



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

TATIANE VIEGAS DEBIASI

**PLASTICIDADE NO USO DO NITROGÊNIO POR ESPÉCIES  
ARBÓREAS NEOTROPICAIS DE GRUPOS FUNCIONAIS  
DISTINTOS CULTIVADAS SOB DIFERENTES  
INTENSIDADES LUMINOSAS**

---

Londrina  
2022

TATIANE VIEGAS DEBIASI

**PLASTICIDADE NO USO DO NITROGÊNIO POR ESPÉCIES  
ARBÓREAS NEOTROPICAIS DE GRUPOS FUNCIONAIS  
DISTINTOS CULTIVADAS SOB DIFERENTES  
INTENSIDADES LUMINOSAS**

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

Orientador: Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira

Londrina  
2022

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

D286p Debiasi, Tatiane Viegas.  
Plasticidade no uso do nitrogênio por espécies arbóreas neotropicais de grupos funcionais distintos cultivadas sob diferentes intensidades luminosas / Tatiane Viegas Debiasi. - Londrina, 2022.  
112 f. : il.

Orientador: Halley Caixeta de Oliveira.  
Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2022.  
Inclui bibliografia.

1. Amônio - Tese. 2. Nitrato - Tese. 3. Metabolismo do nitrogênio - Tese. 4. Toxicidade do amônio - Tese. I. Oliveira, Halley Caixeta de. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDU 574

TATIANE VIEGAS DEBIASI

**PLASTICIDADE NO USO DO NITROGÊNIO POR ESPÉCIES  
ARBÓREAS NEOTROPICAIS DE GRUPOS FUNCIONAIS  
DISTINTOS CULTIVADAS SOB DIFERENTES  
INTENSIDADES LUMINOSAS**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Profa. Dra. Marília Gaspar  
Instituto de Pesquisas Ambientais - IPA

---

Dra. Karoline Estefani Duarte  
Universidade Federal do ABC - UFABC

---

Prof. Dr. Luciano Freschi  
Universidade de São Paulo – USP

---

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

Londrina, 31 de janeiro de 2022.

## AGRADECIMENTOS

À minha família, Leonardo, Milton e Prescila, meu noivo, Anderson, pelo amor, amizade, incentivo e ensinamentos ao longo de minha vida.

Aos meus amigos, Amanda, Ana Paula, Larissa, Natália e Thalita pela amizade, apoio e ótimos momentos vivenciados.

Aos amigos de laboratório, Alexandre, André, Angélica, Bruno, Diego, Gabriela, Giovanna, Hilton, Hugo, Izabelle, Karina, Lara, Letícia, Mariana, Patrícia e Rafael, pela amizade, conversas e auxílio nas desmontagens de experimentos e nas análises em laboratório. Agradeço, em especial, ao Anderson, por ter acompanhado praticamente todas as etapas deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira, pela paciência, atenção e orientação ao longo do doutorado.

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

Aos Profs. Drs. Artur Berbel Lírio Rondina, Ladaslav Sodek e José Antonio Pimenta, pelas sugestões na qualificação.

Aos Drs. Marília Gaspar, Karoline Estefani Duarte, Luciano Freschi, José Antonio Pimenta, Weliton José da Silva, Mariana Fernandes Hertel, pela composição da banca de defesa de tese.

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

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

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

Ao Prof. Dr. Artur Berbel Lírio Rondina (EMBRAPA), Prof. Dr. Bruno Lemos (UFABC), Prof. Dr. Ladaslav Sodek (UNICAMP), e Rodrigo Mendes Pereira (UFABC) pelas análises.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para os projetos de pesquisa.

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

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

DEBIASI, Tatiane Viegas. **Plasticidade no uso do nitrogênio em espécies arbóreas neotropicais de grupos funcionais distintos cultivadas sob diferentes intensidades luminosas**. 2022. 109 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022

## RESUMO

As plantas absorvem o nitrogênio (N) do solo principalmente de fontes inorgânicas como o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e o amônio ( $\text{NH}_4^+$ ). O consumo energético é mais elevado quando o nitrogênio é assimilado a partir do  $\text{NO}_3^-$ , se comparado ao  $\text{NH}_4^+$ . Porém, este cátion quando acumulado em grandes concentrações nas células provoca toxicidade, devendo ser rapidamente assimilado em aminoácidos nas raízes. A assimilação do N depende da fotossíntese e, conseqüentemente, é influenciada pela luz. Este estudo verificou a influência da intensidade luminosa no uso do N por mudas de espécies arbóreas neotropicais cultivadas em hidroponia na casa de vegetação. Foram realizadas análises de crescimento, fotossintéticas e bioquímicas. As espécies escolhidas foram *Cecropia pachystachya* (intolerante à sombra), *Guarea kunthiana* (tolerante à sombra, de sub-bosque) e *Cariniana estrellensis* (tolerante à sombra, que atinge o dossel). No primeiro experimento, foi avaliado se o aumento da intensidade luminosa induz a preferência pela absorção de  $\text{NO}_3^-$  em relação ao  $\text{NH}_4^+$ , em mudas cultivadas com nitrato de amônio. O monitoramento da incorporação de  $^{15}\text{N}$  em aminoácidos indicou que *C. pachystachya* mudou de um metabolismo do N desacelerado sob baixa luminosidade (BL) para um expressivo uso de ambas as fontes de N sob alta luminosidade (AL), aumentando substancialmente a concentração de aminoácidos com  $^{15}\text{N}$  derivados do  $^{15}\text{NO}_3^-$  e  $^{15}\text{NH}_4^+$  nas raízes e folhas. *Guarea kunthiana* apresentou baixíssimo uso de  $\text{NO}_3^-$  sob BL, mas aumentou expressivamente a assimilação de  $\text{NO}_3^-$  nas raízes e folhas sob AL, apresentando elevada plasticidade no uso do N pela influência da luz. Em *C. estrellensis*, o aumento da intensidade luminosa induziu a assimilação de  $\text{NH}_4^+$  nas raízes e  $\text{NO}_3^-$  nas folhas. Esses resultados demonstraram que as respostas das estratégias do uso do N à intensidade luminosa foi diferente em cada espécie, e estão de acordo com suas características ecológicas. No segundo experimento, foram verificados os efeitos do  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  sobre as mudas quando submetidas a diferentes intensidades luminosas. Observou-se que as três espécies apresentaram decréscimo do crescimento no cultivo com  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao  $\text{NO}_3^-$ , sob luminosidade intermediária (ML) e AL, mas não sob BL. Essa diminuição foi de 64% (ML) e 54% (AL) em *C. pachystachya*, de 22% (ML) e 36% (AL) em *G. kunthiana* e de 32% (ML) e 20% (AL) em *C. estrellensis*. O alto dreno energético e de carbono imposto pela elevada taxa de assimilação do  $\text{NH}_4^+$  em aminoácidos, indicado pelo aumento da concentração de aminoácidos nas raízes e folhas de plantas cultivadas com  $\text{NH}_4^+$ , provavelmente levou à redução do crescimento sob ML e AL nas três espécies. O menor crescimento das mudas com  $\text{NH}_4^+$  sob ML e AL também foi associado com diminuições da área foliar e teor de clorofilas e com a limitação estomática da fotossíntese em *C. pachystachya*, e com a menor área foliar, limitação em parâmetros fotossintéticos e ao estresse oxidativo em *G. kunthiana*. *Cariniana estrellensis* foi a espécie que demonstrou maior tolerância ao  $\text{NH}_4^+$ , pois foi a única que não apresentou redução da área foliar e limitações da fotossíntese, o que propiciou o aumento do crescimento sob ML e AL no cultivo com  $\text{NH}_4^+$ , em relação à BL. O aumento da intensidade luminosa favoreceu o cultivo com  $\text{NO}_3^-$ , em relação ao  $\text{NH}_4^+$ , em mudas de espécies arbóreas neotropicais. A elucidação da preferência por  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  e a compreensão da toxicidade do  $\text{NH}_4^+$  em espécies arbóreas sob diferentes intensidades luminosas são importantes para a

restauração florestal porque auxiliam na escolha de espécies para reflorestamentos, uma vez que fonte de N e luz influenciam significativamente a sobrevivência das mudas no campo.

