécies arbóreas se mostraram sensíveis ao cultivo simultâneo com *B. decumbens*.

### Referências bibliográficas

BRADFORD, M. M. (1976.) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72(1-2), 248-254.

BRADLEY, R. L. (2001). An alternative explanation for the post-disturbance NO<sub>3</sub><sup>-</sup> flush in some forest ecosystems. **Ecology Letters**, 4(5), 412-416.

CALZAVARA, A. K.; BIANCHINI, E.; MAZZANATTI, T.; OLIVEIRA, H. C.; PIMENTA, J. A. (2015). Morphoanatomy and ecophysiology of tree seedlings in semideciduous forest during high-light acclimation in nursery. **Photosynthetica**, 53(4), 597-608.

CHOU, C. H.; PUTNAM, A. L.; TANG, C. S. (1986). The role of allelopathy in subtropical agroecosystems in Taiwan. **The science of allelopathy**, 57-73.

CORBIN, J. D. & D'ANTONIO, C. M. (2004). Effects of exotic species on soil nitrogen cycling: implications for restoration 1. **Weed Technology**, 18(sp1), 1464-1467.

COSTA, E. A. D. D.; MATALLO, M. B.; CARVALHO, J. C.; ROZANSK, A. (2002). Eficência de nova formulação do herbicida oxyfluorfen no controle de plantas daninhas em área de *Pinus caribea* Morelet var. *hondurensis* Barr. et Golf. **Revista Árvore**, 26(6), 683-89.

CRISPIM, S. M. A. & BRANCO, O. D. (2002). Aspectos gerais das braquiárias e suas características na sub-região da Nhecolândia, Pantanal, MS. **Embrapa Pantanal. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**.

DONALD, C. M. (1963). Competition among crop and pasture plants. **Advances in agronomy**, 15, 1-118.

- EHRENFELD, J. G. (2003). Effects of exotic plant invasions on soil nutrient cycling processes. **Ecosystems**, 6(6), 503-523
- EINHELLIG, F. A. (1999). An integrated view of allelochemicals amid multiple stresses. **Principals and practices in plant ecology: allelochemical interactions**. CRC Press, Boca Raton, 479-494.
- EMBRAPA- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. (1999). Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Sistema brasileiro de classificação de solos. Brasília, 412p.
- FERREIRA, A. G. & AQUILA, M. E. (2000). Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 12(1), 175-204.
- FERREIRA, N. R.; MEDEIROS, R. D.; SOARES, G. L. G. (2008). Potencial alelopático do capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) na germinação de sementes de gramíneas perenes estivais. **Revista Brasileira de Sementes**, 30(2), 43-53.
- HAGEMAN, R. H. & REED, A. J. (1980). Nitrate reductase from higher plants. **Methods in enzymology**, 69, 270-280.
- JOHN, J. & SARADA, S. (2012). Role of phenolics in allelopathic interactions. **Allelopathy Journal**, 29(2), 215-229.
- KISSMANN, K. G. (1997). **Plantas infestantes e nocivas - Tomo I: Plantas inferiores e monocotiledôneas**. São Bernardo do Campo: BASF. 824 p.
- KOBAYASHI, A. & KATO-NOGUCHI, H. (2015). Phytotoxic substance with allelopathic activity in *Brachiaria decumbens*. **Natural product communications**, 10(5), 761-763.
- KRONZUCKER, H. J.; SIDDIQI, M. Y., GLASS, A. D. M.; BRITTO, D. T. (2003). Root ammonium transport efficiency as a determinant in forest colonization patterns: an hypothesis. **Physiol. Plantarum**, 117(2), 164-170.
- LORENZI, H. (2002). **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 368 p.

LOVETT, J., & RYUNTYU, M. (1992). Allelopathy: broadening the context. **Allelopathy**, 11-19. Springer Netherlands.

MCCULLOUGH, H. (1967). The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. **Clínica química acta**, 17(2), 297-304

MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric Oxide**, 5(1), 62-71.

MOSSRI, B. B. (1997). **Germinação e crescimento inicial de *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (Hayne) Lee & Lang. E *Cecropia pachystachya* Trécul.: duas espécies de níveis sucessionais diferentes de mata de galeria.** Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade de Brasília, Brasília.