**Palavras-chave:** amônio; nitrato; metabolismo do nitrogênio; luz; toxicidade do amônio.

DEBIASI, Tatiane Viegas. **Nitrogen use plasticity in neotropical tree species of distinct functional groups grown under different light intensities**. 2022. 109 p. Thesis (Doctorate degree in Biological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

## ABSTRACT

Plants absorb nitrogen (N) from the soil mainly from the inorganic sources nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) and ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ). Energy consumption is higher when  $\text{NO}_3^-$  is assimilated, compared to direct use of  $\text{NH}_4^+$ . However,  $\text{NH}_4^+$  cannot be accumulated in large concentrations in cells due to its toxicity, so it is quickly assimilated into amino acids in the roots. Nitrogen assimilation depends on photosynthesis and, consequently, is influenced by light. This study aimed to verify the influence of light intensity on the N use by seedlings of neotropical tree species cultivated in hydroponics, using growth, photosynthetic and biochemical analyses. The species chosen were *Cecropia pachystachya* (a shade-intolerant species), *Guarea kunthiana* (a shade-tolerant understory species) and *Cariniana estrellensis* (a shade-tolerant canopy species). In the first experiment, it was evaluated whether light intensity induces the use of  $\text{NO}_3^-$ , in relation to  $\text{NH}_4^+$ , in seedlings cultivated with ammonium nitrate ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ). The incorporation of  $^{15}\text{N}$  into amino acids showed that *C. pachystachya* changed from a decelerated N metabolism under low light (LL) to an expressive use of both N sources under high light (HL), substantially increasing the concentration of  $^{15}\text{N}$ -amino acids derived from  $^{15}\text{NO}_3^-$  and  $^{15}\text{NH}_4^+$  in roots and leaves. *Guarea kunthiana* showed a very low  $\text{NO}_3^-$  use under LL, but significantly increased  $\text{NO}_3^-$  assimilation in roots and leaves under HL, showing high N use plasticity to light. In *C. estrellensis*, the increase in light intensity induced the assimilation of  $\text{NH}_4^+$  in the roots and  $\text{NO}_3^-$  in the leaves. These results showed that the responses in the N use strategies to light intensity were different in each species, and are compatible with their ecological characteristics. In the second experiment, we verified the effects of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  on seedlings growing under different light intensities. It was found that the three species showed decreased growth (dry mass) in the cultivation with  $\text{NH}_4^+$ , in relation to  $\text{NO}_3^-$ , under moderate luminosity (ML) and HL, but not under LL. This decrease was approximately 64% (ML) and 54% (HL) in *C. pachystachya*, 22% (ML) and 36% (HL) in *G. kunthiana* and 32% (ML) and 20% (HL) in *C. estrellensis*. The high energy and carbon drain imposed by the high rate of  $\text{NH}_4^+$  assimilation into amino acids, indicated by the increase in amino acid contents in roots and leaves of  $\text{NH}_4^+$ -fed plants, probably led to reduced growth under ML and HL in the three species. The hampered growth of seedlings with  $\text{NH}_4^+$  under ML and HL was also associated with decreases in leaf area and chlorophyll content and with stomatal limitation of photosynthesis in *C. pachystachya*, and with lower leaf area, limitation in photosynthetic parameters and oxidative stress in *G. kunthiana*. *Cariniana estrellensis* was the species that showed higher tolerance to  $\text{NH}_4^+$ , as it was the only one that did not show a reduction in leaf area or photosynthesis limitations, which provided an increased growth under ML and HL when growing with  $\text{NH}_4^+$ , compared to LL. In summary, the increase in light intensity favored the cultivation with  $\text{NO}_3^-$ , in relation to  $\text{NH}_4^+$ , in seedlings of neotropical tree species. The elucidation of the N use and the preference for  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  by plants, as well as understanding the  $\text{NH}_4^+$  toxicity causes in tree species under different light intensities are crucial for forest restoration and assist in the choice of species for reforestation, since these factors (N source and light) significantly influence the survival of seedlings in the field.

**Key words:** ammonium; ammonium toxicity; nitrate; nitrogen isotope; photosynthesis.

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1** - Esquema geral da assimilação do nitrogênio em plantas, particionada no citosol e plastídios (cloroplastos e amiloplastos). Baseado em Yoneyama e Suzuki (2020) e Baslam et al. (2021) .....21
- Figura 2** - Esquema geral da relação entre a assimilação primária de N e o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA). Baseado em Vega-Mas et al. (2019) e Baslam et al. (2021) .....26

### CAPÍTULO 1

- Figure 1** - Activity of nitrate reductase (NR) in roots (A) and leaves (B), and activity of glutamine synthetase (GS) in roots (C) and leaves (D) of *Cecropia pachystachya* (Cp), *Cariniana estrellensis* (Ce), and *Guarea kunthiana* (Gk) seedlings cultivated under lower light (LL) or higher light (HL) intensity. Data are means  $\pm$  SE ( $n = 4$ ). Asterisks indicate significant differences between light treatments, for each species, according to the Student's *t*-test ( $p < 0.05$ ).....40
- Figure 2** - Total content of free amino acids in roots (A) and leaves (B), and soluble proteins in roots (C) and leaves (D) of *Cecropia pachystachya* (Cp), *Cariniana estrellensis* (Ce), and *Guarea kunthiana* (Gk) seedlings cultivated under lower light (LL) or higher light (HL) intensity. Data are means  $\pm$  SE ( $n = 4$ ). Asterisks indicate significant differences between light treatments, for each species, according to the Student's *t*-test ( $p < 0.05$ ).....41
- Figure 3** - Relative amounts [in mol%] of individual amino acids, together with the relative molar concentration of total amino acids and  $\text{NO}_3^-$  in the xylem sap of *Cecropia pachystachya* (Cp), *Cariniana estrellensis* (Ce), and *Guarea kunthiana* (Gk) seedlings cultivated under lower light (LL) or higher light (HL) intensity. Data are means  $\pm$  SE ( $n = 4$ ). Asterisks indicate significant differences between light treatments, for each species, according to the Student's *t*-test ( $p < 0.05$ ). Only amino acids detected in an amount above 3% are shown: Ala, Arg, Asn, Asp,

	Gln, Glu, GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid), Pro, Ser, and Thr. The amino acids included in “Others” are Gly, Ile, Leu, Phe, Tyr, and Val.....	42
<b>Figure 4 -</b>	Total content of $^{15}\text{N}$ -enriched amino acids in roots and leaves of seedlings of <i>Cecropia pachystachya</i> (A), <i>Cariniana estrellensis</i> (B), and <i>Guarea kunthiana</i> (C) seedlings cultivated under lower light (LL) or higher light (HL) intensity in the presence of $^{15}\text{N}$ -labeled $\text{NO}_3^-$ or $\text{NH}_4^+$ (20% $^{15}\text{N}$ ). Data are means $\pm$ SE ( $n = 4$ ). Asterisks indicate significant differences between light treatments, for each species, according to the Student’s $t$ -test ( $p < 0.05$ ).....	48
<b>Figure 5 -</b>	Principal component analysis based on biochemical data obtained from seedlings <i>Cecropia pachystachya</i> (Cp), <i>Cariniana estrellensis</i> (Ce), and <i>Guarea kunthiana</i> (Gk) seedlings cultivated under lower light (LL) or higher light (HL) intensity. The biochemical variables used in the analysis were the activity of nitrate reductase (NR) and glutamine synthetase (GS), $\text{NO}_3^-$ content, total content of free amino acids (aa), soluble proteins (Prot) and $^{15}\text{N}$ -amino acids derived from $^{15}\text{NO}_3^-$ ( $^{15}\text{N}$ -aa_ $^{15}\text{NO}_3^-$ ) or $^{15}\text{NH}_4^+$ ( $^{15}\text{N}$ -aa_ $^{15}\text{NH}_4^+$ ) in roots (R) and leaves (L); and percentage of $\text{NO}_3^-$ and amino acids (aa) in the xylem sap (XS) .....	49
<b>Figure S1 -</b>	$\text{NO}_3^-$ contents in roots (A) and leaves (B) of <i>Cecropia pachystachya</i> (Cp), <i>Cariniana estrellensis</i> (Ce), and <i>Guarea kunthiana</i> (Gk) seedlings cultivated under lower light (LL) or higher light (HL) intensity.....	58
<b>Figure S2 -</b>	Relative amounts [in mol%] of individual amino acids and total amino acid content [in $\mu\text{mol g}^{-1}$ ] in the roots of <i>Cecropia pachystachya</i> (Cp), <i>Cariniana estrellensis</i> (Ce), and <i>Guarea kunthiana</i> (Gk) seedlings cultivated under lower light (LL) or higher light (HL) intensity. Data are means $\pm$ SE ( $n = 4$ ). Asterisks indicate significant differences between light treatments, for each species, according to the Student’s $t$ -test ( $p < 0.05$ ). Only amino acids detected in an amount above 3% are shown: Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid), Ser, and Thr. The amino acids included in “Others” are Gly, Ile, Leu, Phe, Pro, Tyr, and Val .....	59

**Figure S3 -** Relative amounts [in mol%] of individual amino acids and total amino acid content [in  $\mu\text{mol g}^{-1}$ ] in the leaves of *Cecropia pachystachya* (Cp), *Cariniana estrellensis* (Ce), and *Guarea kunthiana* (Gk) seedlings cultivated under lower light (LL) or higher light (HL) intensity. Data are means  $\pm$  SE ( $n = 4$ ). Asterisks indicate significant differences between light treatments, for each species, according to the Student's *t*-test ( $p < 0.05$ ). Only amino acids detected in an amount above 3% are shown: Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid), Pro, Ser, and Thr. The amino acids included in "Others" are Gly, Ile, Leu, Phe, Tyr, and Val.....60

## CAPÍTULO 2

**Figura 1 -** Área foliar (AF), massa seca total (MST) e razão massa seca raiz/parte aérea (R/PA) de mudas de *Cecropia pachystachya* (A-C), *Guarea kunthiana* (D-F) e *Cariniana estrellensis* (G-I) cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta (AL) luminosidade com nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fonte de nitrogênio. Os dados são médias  $\pm$  erros-padrão. Nas colunas brancas, asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos de N, de acordo com a ANOVA (teste *F*; \* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ;  $n = 27$ ). Nas colunas pretas, médias com letras iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de luz (*Tukey HSD*;  $P < 0,05$ ;  $n = 18$ ). Nas colunas cinzas, médias com letras maiúsculas ( $\text{NO}_3^-$ ) ou minúsculas ( $\text{NH}_4^+$ ) iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de luz, e asteriscos indicam diferença entre os tratamentos de N dentro de cada tratamento de luz (*Tukey HSD*;  $P < 0,05$ ;  $n = 9$ ).....70

**Figura 2 -** Teor de nitrogênio total ( $N_{\text{tot}}$ ) em raízes e folhas de mudas de *Cecropia pachystachya* (A-B), *Guarea kunthiana* (C-D) e *Cariniana estrellensis* (E-F) cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fonte de nitrogênio. Os dados são médias  $\pm$  erros-padrão. Nas colunas brancas, asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos de N, de acordo com a ANOVA (teste *F*; \* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ;  $n = 15$ ). Nas colunas pretas, médias com letras

iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de luz (*Tukey HSD*;  $P < 0,05$ ;  $n = 10$ ). Nas colunas cinzentas, médias com letras maiúsculas ( $\text{NO}_3^-$ ) ou minúsculas ( $\text{NH}_4^+$ ) iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de luz, e asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos de N dentro de cada tratamento de luz (*Tukey HSD*;  $P < 0,05$ ;  $n = 5$ ).....82

**Figura 3 -** Concentrações de dienos conjugados e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) nas raízes (A-B) e folhas (C-D) de mudas de *Cecropia pachystachya* cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fonte de nitrogênio. Os dados são médias  $\pm$  erros-padrão. Nas colunas brancas, asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos de N, de acordo com a ANOVA (teste *F*; \* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ;  $n = 15$ ). Nas colunas pretas, médias com letras iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de luz (*Tukey HSD*;  $P < 0,05$ ;  $n = 10$ ). Nas colunas cinzentas, médias com letras maiúsculas ( $\text{NO}_3^-$ ) ou minúsculas ( $\text{NH}_4^+$ ) .....87

**Figura 4 -** Concentrações de dienos conjugados e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) nas raízes (A-B) e folhas (C-D) de mudas *Guarea kunthiana* cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fonte de nitrogênio. Os dados são médias  $\pm$  erros-padrão. Nas colunas brancas, asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos de N, de acordo com a ANOVA (teste *F*; \* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ;  $n = 15$ ). Nas colunas pretas, médias com letras iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de luz (*Tukey HSD*;  $P < 0,05$ ;  $n = 10$ ). Nas colunas cinzentas, médias com letras maiúsculas ( $\text{NO}_3^-$ ) ou minúsculas ( $\text{NH}_4^+$ ) iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de luz, e asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos de N dentro de cada tratamento de luz (*Tukey HSD*;  $P < 0,05$ ;  $n = 5$ ).....88

**Figura 5 -** Concentrações de dienos conjugados e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) nas raízes (A-B) e folhas (C-D) de mudas de *Cariniana estrellensis* (E-F) cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade

(AL) com nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fonte de nitrogênio. Os dados são médias  $\pm$  erros-padrão. Nas colunas brancas, asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos de N, de acordo com a ANOVA (teste  $F$ ; \* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ;  $n = 15$ ). Nas colunas pretas, médias com letras iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de luz (*Tukey HSD*;  $P < 0,05$ ;  $n = 10$ ). Nas colunas cinzentas, médias com letras maiúsculas ( $\text{NO}_3^-$ ) ou minúsculas ( $\text{NH}_4^+$ ) iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de luz, e asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos de N dentro de cada tratamento de luz (*Tukey HSD*;  $P < 0,05$ ;  $n = 5$ ).....89

**Figura 6 -** Análise de componentes principais (PCA), com todas as variáveis utilizadas no estudo, de mudas de *Cecropia pachystachya* (Cp; A), *Guarea kunthiana* (Gk; B) e *Cariniana estrellensis* (Ce; C) cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ , sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade .92

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

- Table 1 -** Leaf area (LA), total dry weight (TDW), root-to-shoot ratio (RSR), and leaf area ratio (LAR) of *Cecropia pachystachya* (Cp), *Cariniana estrellensis* (Ce), and *Guarea kunthiana* (Gk) seedlings cultivated under lower light (LL) or higher light (HL) intensity. Data are the mean  $\pm$  SE ( $n = 8$ ). Asterisks indicate significant difference between light treatments, for each species, according to the Student's  $t$ -test ( $P < 0.05$ ).....39
- Table 2 -**  $^{15}\text{N}$  enrichment (%) in amino acids in roots and leaves of *Cecropia pachystachya* seedlings cultivated under lower light (LL) or higher light (HL) intensity in the presence of  $^{15}\text{N}$ -labeled  $\text{NO}_3^-$  or  $\text{NH}_4^+$  (20%  $^{15}\text{N}$ ). Data are means  $\pm$  SE ( $n = 4$ ). Asterisks indicate significant difference between light treatments, according to the Student's  $t$ -test ( $P < 0.05$ ). nd = not determined.....45
- Table 3 -**  $^{15}\text{N}$  enrichment (%) in amino acids in roots and leaves of *Cariniana estrellensis* seedlings cultivated under lower light (LL) or higher light (HL) intensity in the presence of  $^{15}\text{N}$ -labeled  $\text{NO}_3^-$  or  $\text{NH}_4^+$  (20%  $^{15}\text{N}$ ). Data are means  $\pm$  SE ( $n = 4$ ). Asterisks indicate significant difference between light treatments, according to the Student's  $t$ -test ( $p < 0.05$ ). nd = not determined .....46
- Table 4 -**  $^{15}\text{N}$  enrichment (%) in amino acids in roots and leaves of *Guarea kunthiana* seedlings cultivated under lower light (LL) or higher light (HL) intensity in the presence of  $^{15}\text{N}$ -labeled  $\text{NO}_3^-$  or  $\text{NH}_4^+$  (20%  $^{15}\text{N}$ ). Data are means  $\pm$  SE ( $n = 4$ ). Asterisks indicate significant difference between light treatments, according to the Student's  $t$ -test ( $p < 0.05$ ). nd = not determined .....47

### CAPÍTULO 2

- Tabela 1 -** Análises fotossintéticas de mudas de *Cecropia pachystachya* cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fonte de nitrogênio .....72

<b>Tabela 2 -</b>	Análises fotossintéticas de mudas de <i>Guarea kunthiana</i> cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fonte de nitrogênio .....	72
<b>Tabela 3 -</b>	Análises fotossintéticas de mudas de <i>Cariniana estrellensis</i> cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fonte de nitrogênio .....	73
<b>Tabela 4 -</b>	Variáveis de curvas $A-C_i$ de mudas de <i>Cecropia pachystachya</i> cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fonte de nitrogênio .....	74
<b>Tabela 5 -</b>	Variáveis de curvas $A-C_i$ de mudas de <i>Guarea kunthiana</i> cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fonte de nitrogênio .....	75
<b>Tabela 6 -</b>	Variáveis de curvas $A-C_i$ de mudas de <i>Cariniana estrellensis</i> cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fonte de nitrogênio .....	76
<b>Tabela 7 -</b>	Variáveis de curvas de resposta à luz de mudas de <i>C. pachystachya</i> cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fonte de nitrogênio .....	77
<b>Tabela 8 -</b>	Variáveis de curvas de resposta à luz de mudas de <i>G. kunthiana</i> cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fonte de nitrogênio .....	77
<b>Tabela 9 -</b>	Variáveis de curvas de resposta à luz de mudas de <i>C. estrellensis</i> cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fonte de nitrogênio .....	78
<b>Tabela 10 -</b>	Variáveis bioquímicas de raízes e folhas de mudas <i>C. pachystachya</i> cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fonte de nitrogênio .....	79
<b>Tabela 11 -</b>	Variáveis bioquímicas de raízes e folhas de mudas de <i>G. kunthiana</i> cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fonte de nitrogênio .....	80
<b>Tabela 12 -</b>	Variáveis bioquímicas de raízes e folhas de mudas de <i>C. estrellensis</i> cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fonte de nitrogênio .....	81

- Tabela 13** - Teor de nutrientes em raízes e folhas de mudas de *C. pachystachya* cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fonte de nitrogênio .....84
- Tabela 14** - Teor de nutrientes em raízes e folhas de mudas de *G. kunthiana* cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fonte de nitrogênio .....85
- Tabela 15** - Teor de nutrientes em raízes e folhas de mudas de *C. estrellensis* cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta (AL) luminosidade com nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fonte de nitrogênio .....86
- Tabela S1** - Valores de *F* e *P* da análise de variância (*ANOVA*) de dois fatores (fonte de N e luz) com as variáveis utilizadas no estudo ..... 102-108

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL	Alta luminosidade
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
ART	Açúcares redutores totais
Amax	Assimilação líquida de CO <sub>2</sub>
AF	Área foliar
BL	Baixa luminosidade
Ca	Cálcio
Ce	Cariniana estrellensis
Cp	Cecropia pachystachya
Ci	Concentração intercelular de CO <sub>2</sub>
Chl	Teor total de clorofilas
Cu	Cobre
$\epsilon$	eficiência de carboxilação
ETR	Taxa de transporte de elétrons do PSII
ETRmax	Taxa máxima de transporte de elétrons do PSII
Fe	Ferro
Fv/F0	Atividade potencial do fotossistema II
GC-MS	Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
Gk	Guarea kunthiana
gs	Condutância estomática
GS	Glutamina sintetase
gm	Condutância do mesófilo
GOGAT	Glutamato sintase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
J	Taxa de transporte de elétrons fotossintéticos
K	Potássio
Ls	Limitação estomática da fotossíntese