MURCHIE, E. H. & LAWSON, T. (2013). Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. **Journal of experimental botany**, 64(13), 3983-3998.

OLIVEIRA, H. C. & SODEK, L. (2013). Effect of oxygen deficiency on nitrogen assimilation and amino acid metabolism by soybean root segments. **Amino Acids**, 44(2), 743-755.

PATTERSON, D.T. (1981). Effects of allelopathic chemicals on growth and physiological response of soybean (*Glycine max*). **Weed Science**, 29, 53-58.

PIRES, A. C. V.; PEREIRA, S. R.; FERNANDES, G. W.; OKI, Y. (2012). Efeito de *Brachiaria decumbens* na herbivoria e no desenvolvimento de duas leguminosas nativas de cerrado. **Planta Daninha**, 30, 737-746.

PITELLI, R.; RODRIGUES, J.; KARAM, D.; COELHO, J.; ZANUNCIO, I.; ZANUNCIO, C. (1988). Efeitos de períodos de convivência e do controle de plantas daninhas na cultura de *Eucalyptus*. **Seminário técnico sobre plantas daninhas e o uso de herbicidas em reflorestamento**, 1, 110-123.

PORRA, R.J. (2002). The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. **Photosynthesis Research**, 73, 149-156.

REIGOSA, M. J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.; GONZÁLEZ, L. (1999). Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Science**, 18(5), 577-608.

RICE, E.L. (1984). **Allelopathy**. 2nd ed., New York, Academic Press.

RIZVI, S. J. H.; HAQUE, H.; SINGH, U. K.; RIZVI, V. (1992). A discipline called allelopathy. **Allelopathy**, 1-10. Springer Netherlands.

RONDINA, A. B. L.; LESCANO, L. E. A. M.; ALVES, R. A.; MATSUURA, E. M., NOGUEIRA, M. A.; ZANGARO, W. (2014). Arbuscular mycorrhizas increase survival, precocity and flowering of herbaceous and shrubby species of early stages of tropical succession in pot cultivation. **Journal of Tropical Ecology**, 30(06), 599–614.

ROSSITER-RACHOR, N. A.; SETTERFIELD, S. A.; DOUGLAS, M. M.; HUTLEY, L. B.; COOK, G. D.; SCHMIDT, S. (2009). Invasive *Andropogon gayanus* (gamba grass) is an ecosystem transformer of nitrogen relations in Australian savanna. **Ecological Applications**, 19(6), 1546-1560.

SMIRNOFF, N.; TODD, P.; STEWART, G. R. (1984). The occurrence of nitrate reduction in the leaves of woody plants. **Annals of Botany**, 54(3), 363-374.

SOUZA, L. S.; VELINI, E. D.; MARTINS, D.; ROSOLEM, C. A. (2006). Allelopathic effects of *Brachiaria decumbens* on the initial development of seven crops. **Planta Daninha**, 24(4), 657-668.

STEWART, G. R.; POPP, M.; HOLZAPFEL, I.; STEWART, J. A.; DICKIE-ESKEW, A. N. N. (1986). Localization of nitrate reduction in ferns and its relationship to environment and physiological characteristics. **New phytologist**, 104(3), 373-384

SUBBARAO, G. V.; RONDON, M.; ITO, O.; ISHIKAWA, T.; RAO, I. M.; NAKAHARA, K.; BERRY, W. L. (2007). Biological nitrification inhibition (BNI) – is it a widespread phenomenon? **Plant and Soil**, 294(1-2), 5-18.

SUBBARAO, G. V.; NAKAHARA, K.; HURTADO, M. D. P.; ONO, H.; MORETA, D. E.; SALCEDO, A. F.; YOSHIDA, M. (2009). Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria* pastures. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 106(41), 17302-17307.

TOLEDO, R. E. B.; ALVES, P. L. C. A.; VALLE, C. F.; ALVARENGA, S. F. (1999). Manejo de *Brachiaria decumbens* e seu reflexo no desenvolvimento de *Eucalyptus grandis*. **Scientia Forestalis**, 129-141.