Mg	Magnésio
ML	Média luminosidade
Mn	Manganês
MST	Massa seca total
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Amônio
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrato
NR	Nitrato redutase
NiR	Nitrito redutase
NPQ	Quenching não fotoquímico
Ntot	Concentração total de nitrogênio
PCA	Análises de componentes principais
Pro	Prolina
PSLETR	Ponto de saturação luminoso da ETR
Rd	Taxa de respiração diurna
R/PA	Razão massa seca Raiz/Parte aérea
Rubisco	Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase
Ser	Serina
TPU	Taxa de utilização de trioses-fosfato
V <sub>max</sub>	Taxa de carboxilação máxima pela rubisco
Zn	Zinco
$\alpha$	Produtividade quântica aparente do fotossistema II

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	18
1.1	IMPORTÂNCIA DA RESTAURAÇÃO FLORESTAL .....	18
1.2	ASSIMILAÇÃO DO NITROGÊNIO .....	19
1.3	USO E ASSIMILAÇÃO DE $\text{NO}_3^-$ OU $\text{NH}_4^+$ .....	20
1.4	INFLUÊNCIA DA INTENSIDADE LUMINOSA NA TOLERÂNCIA AO $\text{NH}_4^+$ .....	24
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	26
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO 1 - NITROGEN USE PLASTICITY IN RESPONSE TO LIGHT INTENSITY IN NEOTROPICAL TREE SPECIES OF DISTINCT FUNCTIONAL GROUPS</b> .....	31
	INTRODUCTION.....	33
	MATERIALS AND METHODS.....	35
	RESULTS.....	38
	DISCUSSION.....	50
	REFERENCES.....	54
	SUPPLEMENTARY DATA .....	57
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO 2 - INFLUÊNCIA DA INTENSIDADE LUMINOSA NAS RESPOSTAS À FONTE DE NITROGÊNIO DE MUDAS DE ESPÉCIES ARBÓREAS NEOTROPICAIS DE GRUPOS FUNCIONAIS DISTINTOS</b> .....	60
	INTRODUÇÃO.....	61
	MATERIAL E MÉTODOS .....	62
	RESULTADOS.....	68
	DISCUSSÃO.....	92
	REFERÊNCIAS .....	97
	DADOS SUPLEMENTARES .....	101
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	108

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 Importância da restauração florestal

A restauração florestal por intermédio do reflorestamento é uma estratégia eficaz e urgente para a mitigação das mudanças climáticas globais, devido ao potencial de sequestro de CO<sub>2</sub> que as árvores possuem (Bastin et al., 2019). Porém, alguns programas de reflorestamento tendem a favorecer plantações de uma única espécie ao invés de restaurar a flora nativa, o que gera consequências negativas para a biodiversidade e equilíbrio hídrico do ambiente (Chazdon e Brancalion, 2019). Já o reflorestamento com mudas de espécies arbóreas nativas visa atingir múltiplos benefícios, como mitigação da crise climática, conservação da biodiversidade, reversão da degradação do solo, além de benefícios socioeconômicos (Chazdon e Brancalion, 2019; Andivia et al., 2021).

A Mata Atlântica é um *hotspot* de biodiversidade, com elevado número de espécies ameaçadas de extinção e com alto endemismo, inclusive de plantas vasculares, sendo uma prioridade a conservação de suas áreas (Rezende et al., 2018). Contudo, esse bioma possui apenas 12,4% de sua cobertura florestal original, que hoje está altamente fragmentada (SOS Mata Atlântica e INPE, 2021). As áreas remanescentes da Mata Atlântica possuem alto potencial de regeneração natural (Rezende et al., 2018). Porém, quando a degradação ambiental é intensa e a regeneração natural se torna ineficaz, ou seja, para áreas com alta compactação do solo, perda excessiva de matéria orgânica e escassez do banco de sementes no solo, é recomendada a restauração florestal ativa, como o plantio de mudas (Nunes et al., 2020).

Dessa forma, compreender os fatores que podem promover plantios bem sucedidos de mudas é crucial para uma restauração florestal efetiva (Ostertag et al., 2015). Um desses fatores é o uso de espécies nativas, adaptadas às condições locais (Nunes et al., 2020). Além disso, conhecer as demandas nutricionais das espécies selecionadas é necessário para a produção de mudas vigorosas e para maximizar sua sobrevivência e desenvolvimento nos reflorestamentos, pois os riscos de insucesso aumentam quando faltam informações sobre a adaptação e desempenho das espécies em relação aos atributos físicos e químicos do solo (Nunes et al., 2020).

Estudos que demonstraram a influência das fontes de nitrogênio (N) na distribuição espacial de espécies vegetais (Kronzucker et al., 1997; Aidar et al., 2003; Siddique et al., 2010; Dias et al., 2014) e no desenvolvimento de mudas (Oliveira et al.,

2017; Debiasi et al., 2019) evidenciam a importância de se compreender o metabolismo do N e os mecanismos de toxicidade do amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) em espécies arbóreas, bem como a tolerância de plantas a esse cátion.

Além do N, a luz é primordial ao desenvolvimento e sobrevivência de mudas (Quevedo-Rojas et al., 2018). A capacidade de se aclimatar a mudanças de intensidade luminosa é particularmente importante para mudas de espécies arbóreas tropicais, que inicialmente se estabelecem em locais com sombreamento profundo, mas estão sujeitas a aumentos repentinos de luminosidade por aberturas no dossel (Whitmore, 1989; Quevedo-Rojas et al., 2018). Enquanto a baixa luminosidade inibe o crescimento vegetal, luminosidades elevadas podem levar à fotoinibição e danos oxidativos (Pascual et al., 2017; Sharma et al., 2019). A luz também é essencial para o metabolismo do N, e o uso das principais formas minerais de N disponíveis para as plantas, nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e  $\text{NH}_4^+$ , pode ser influenciado por mudanças de intensidade luminosa (Oliveira et al., 2017; Pascual et al., 2017; Debiasi et al., 2019). Dessa forma, conhecer o metabolismo do N e a influência da luminosidade sobre o uso do N em mudas auxilia na escolha de espécies com maior potencial de sobrevivência em determinadas áreas de reflorestamento, sendo valioso para a restauração florestal.

### *1.2 Assimilação do nitrogênio*

O N é um nutriente que constitui cerca de 2% da massa seca vegetal, compondo moléculas orgânicas como aminoácidos, proteínas, clorofilas e ácidos nucleicos (Ali, 2020). As principais formas de nitrogênio inorgânico disponíveis às plantas no solo são  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  (Baslam et al., 2021). Suas proporções no solo dependem de vários fatores, incluindo o pH, acúmulo de compostos orgânicos, oxigenação, e microbiota do solo (Esteban et al., 2016; Vega-Mas et al., 2019). Solos com baixo pH e pouco aerados inibem a nitrificação, resultando em altas concentrações de  $\text{NH}_4^+$ , enquanto solos mais alcalinos e bem aerados tendem a ter maiores concentrações de  $\text{NO}_3^-$  (Liu e von Wirén, 2017). A tolerância ou preferência das plantas por  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  e a tolerância ao  $\text{NH}_4^+$  dependem do solo ao qual estão adaptadas (Ortigosa et al., 2020).

A absorção do  $\text{NO}_3^-$  pelas raízes ocorre de forma ativa por meio de cotransportadores  $\text{H}^+/\text{NO}_3^-$  de baixa ou alta afinidade (Wang et al., 2012). Já a absorção de  $\text{NH}_4^+$  ocorre por difusão através de canais proteicos, acompanhada pela extrusão de  $\text{H}^+$  por  $\text{H}^+\text{ATPase}$ , quando as concentrações externas desse íon são altas, e de forma

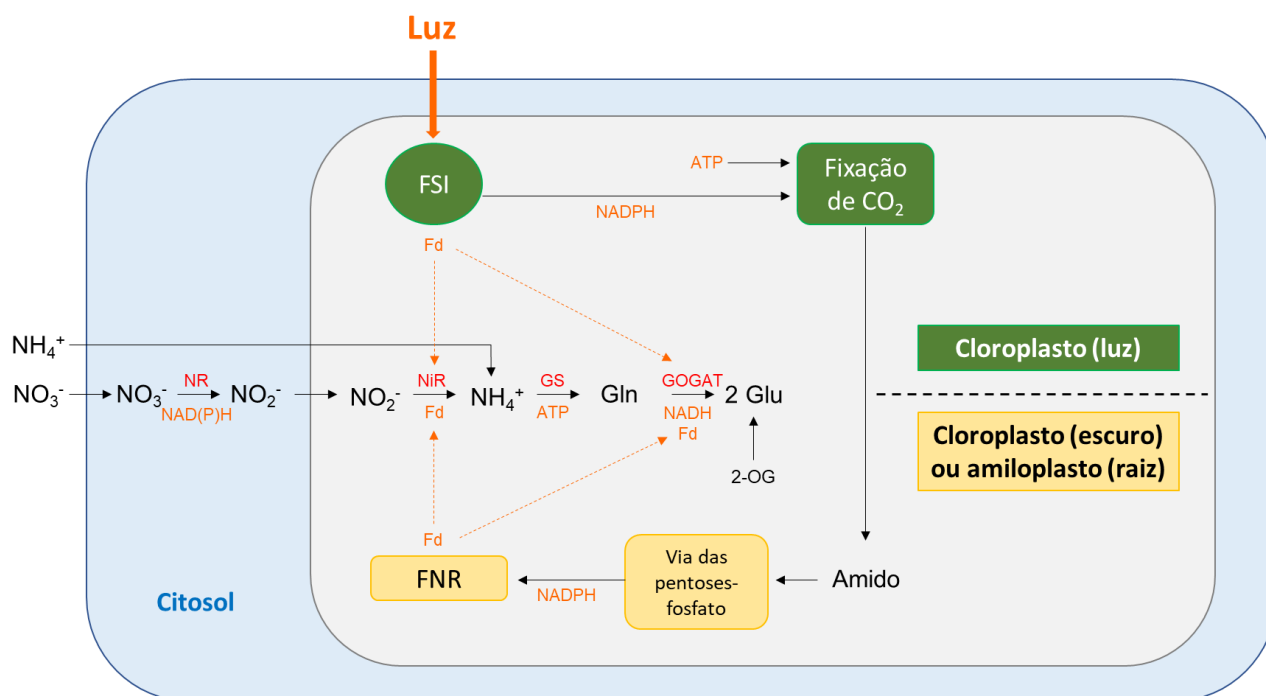
ativa através de transportadores quando as concentrações externas são baixas ( $< 50 \mu\text{M}$ ) (Estebán et al., 2016).

A assimilação do N (revisada em Ali, 2020, Yoneyama e Suzuki, 2020 e Baslam et al., 2021; Fig. 1) a partir do  $\text{NO}_3^-$  em moléculas orgânicas envolve sua redução pela enzima nitrato redutase (NR), usando dois elétrons de uma molécula de NADH ou NADPH e produzindo nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) no citosol. O nitrito é reduzido nos plastídios (cloroplastos e amiloplastos) pela enzima nitrito redutase (NiR), usando seis moléculas de ferredoxina reduzida (seis elétrons) e formando  $\text{NH}_4^+$ . A redução do  $\text{NO}_3^-$  é um processo energeticamente dispendioso, especialmente a reação catalisada pela NiR. A energia para esse processo vem da fotossíntese. A NiR depende da ferredoxina, que é diretamente reduzida pela cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese nos tecidos fotossintéticos, pelo fotossistema I (FSI), ou indiretamente reduzida pela ferredoxina-NADP<sup>+</sup> oxidoreductase (FNR) nos amiloplastos de tecidos não fotossintéticos, usando NADPH, por sua vez reduzido a partir de fotoassimilados transportados da parte aérea à raiz. O  $\text{NH}_4^+$  é assimilado pela ação sequencial da glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT). A GS produz glutamina (Gln) a partir do glutamato (Glu) e  $\text{NH}_4^+$ , usando uma molécula de ATP. A Gln é usada pela GOGAT com 2-oxoglutarato para produzir duas moléculas de Glu, usando poder redutor do NADH ou ferredoxina. Em resposta a altos níveis de  $\text{NH}_4^+$ , a enzima mitocondrial NADH-glutamato desidrogenase (GDH) pode incorporar  $\text{NH}_4^+$  em 2-oxoglutarato (Bittsánszky et al., 2015), mas a principal rota de assimilação de  $\text{NH}_4^+$  é o ciclo GS/GOGAT (Crawford et al., 2000 e Ohyama et al., 2017). Todas as demais moléculas orgânicas com N são derivadas da Gln ou Glu produzidos nesse ciclo (Buchanan et al., 2015).

### *1.3 Uso e assimilação de $\text{NO}_3^-$ ou $\text{NH}_4^+$*

O  $\text{NO}_3^-$  pode ser armazenado nos vacúolos em elevadas concentrações sem causar toxicidade às plantas (Liu et al., 2014). Esse ânion é acumulado em diferentes órgãos, dependendo da espécie, e é remobilizado dos vacúolos para ser reduzido sob condições adequadas de luz, quando a fotossíntese é ativa, pois sua redução é vinculada à energia gerada no processo fotossintético (Baslam et al., 2021). Já o  $\text{NH}_4^+$  em excesso é tóxico para a maioria das espécies vegetais (Britto e Kronzucker, 2002). Entre os sintomas causados pelo excesso de  $\text{NH}_4^+$  estão a clorose, inibição da fotossíntese, aumento do estresse oxidativo, diminuição da absorção de cátions, como potássio ( $\text{K}^+$ ), cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), a supressão do crescimento, diminuição da razão

raiz/parte aérea e até mesmo a morte (Britto e Kronzucker, 2002; Esteban et al., 2016; Ortigosa et al., 2020).



**Figura 1** Esquema geral da assimilação do nitrogênio em plantas, particionada no citosol e plastídios (cloroplastos e amiloplastos). Baseado em Yoneyama e Suzuki (2020) e Baslam et al. (2021).

Um das principais causas da toxicidade do  $\text{NH}_4^+$  são a acidificação da rizosfera e a diminuição das concentrações de cátions nos tecidos vegetais (Jian et al., 2018). A acidificação da rizosfera ocorre porque a absorção de  $\text{NH}_4^+$  sob altas concentrações é acompanhada pela extrusão de prótons pela  $\text{H}^+$ -ATPase da membrana plasmática (Hu et al., 2019). Inclusive, a adição ou presença de  $\text{NO}_3^-$  na rizosfera atenua a toxicidade do  $\text{NH}_4^+$ , pois aumenta o pH rizosférico, uma vez que o  $\text{NO}_3^-$  é co-transportado com prótons ao citosol por transportadores de  $\text{NO}_3^-$  (Wang, 2021). Quanto à concentração de cátions, de la Peña et al. (2019) verificaram a diminuição do conteúdo de K, Ca e Mg nas raízes de *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv, enquanto Carr et al. (2020) relataram a diminuição do conteúdo de K e Ca nas folhas de *Coffea arabica* (L.) (café), além do aumento da atividade da  $\text{H}^+$ -ATPase em plantas tratadas com  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao  $\text{NO}_3^-$ . O maior bombeamento de prótons para fora das células da raiz pela  $\text{H}^+$ -ATPase é necessário para que haja um balanço de cargas e a repolarização da membrana, permitindo que as plantas absorvam cátions do meio externo (Carr et al., 2020; Feng et al., 2020). O balanço de cargas é essencial para a absorção de qualquer íon, sendo que o desbalanço gerado pela absorção em excesso e acúmulo de  $\text{NH}_4^+$  na

raiz interfere na absorção de outros cátions, sendo o mais estudado o  $K^+$  (Feng et al., 2020).

A raiz geralmente é o principal órgão de assimilação de  $NH_4^+$  obtido do solo e atuam como uma barreira fisiológica ao seu transporte para as folhas, onde, em excesso, pode afetar o aparelho fotossintético (Vega-Mas et al., 2019). Uma das principais estratégias que evitam o acúmulo de  $NH_4^+$  nos tecidos é a sua rápida assimilação em moléculas orgânicas na raiz pela intensificação da via GS/GOGAT, levando ao acúmulo de aminoácidos (Bernard e Habash, 2009; Vega-Mas et al., 2019). Para isso, é necessário um elevado suprimento de esqueletos de carbono (C), provenientes do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e rotas associadas, o que resulta na restrição do crescimento vegetal (Vega-Mas et al., 2019).

O resultado dessa estratégia é o aumento dos teores de aminoácidos e proteínas nos tecidos vegetais (Vega-Mas et al. 2017, de la Peña et al., 2019). Os principais aminoácidos acumulados variam de acordo com a espécie, embora Glu, Gln, aspartato (Asp), asparagina (Asn), alanina (Ala), prolina (Pro), serina (Ser) e glicina (Gly) sejam os mais comuns (Vega-Mas et al. 2017, de la Peña et al., 2019). É importante ressaltar que Gln e Asn são os principais aminoácidos de armazenamento e transporte de N pelo xilema, pois possuem dois átomos de N em cada molécula (Baslam et al., 2021). A arginina (Arg) também é adequada ao armazenamento de N, devido à sua baixa razão C/N (=1,5) (Carr et al., 2020; Baslam et al., 2021).

Em *Arabidopsis thaliana*, Hachiya et al. (2021) verificaram que a principal causa de toxicidade do  $NH_4^+$  é a acidificação intra e extracelular nas folhas. A assimilação do  $NH_4^+$  pela GS plastídica para formar Gln libera prótons, que se acumulam no interior e exterior das células, causando estresse por acidez. Os autores também verificaram que a assimilação de  $NH_4^+$  nas raízes é importante, pois impede a translocação excessiva de  $NH_4^+$  para a parte aérea, evitando essa acidificação.

O  $NH_4^+$  pode ser translocado à parte aérea pela seiva do xilema e assimilado nas folhas (Hachiya e Sakakibara, 2017), mas se acumulado nesse órgão o  $NH_4^+$  pode inibir a fotossíntese, ligando-se ao complexo de liberação de oxigênio e danificando o fotossistema II e/ou causando estresse oxidativo nas folhas (Drath et al., 2008; Podgórska et al., 2013). A diminuição da taxa fotossintética reduz a síntese e transporte de carboidratos para as raízes, resultando na falta de energia e de esqueletos carbônicos para assimilar o  $NH_4^+$ , o que pode agravar os sintomas do estresse por  $NH_4^+$  (Setién et al., 2013).