TOLEDO, R. E. B.; VICTÓRIA-FILHO, R.; ALVES, P. L. C. A.; PITELLI, R. A.; CADINI, M. T. D. (2000). Efeitos da faixa de controle do capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) no desenvolvimento inicial de plantas de eucalipto. **Planta Daninha**, 383-393.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C.; RICKETTS, R. E. (1955). The determination of amino-acid with ninhydrin. **Analyst**, 80(948), 209-214.

YU, J.; ZHANG, Y.; NIU, C.; LI, J. (2006). Effects of two kinds of allelochemicals on photosynthesis and chlorophyll fluorescence parameters of *Solanum melongena* L. seedlings. **Ying yong sheng tai xue bao= The journal of applied ecology/Zhongguo sheng tai xue xue hui, Zhongguo ke xue yuan Shenyang ying yong sheng tai yan jiu suo zhu ban**, 17(9), 1629-1632.

ZANGARO, W.; LESCANO, L. E. A. M.; MATSUURA, E. M.; RONDINA, A. B. L.; NOGUEIRA, M. A. (2016). Differences between root traits of early-and late-successional trees influence below-ground competition and seedling establishment. **Journal of Tropical Ecology**, 32, 300-313

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caracterização do uso de N em raízes e folhas de mudas nativas arbóreas, e a verificação dos efeitos causados pela interação com gramíneas invasoras, são de grande importância para programas de restauração, e essenciais para a escolha de espécies para locais de plantios adequados.

A avaliação do efeito do cultivo com  $\text{NO}_3^-$  e/ou  $\text{NH}_4^+$  no crescimento, na fisiologia e no metabolismo do N demonstrou diferenças nas respostas à sensibilidade ao  $\text{NH}_4^+$ , na assimilação de N nas raízes e folhas e na translocação de N pela seiva do xilema, entre as duas espécies analisadas:

- *C. pachystachya*, se mostrou sensível ao  $\text{NH}_4^+$ , tendo seus parâmetros fisiológicos e seu crescimento prejudicados por essa fonte de N. Esta espécie apresentou alta atividade da enzima NR nas folhas, e predominância de  $\text{NO}_3^-$  na seiva do xilema, evidenciando sua alta capacidade em assimilar N a partir da redução do  $\text{NO}_3^-$  principalmente nas folhas.

- *E. brasiliensis* apresentou alta tolerância ao  $\text{NH}_4^+$ , não tendo seu crescimento e seus parâmetros fisiológicos prejudicados pelo cultivo com este cátion. A translocação predominante de aminoácidos pela seiva do xilema, e a baixa atividade da enzima NR foliar, indicam uma baixa atividade assimilatória nas folhas, o que tem relação com o uso de  $\text{NH}_4^+$  como fonte primária de N e com a assimilação a partir desse cátion ou de  $\text{NO}_3^-$  pelas raízes.

- Pode-se supor que as mudas da espécie pioneira teriam maior sucesso em solos com predominância de  $\text{NO}_3^-$ , diferente da espécie não-pioneira, que se desenvolveria melhor em solos contendo  $\text{NH}_4^+$  predominantemente.

A avaliação do efeito do cultivo com exsudatos de raízes em solo previamente cultivado com *B. decumbens* nas mudas das duas espécies arbóreas, demonstrou sensibilidade distinta aos aleloquímicos, ratificando a hipótese inicial de que a espécie pioneira é mais prejudicada pelos aleloquímicos em comparação com a espécie não-pioneira:

- As análises dos parâmetros fisiológicos e de crescimento indicaram que *C. pachystachya* foi muito sensível ao efeito alelopático causado pelos aleloquímicos exsudados pelas raízes da gramínea. A análise da TNS não reduzida no solo de cultivo dessas mudas, indica que a alelopatia indireta depende da interação entre a espécie alvo e os aleloquímicos. O metabolismo de N das mudas da espécie pioneira foi prejudicado pelo cultivo com adição de exsudatos da raiz da gramínea, o que permite supor que o principal efeito dos aleloquímicos nas mudas de *C. pachystachya* se deem de forma direta.