Devido aos diferentes efeitos que o  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  geram nas plantas, tanto a quantidade quanto a forma de N disponível favorecem o crescimento de algumas espécies, em detrimento de outras, sendo este nutriente determinante na distribuição espacial de espécies vegetais (Aidar et al., 2003; Siddique et al., 2010; Dias et al., 2014; Mao et al., 2018). Kronzucker et al. (1997) demonstraram que a baixa capacidade de utilização do  $\text{NO}_3^-$  por plântulas de *Picea glauca* (Moench) Voss (pinheiro-do-Canadá) dificultava seu estabelecimento em áreas degradadas com predominância de  $\text{NO}_3^-$ . Em um estudo com espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica, Aidar et al. (2003) verificaram que espécies pioneiras (intolerantes à sombra) apresentam alta capacidade de assimilação de  $\text{NO}_3^-$  nas folhas, indicada pela elevada atividade da enzima NR nesse órgão, ao contrário de espécies tolerantes à sombra. Experimentos com mudas de espécies arbóreas da Mata Atlântica observaram que espécies intolerantes à sombra crescem a uma taxa elevada quando supridas com  $\text{NO}_3^-$ , mas podem apresentar efeitos severos de toxicidade quando tratadas com  $\text{NH}_4^+$  como fonte exclusiva de N, restringindo seu crescimento (Oliveira et al., 2017; Debiasi et al., 2019). Por outro lado, espécies tolerantes à sombra são mais aptas a se desenvolverem com ambas as fontes de N ( $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ ) sob condições não limitantes de luz, apresentando alta tolerância ao  $\text{NH}_4^+$ , que é assimilado rapidamente em aminoácidos na raiz (Oliveira et al., 2017; Debiasi et al., 2019).

Trabalhos anteriores que avaliaram as mesmas espécies escolhidas para esta tese indicaram que mudas de *Guarea kunthiana* A. Juss. (Meliaceae) assimilam  $\text{NO}_3^-$  principalmente nas raízes, enquanto *Cecropia pachystachya* Trécul (Urticaceae) e *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze (Lecythidaceae) assimilam esse ânion principalmente nas folhas (Oliveira et al., 2017). Além disso, *G. kunthiana* transloca níveis relativamente elevados de  $\text{NH}_4^+$  para as folhas e, possivelmente, o assimila em quantidades razoáveis nesse órgão (Oliveira et al., 2017). As três espécies demonstraram tolerância moderada ao  $\text{NH}_4^+$  (Oliveira et al., 2017).

*Cecropia pachystachya* é uma típica espécie intolerante à sombra, com elevadas taxas de crescimento e fotossíntese (Oliveira et al., 2017; Debiasi et al., 2021). Tem ampla distribuição geográfica e ocupa, inclusive, solos encharcados (Batista et al., 2008), que costumam ter altos níveis de  $\text{NH}_4^+$  (Liu e von Wirén, 2017). *Cariniana estrellensis* e *G. kunthiana* são intolerantes à sombra, mas *C. estrellensis* é uma espécie que atinge o dossel e apresenta maior demanda de luz do que *G. kunthiana*, uma espécie típica de sub-bosque (Aird-Wood et al. 2021). Espécies pioneiras, intolerantes à

sombra e de rápido crescimento, são caracterizadas por terem alta demanda por luz e apresentarem elevadas taxas fotossintéticas, de respiração e de absorção de nutrientes, além de alto potencial de produção de fotoassimilados e alta concentração de N em seus tecidos (Prado-Junior et al., 2016). Já espécies tolerantes à sombra são adaptadas a ambientes com menos luz e apresentam menores taxas fotossintéticas, de respiração e de crescimento (Prado-Junior et al., 2016). Dessa forma, em estudos que avaliam a influência da intensidade luminosa sobre o uso do N, é crucial a escolha de espécies vegetais com diferentes demandas por luz.

#### *1.4 Influência da intensidade luminosa na tolerância ao $NH_4^+$*

A luz é a fonte de energia para a absorção e assimilação do N (Yoneyama e Suzuki, 2020). A intensidade luminosa influencia expressivamente características anatômicas, morfológicas, fisiológicas e bioquímicas das plantas (Poorter et al., 2019). Esses autores mostraram as variáveis mais influenciadas pela luz, de acordo com uma ampla variedade de estudos e espécies vegetais. De maneira geral, quanto maior a intensidade luminosa à qual a planta é submetida durante o seu crescimento, maiores são a massa seca total da planta, número de ramificações do caule, espessura foliar, massa por unidade de área foliar e a densidade foliar, resultante da diminuição do volume de espaços de ar e paredes celulares mais espessas, e menores são os comprimentos da raiz e do caule por unidade de massa seca. Fisiologicamente, a luz induz aumentos na taxa fotossintética, condutância estomática, concentração de ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (rubisco) por unidade de área foliar, taxa de carboxilação da rubisco, taxa de transporte de elétrons e taxa de respiração nas folhas, mas diminui a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) (Poorter et al., 2019). Quanto à bioquímica, o aumento de luminosidade aumenta o teor total de N por unidade de área foliar, o teor de C nos órgãos vegetativos e o teor de carboidratos não estruturais, e diminui o teor de  $NO_3^-$  nas folhas (Poorter et al., 2019).

Tanto a falta quanto o excesso de luz são estressantes para as plantas. O crescimento vegetal é negativamente afetado sob luminosidades extremamente baixas, devido à insuficiência de energia, o que limita a taxa fotossintética e, conseqüentemente, inibe o metabolismo do C e do N (Pascual et al., 2017). Por outro lado, luminosidades muito altas, que superam o ponto de saturação luminoso, sobrecarregam os complexos coletores de luz, gerando espécies reativas de oxigênio (ERO) e levando à fotoinibição (Sharma et al., 2019).



**Figura 2** Esquema geral da relação entre a assimilação primária de N e o ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Baseado em Vega-Mas et al. (2019) e Baslam et al. (2021).

Em *Brassica pekinensis* (Lour.) Rupr. (couve-chinesa), a adição moderada de  $\text{NH}_4^+$  junto ao  $\text{NO}_3^-$  aumentou a tolerância (aumento da fotossíntese e carboidratos não estruturais) à baixa luminosidade, em comparação com o cultivo exclusivamente com  $\text{NO}_3^-$ , provavelmente devido ao menor gasto energético para assimilar o  $\text{NH}_4^+$  sob uma condição de luminosidade limitante à assimilação de C (Hu et al., 2017).

No trigo (*Triticum aestivum* L. var. *Cezanne*), espécie tolerante ao  $\text{NH}_4^+$ , Setién et al. (2013) verificaram sintomas causados por toxicidade deste cátion, como a diminuição da fotossíntese, do crescimento e da razão raiz/parte aérea, em relação ao tratamento com  $\text{NO}_3^-$ , sob baixa luminosidade ( $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Porém, sob alta luminosidade ( $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), a fotossíntese e a razão raiz/parte aérea se igualaram ao tratamento com  $\text{NO}_3^-$ . Os autores atribuíram a falta de fotoassimilados como a principal causa da supressão do crescimento com  $\text{NH}_4^+$  sob baixa luminosidade. Sob alta luminosidade, a maior produção de fotoassimilados nas folhas e seu transporte para as raízes, aumentando a disponibilidade de C a partir de intermediários do TCA, levou à maior assimilação do  $\text{NH}_4^+$ , evitando seu acúmulo e evitando efeitos nocivos deste cátion.

Não há estudos que avaliam os efeitos da variação de luminosidade em mudas de espécies arbóreas neotropicais cultivadas com uma única fonte de N ( $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ ). Dessa forma, é difícil prever as respostas de mudas sob essas condições, pois ao mesmo tempo que o  $\text{NO}_3^-$  tem um alto gasto energético para ser assimilado, o cultivo com  $\text{NH}_4^+$  envolve sua rápida assimilação em moléculas orgânicas, que também é altamente dispendiosa.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi verificar a influência da intensidade luminosa no uso do N por mudas de espécies arbóreas neotropicais - *Cecropia pachystachya* (intolerante à sombra), *Guarea kunthiana* (tolerante à sombra, de sub-bosque) e *Cariniana estrellensis* (tolerante à sombra, que atinge o dossel) - cultivadas em hidroponia, por meio de análises de crescimento, fotossintéticas e bioquímicas.

No primeiro capítulo, objetivou-se avaliar os efeitos da intensidade luminosa no metabolismo do N, especificamente sobre o uso de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  pelas mudas. No

segundo capítulo, objetivou-se verificar os efeitos das diferentes fontes de N ( $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ ) sobre o crescimento, fotossíntese e metabolismo das mudas, sob variações de intensidade luminosa.

## Referências

- Aidar MPM, Schmidt S, Moss G, Stewart GR, Joly CA (2003) Nitrogen use strategies of neotropical rainforest trees in threatened Atlantic Forest. *Plant Cell Environ* 26: 389-399
- Airald-Wood K, de Molas LP, González- Soria L (2021) First record of *Itapotihyla langsdorffii* for Caaguazu Department (Paraguay) and observations on another endemic species of the Atlantic forest. *Kempffiana* 17: 22-29
- Ali A (2020) Nitrate assimilation pathway in higher plants: critical role in nitrogen signaling and utilization. *Plant Sci Today* 7: 182-192
- Andivia E, Villar-Salvador P, Oliet JA, Puértolas J, Dumroese RK, Ivetic V, Molina-Venegas R, Arellano EC, Li G, Ovalle JF (2021) Climate and species stress resistance modulate the higher survival of large seedlings in forest restorations worldwide. *Ecol Appl* 31: e02394
- Baslam M, Mtsui T, Sueyoshi K, Ohyama T (2021) Recent Advances in Carbon and Nitrogen Metabolism in C3 Plants. *Int J Mol Sci* 22: 318
- Bastin JF, Finegold T, Garcia C, Mollicone D, Rezende M, Routh D, Zohner CM, Crowther TW (2019) The global tree restoration potential. *Restor Ecol* 365: 76-79
- Batista CUN, Medri ME, Bianchini E, Medri C, Pimenta JA (2008) Flood tolerance in *Cecropia pachystachya* Trec. (Cecropiaceae): ecophysiological and morpho-anatomical aspects. *Acta Bot* 22: 91-98
- Bernard SM, Habash D Z (2009) The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. *New Phytol* 182: 608-620
- Bittsánszky A, Pilinszky K, Gyulai G, Komives T (2015) Overcoming ammonium toxicity. *Plant Sci* 231: 184-190
- Britto DT, Kronzucker HJ (2002)  $\text{NH}_4^+$  toxicity in higher plants: a critical review. *J Plant Physiol* 159: 567-584
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (2015) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. John Wiley & Sons, Chichester
- Chazdon R, Brancalion P (2019) Restoring forests as a means to many ends. *Science* 365: 24-25
- Debiasi TV, Calzavara AK, da Silva LMI, da Silva JG, Bianchini E, Pimenta JA, Stolf-Moreira R, Aidar MPM, Sodek L, Oliveira HC (2019) Nitrogen metabolism of Neotropical tree seedlings with contrasting ecological characteristics. *Acta Physiol Plant* 41: 131
- de la Peña M, González-Moro MB, Marino D (2019) Providing carbon skeletons to sustain amide synthesis in roots underlines the suitability of *Brachypodium distachyon* for the study of ammonium stress in cereals. *AoB Plants* 11: 1-11

- Dias T, Clemente A, Martins-Loução MA, Sheppard L, Bobbink R, Cruz C (2014) Ammonium as a driving force of plant diversity and ecosystem functioning: observations based on 5 years' manipulation of N dose and form in a Mediterranean ecosystem. *Plos One* 9: e92517
- Drath M, Kloft N, Batschauer A, Marin K, Novak J, Forchhammer K (2008) Ammonia triggers photodamage of photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *J Plant Physiol* 147: 206-215
- Esteban R, Ariz I, Cruz C, Moran JF (2016) Review: mechanisms of ammonium toxicity and the quest for tolerance. *Plant Sci* 248: 92-101
- Hachiya T, Inaba J, Wakazaki M, Sato M, Toyooka K, Miyagi A, Kawai-Yamada M, Sugiura D, Nakagawa T, Kiba T, Gojon A, Sakakibara H (2021) Excessive ammonium assimilation by plastidic glutamine synthetase causes ammonium toxicity in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Commun* 12: 4944
- Hachiya T, Sakakibara H (2017) Interactions between nitrate and ammonium in their uptake, allocation, assimilation, and signaling in plants. *J Exp Bot* 68: 2501-2512
- Hu L, Liao W, Dawuda MM, Yu J, Ly J (2017) Appropriate  $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$  ratio improves low light tolerance of mini Chinese cabbage seedlings. *BMC Plant Biol* 17: 22
- Hu AY, Zheng MM, Sun LM, Zhao XQ, Shen RF (2019) Ammonium alleviates manganese toxicity and accumulation in rice by down-regulating the transporter gene *OsNramp5* through rhizosphere acidification. *Front Plant Sci* 10: 1194
- Jian S, Liao Q, Song H, Liu Q, Lepo JE, Guan C, Zhang J, Ismail AM, Zhang Z (2018) NRT1.1-Related  $\text{NH}_4^+$  toxicity is associated with a disturbed balance between  $\text{NH}_4^+$  uptake and assimilation. *J Plant Physiol* 178: 1473-1488
- Kronzucker HJ, Siddiqi MY, Glass ADM (1997) Conifer root discrimination against soil nitrate and the ecology of forest succession. *Nature* 385: 59-61
- Liu XY, Koba K, Makabe A, Liu CQ (2014) Nitrate dynamics in natural plants: insights based on the concentration and natural isotope abundances of tissue nitrate. *Front Plant Sci* 5: 355
- Liu Y, Von-Wirén N (2017) Ammonium as a signal for physiological and morphological responses in plants. *J Exp Bot* 68: 2581-2592
- Mao Q, Lu X, Mo H, Gundersen P, Mo J (2018) Effects of simulated N deposition on foliar nutrient status, N metabolism and photosynthetic capacity of three dominant understory plant species in a mature tropical forest. *Sci Total Environ* 610-611: 555-562
- Nunes S, Gastauer M, Cavalcante RBL, Ramos SJ, Caldeira CF, Silva D, Rodrigues RR, Salomão R, Oliveira M, Souza-Filho PWM, Siqueira JO (2020) Challenges and opportunities for large-scale reforestation in the Eastern Amazon using native species. *For Ecol Manag* 466: 118-120
- Oliveira HC, Silva LMI, Freitas LD, Debiassi TV, Marchiori NM, Aidar MPM, Bianchini E, Pimenta JA, Stolf-Moreira R (2017) Nitrogen use strategies of seedlings from neotropical tree species of distinct successional groups. *Plant Physiol Biochem* 114: 119-127

- Ortigosa F, Valderrama-Martin JM, Urbano-Gómez JA, Garcia-Martin ML, Ávila C, Cánovas FM, Cañas RA (2020) Inorganic nitrogen form determines nutrient allocation and metabolic responses in Maritime Pine seedlings. *Plants* 9: 481
- Ostertag R, Warman L, Cordell S, Vitousek PM (2015) Using plant functional traits to restore Hawaiian rainforest. *J Appl Ecol* 52: 805-809
- Pascual J, Rahikainen M, Kangasjärvi S (2017) Plant light stress. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001319.pub3>
- Piñero MC, Pérez-Jiménez M, López-Marín J, Varó P, del Amor FM (2018) Differential effect of the nitrogen form on the leaf gas exchange, amino acid composition, and antioxidant response of sweet pepper at elevated CO<sub>2</sub>. *Plant Growth Regul* 86: 37-48
- Podgórska A, Gieczewska K, Lukawska-Kuzma K, Rasmusson AG, Gardeström P, Szal B (2013) Long-term ammonium nutrition of *Arabidopsis* increases the extrachloroplastic NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> ratio and mitochondrial reactive oxygen species level in leaves but does not impair photosynthetic capacity. *Plant Cell Environ* 36: 2034-2045
- Poorter H, Niinemets U, Ntagkas N, Siebenkas A, Maenpaa M, Matsubara S, Pons TL (2019) A meta-analysis of plant responses to light intensity for 70 traits ranging from molecules to whole plant performance. *New Phytol* 223: 1073-1105
- Prado-Junior JA, Schiavini I, Vale VS, Arantes CS, van der Sande MT, Lohbeck M, Poorter L (2016) Conservative species drive biomass productivity in tropical dry forests. *J Ecol* 104: 817-827
- Quevedo-Rojas A, García-Núñez C, Jerez-Rico M, Jaimez R, Schwarzkopf T (2018) Leaf acclimation strategies to contrasting light conditions in saplings of different shade tolerance in a tropical cloud forest. *Funct Plant Biol* 45: 968-982
- Rezende CL, Scarano FR, Assad ED, Joly CA, Metzger JP, Strassburg BBN, Tabarelli M, Fonseca GA, Mittermeier RA (2018) From hotspot to hopespot: an opportunity for the Brazilian Atlantic Forest. *Perspect Ecol Conserv* 16: 208-214
- Roosta HR, Schjoerring K (2008) Root carbon enrichment alleviates ammonium toxicity in cucumber plants. *J Plant Nutr* 31: 941-58
- Rubio-Asensio JS, Bloom AJ (2017) Inorganic nitrogen form: a major player in wheat and *Arabidopsis* responses to elevated CO<sub>2</sub>. *J Exp Bot* 68: 2611-2625
- Sharma A, Kumar V, Shahzad B, Ramakrishnan M, Sidhu GPS, Bali AS, Handa N, Kapoor D, Yadav P, Khanna K, Bakshi P, Rehman A, Kohli SK, Khan EA, Parihar RD, Yuan H, Thukral AK, Bhardwaj R, Zheng B (2019) Photosynthetic response of plants under different abiotic stresses: a review. *Plant Growth Regul* 39: 509-531
- Sétien I, Fuertes-Mendizabal T, González A, Aparicio-Tejo PM, González-Murua C, González-Moro MB, Estavillo JM (2013) High irradiance improves ammonium tolerance in wheat plants by increasing N assimilation. *J Plant Physiol* 170: 758-771
- Siddique I, Vieira IC, Schmidt S, Lamb D, Carvalho CJR, Figueiredo RO, Blomberg S, Davidson EA (2010) Nitrogen and phosphorus additions negatively affect tree species diversity in tropical forest regrowth trajectories. *Ecology* 91: 2121-2131
- SOS Mata Atlântica, INPE (2021) Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica: período 2019-2020. SOS Mata Atlântica e INPE, São Paulo

- Vega-Mas I, Cukier C, Coletto I, González-Murua C, Limami AM, González-Moro MB, Marino D (2019) Isotopic labelling reveals the efficient adaptation of wheat root TCA cycle flux modes to match carbon demand under ammonium nutrition. *Sci Rep* 9: 8925
- Vega-Mas I, Pérez-Delgado CM, Marino D, Fuertes-Mendizábal T, González-Murua C, Márquez AJ, Betti M, Estavillo JM, González-Moro MB (2017) Elevated CO<sub>2</sub> induces root defensive mechanisms in tomato plants when dealing with ammonium toxicity. *Plant Cell Physiol* 58: 2112-2125
- Wang P (2021) Friend or foe: how nitrate antagonizes ammonium toxicity. *J Plant Physiol* 186: 210-211
- Whitmore TC (1989) Canopy gaps and two major groups of trees. *Ecology* 66: 682-687