- O crescimento inalterado de *E. brasiliensis* quando expostos ao exsudato de raiz da

braquiária, demonstra que esta espécie foi menos sensível aos aleloquímicos, os quais podem ainda atuar como um fator benéfico à fisiologia dessas mudas. O solo de cultivo dessas mudas apresentou uma redução da TNS, demonstrando que *Brachiaria* possui aleloquímicos exsudados pelas raízes responsáveis pela inibição da nitrificação do solo. O metabolismo de N não foi prejudicado, tendo ainda um aumento na concentração de aminoácidos e proteínas nas raízes quando em contato com os aleloquímicos, o que deve estar relacionado à maior quantidade de amônio no solo, devido à atuação da alelopatia indireta e à preferência pela absorção de amônio por essa espécie.

- Pode-se supor que as mudas da espécie não-pioneira apresentariam maior sucesso em solos com histórico de ocupação por *B. decumbens* e na presença de aleloquímicos exsudados pelas raízes dessa gramínea, diferente da espécie pioneira que provavelmente não teriam sucesso nesses solos, já que esta apresentou alta sensibilidade à estes aleloquímicos.

A avaliação do efeito do cultivo simultâneo com braquiária nas mudas das duas espécies arbóreas, demonstrou sensibilidade similar à competição com as raízes de *B. decumbens*, não ratificando a hipótese proposta de que *C. pachystachya* é mais afetada negativamente, em relação à *E. brasiliensis*, pelo cultivo simultâneo com a gramínea:

- As raízes relativamente finas das mudas das duas espécies arbóreas podem ser uma explicação à sensibilidade similar das duas espécies à competição com as raízes da gramínea.

- Os parâmetros referentes ao crescimento, à fisiologia, e ao metabolismo do N foram prejudicados pela competição existente sobre os recursos como luz e nutrientes em adição ao efeito alelopático aos quais as mudas estavam expostas quando cultivadas juntas com *B. decumbens*.

- O efeito alelopático indireto dos aleloquímicos presentes no exsudato das raízes de *B. decumbens*, assim como a existência de competição entre as plantas e os microrganismos por nutrientes, resultaram na redução TNS de cultivo de ambas as espécies arbóreas.

- Em áreas de reflorestamento suscetível a presença de braquiária, nenhuma das espécies arbóreas é indicada para ser utilizada, uma vez que ambas as espécies arbóreas se mostraram sensíveis ao cultivo simultâneo com *B. decumbens*.

## ANEXO. Guia para autores da revista “Journal of Plant Physiology”

### INTRODUCTION

The *Journal of Plant Physiology (J Plant Physiol)* publishes, in English, original papers, short communications and reviews in all areas of plant physiology, plant biochemistry, plant molecular biology and functional biotechnology of plants. Manuscripts covering applied issues can be accepted only if establishing general principles in plant physiology and contributing to the understanding of physiological mechanisms. Studies that merely confirm known facts in just another species will normally not be considered for publication.

### *Types of paper*

The *Journal of Plant Physiology* accepts three types of manuscripts:

#### **Invited Reviews (IR)**

Authors interested in writing a review article should contact one of the editors in advance by submitting a summary of the intended manuscript. The editor may then send an official letter of invitation with further instructions.

#### **Original Papers (OP)**

Original Papers represent a substantial novel finding in plant physiology, normally produced through the application of a combination of experimental techniques. The text should not exceed 10 printed pages including tables and figures (45000 characters plus up to ten figures and/or tables).

#### **Short Communications (SC)**

Short Communications should not exceed 4 printed pages including tables and figures (20000 characters and up to 4 figures and/or tables). Please note: A SC is not a publication that contains too few or preliminary data to justify a full paper. It should report "urgent data" that should be communicated to the scientific community prior to the completion of the full investigation.

#### *Page charges*

This journal has no page charges.

### *Submission checklist*

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

#### *Manuscript:*

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

#### *Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)*

#### *Supplemental files (where applicable)*

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa

- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

## BEFORE YOU BEGIN

### *Ethics in publishing*

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

### *Declaration of interest*

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work.

### *Submission declaration*

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

### *Changes to authorship*

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

### *Article transfer service*

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal.

### *Copyright*

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement'. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the

manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Exclusive License Agreement'. Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

### **Author rights**

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work.

*Elsevier supports responsible sharing*

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

*Funding body agreements and policies*

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

### **Open access**

This journal offers authors a choice in publishing their research:

#### **Open access**

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

#### **Subscription**

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

*Creative Commons Attribution (CC BY)*

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for

commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

*Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)*

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2400**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

*Green open access*

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 24 months.

*Language (usage and editing services)*

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

**Submission**

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

*Submit your article*

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/jplph>.

**PREPARATION**

*Use of word processing software*

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

### **Article structure**

#### *Subdivision - unnumbered sections*

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when crossreferencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

#### *Introduction*

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

#### *Material and methods*

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

#### *Theory/calculation*

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

#### *Results*

Results should be clear and concise.

#### *Discussion*

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

#### *Conclusions*

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

#### *Appendices*

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

### **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible. Report data rather than giving a description of the experiments performed, if possible. Try to avoid "the effect of on..." or similar.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

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

### Summary

A concise and factual summary is required. The summary should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. A summary is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, references should not be included. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the summary itself. The summary will be attached to the invitation letter mailed to potential reviewers.

### Graphical abstract

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

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

### Keywords

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

### Abbreviations

List all abbreviations used which are non-standard. Abbreviations used for the axes of graphs should be listed in the abbreviation list not the figure legend. Use abbreviations consistently after the first introduction.

### Acknowledgements

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

### Formatting of funding sources

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

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

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

#### *Units*

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

#### *Math formulae*

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

#### **Footnotes**

Footnotes are not permitted.

#### **Artwork**

##### *Electronic artwork*

##### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

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

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

##### *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

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

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

##### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

##### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge,

that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

If the printed version of the figures is to be black-and-white, authors should submit black-and-white figures for review. If a manuscript was reviewed and accepted with color figures, it should be published in color.

#### *Illustration services*

[Elsevier's WebShop](#) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

#### *Figure captions*

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

#### **Tables**

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

#### **References**

Keep the number of references at the required minimum. Avoid web citations unless their future availability is guaranteed. Text citations and references listed in the reference list must perfectly match. Mismatches, including year of publication and misspellings of names, will cause problems when electronic links are established and, consequently, delay the publication of the manuscript.

#### *Web references*

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

#### *References in a special issue*

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

#### *Reference management software*

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is

yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

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

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/journal-of-plant-physiology>

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

#### *Reference style*

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
  2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
  3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.
- Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al.

(2010) have recently shown ....'

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

#### *Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

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

Reference to a chapter in an edited book:

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

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13.03.03).

#### *Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

### **Supplementary material**

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our [artwork instruction pages](#).

### **Common problems in manuscript formatting**

- do not start sentence with an abbreviation or a numeral
- abbreviation for "liter" always capital (upper case) "L", for example mL
- always insert space between numeral and unit, for example 1 mL, 1 mM, 1 h, 1 min
- use consistently h for hour(s), min for minute(s), s for second(s), d for day(s); note: h not hs for hours, no period
- do not use "&" for "and"
- do not use terms Southern/Northern/Western, instead: DNA/RNA/protein gel blot analysis/ hybridization
- use nomenclature, including gene names and symbols and other genetic terms, in a scientifically accurate manner according to nomenclature conventions adopted by the scientific community
- give authority in Materials and Methods only
- use correct journal abbreviations
- use short form of page numbering
- use correct punctuation in text citations and references
- be consistent in formatting figures and tables (for example, writing Gene Expression but Enzyme activity is inconsistent application of capitalization)

## AFTER ACCEPTANCE

### *Availability of accepted article*

This journal makes articles available online as soon as possible after acceptance. This concerns the accepted article (both in HTML and PDF format), which has not yet been copyedited, typeset or proofread. A Digital Object Identifier (DOI) is allocated, thereby making it fully citable and searchable by title, author name(s) and the full text. The article's PDF also carries a disclaimer stating that it is an unedited article. Subsequent production stages will simply replace this version.

### **Online proof correction**

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

### **Offprints**

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For no extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

**AUTHOR INQUIRIES**

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>