### 3. CAPÍTULO 1 - Nitrogen use plasticity in response to light intensity in neotropical tree species of distinct functional groups

Tatiane Viegas Debiasi<sup>1</sup>, Anderson Kikuchi Calzavara<sup>1</sup>, Ladaslav Sodek<sup>2</sup>, Halley Caixeta de Oliveira<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal and Plant Biology, UEL—Londrina State University, Londrina, PR, Brazil

<sup>2</sup>Department of Plant Biology, UNICAMP – State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

\*Correspondence: [halley@uel.br](mailto:halley@uel.br)

**Esse artigo foi publicado na revista *Physiologia Plantarum***

<https://doi.org/10.1111/ppl.13470>

**Regras:**

<http://physiologiaplantarum.org/instructions-for-manuscrip/>

#### Abstract

Environmental conditions influence the use of different nitrogen (N) sources by plants. We hypothesized that the increase in light intensity favors the use of  $\text{NO}_3^-$  relative to that of  $\text{NH}_4^+$  by seedlings of neotropical tree species from different functional groups: *Cecropia pachystachya* (a shade-intolerant species), *Cariniana estrellensis* (a shade-tolerant canopy species) and *Guarea kunthiana* (a shade-tolerant understory species). We analyzed growth and N metabolism in seedlings simultaneously provided with  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$ , under lower (LL) and higher (HL) light intensity.  $^{15}\text{N}$  incorporation into amino acids was monitored after incubation with  $^{15}\text{N}$ -labeled  $\text{NH}_4^+$  or  $\text{NO}_3^-$ . Under HL, all species showed decreased leaf area ratio, and increased growth, nitrate reductase activity, and assimilated N content. *Cecropia pachystachya* increased the use of both N sources under HL, with substantial increases in  $^{15}\text{N}$ -amino acids derived from  $^{15}\text{NO}_3^-$  (12.5- and 4.0- fold in roots and leaves, respectively) and  $^{15}\text{NH}_4^+$  (4.5- and 3.0-fold in roots and leaves, respectively). *Guarea kunthiana* showed the greatest plasticity in N use, as the assimilation of  $^{15}\text{NO}_3^-$  in roots and leaves increased substantially under HL (11.2-fold and 17.0-fold, respectively). *Cariniana estrellensis* increased the assimilation of  $^{15}\text{NH}_4^+$  in roots and  $^{15}\text{NO}_3^-$  in leaves under HL. Therefore, the responses of N use strategies to light intensity varied with the species according to their ecological characteristics.

#### Abbreviations

Ala, Alanine; Arg, Arginine; Asn, Asparagine; Asp, Aspartate; *Ce*, *Cariniana estrellensis*; *Cp*, *Cecropia pachystachya*; Gln, Glutamine; Glu, Glutamate; *Gk*, *Guarea kunthiana*; GC-MS, chromatography-mass spectrometer; GS, Glutamine synthetase; HL, Higher light intensity; LAR, Leaf area ratio; LL, Lower light intensity;  $\text{NH}_4^+$ , Ammonium;  $\text{NO}_3^-$ , Nitrate; NR, Nitrate reductase; PCA, Principal component analysis;

Pro, Proline; Ser, Serine; RSR, Root-to-shoot ratio; LA, Total leaf area; TDW, Total dry weight.

## Introduction

Plants mainly absorb nitrogen (N) in the inorganic forms of nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) and ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ). The processes of absorption and assimilation of mineral N involve high energy expenditure by plant cells, which is greater when  $\text{NO}_3^-$  is used. In comparison with the direct assimilation of  $\text{NH}_4^+$ , the use of  $\text{NO}_3^-$  involves two additional reduction steps that demand energy, catalyzed by the enzymes nitrate reductase (NR) and nitrite reductase (NiR) (Hachiya and Sakakibara 2017; Ali, 2020). On the other hand, while  $\text{NO}_3^-$  can be stored in high concentrations in plant cells,  $\text{NH}_4^+$  can lead to toxic effects when accumulated, imposing an important trade-off between the use of the two N forms (Boudsocq et al. 2012). The mechanisms of tolerance to  $\text{NH}_4^+$  involve its rapid assimilation into amino acids, which requires a large carbon source, and the activation of plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase, important to maintain the membrane potential as  $\text{NH}_4^+$  is absorbed, which may also result in energy expenditure by the plant (Andrews et al. 2013, Esteban et al. 2016, Liu and von Wirén 2017).

In different ecosystems, environmental conditions (such as temperature, light, soil pH, and oxygen levels) result in different proportions of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  content in the soil. Different ratios between the soil content of these two mineral N sources can be found depending on the successional stage of the ecosystem (Britto and Kronzucker 2002). Thus, plasticity in the use of N could be an adaptive strategy, giving plants a competitive advantage, as they can meet their demands for N from any available N source (Ashton et al. 2010, Daryanto et al. 2019). The strategy for using N can be shifted in response to environmental variations. For example, higher temperatures can favor the absorption of  $\text{NO}_3^-$ , while lower temperatures lead to increased use of  $\text{NH}_4^+$  (Gessler et al. 1998). The preference for  $\text{NO}_3^-$  has also been shown to increase in drier environments compared to wetter ones, following the  $\text{NO}_3^-$  availability in the soil (Houlton et al. 2007, Wang and Macko 2011).

Light is another abiotic factor that has great influence on the use of N by plants. This influence is related to the regulation of the enzymes of N metabolism, such as NR, NiR, glutamine synthetase (GS), and glutamate synthase (GOGAT), which are activated by light, in parallel to the activation of photosynthetic enzymes in the leaves (Lillo 2008). In addition to acting at the transcriptional level, light promotes photosynthetic electron transport, which up-regulates the N assimilation enzymes by providing reducing power and ATP and activating the ferredoxin-thioredoxin system (Lillo 2008). Thus, N assimilation is strongly coupled to photosynthesis (Lillo 2008).

However, it is not clear how light intensity affects plant N source preference. By using  $^{15}\text{N}$ -labeled  $\text{NO}_3^-$  as a single N source, it has been demonstrated that light induces the uptake of this anion by root cells through sugar-mediated mechanisms (Delhon et al. 1996, Lejay et al. 2008, Xu et al. 2008). However, when mixed N sources were used, both  $^{15}\text{NO}_3^-$  and  $^{15}\text{NH}_4^+$  absorption were induced by increasing light levels (Ma et al. 2016). Moreover, studies with different plant species have reported that high irradiances can either ameliorate or intensify the deleterious effects of  $\text{NH}_4^+$  nutrition on plant growth (Magalhães and Wilcox 1984, Zhu et al. 2000, Ariz et al. 2013).

Studies using seedlings of tree species native to the Brazilian Atlantic Rain Forest have demonstrated that shade-intolerant species have a clear preference for  $\text{NO}_3^-$ , exhibit high  $\text{NO}_3^-$  translocation in the xylem sap, and assimilate this anion mainly in the leaves, with high foliar activity of the NR enzyme (Oliveira et al. 2017, Debiassi et al. 2019). Seedlings of shade-tolerant trees assimilated N mainly in the roots, but their N use strategies varied between understory and canopy species (Oliveira et al. 2017, Debiassi et al. 2019). Overall, these contrasting strategies of N use have been considered adaptive responses to the distinct light environments that these species occupy. As the energy for assimilation of  $\text{NO}_3^-$  in leaves comes from photosynthetic electron transport and photorespiration, the use of this N source is supposed to be advantageous in environments where light is not a limiting factor (Smirnoff and Stewart 1985, Bloom 2015). In contrast, leaf assimilation of  $\text{NO}_3^-$  would not be advantageous in shaded environments, favoring the assimilation of other N sources in the roots, such as  $\text{NH}_4^+$  (Aidar et al. 2003). However, the way in which the change in light intensity affects the metabolism and translocation of N by tree species with different N use strategies has not yet been elucidated. This is particularly relevant for seasonal (semi)deciduous forests, where light availability varies both spatially and temporally (Lemos-Filho et al. 2010). The effects of N/light interaction on neotropical trees may reveal patterns that could be extrapolated to other forest species of the same functional groups.

In the current study, we evaluated the effect of light intensity on the use of nitrate and ammonium as N source by seedlings of neotropical trees. For this, we used three tree species that are representative for each functional group: *Cecropia pachystachya* (a shade-intolerant species), *Cariniana estrellensis* (a shade-tolerant canopy species) and *Guarea kunthiana* (a shade-tolerant understory species). We tested the hypothesis that an increase in light intensity induces the use of  $\text{NO}_3^-$  relative to that

of  $\text{NH}_4^+$ , but that the extent of this response varies according to the ecological characteristics of the species.

## Materials and methods

### *Plant material and growth conditions*

Three tree species native to the Seasonal Semideciduous Forest (a phytophysiognomy of the Brazilian Atlantic Forest) were selected for this study: *Cecropia pachystachya* Trécul (Urticaceae), a pioneer, shade-intolerant species; *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze (Lecythidaceae), a shade-tolerant species that reaches the canopy; and *Guarea kunthiana* A. Juss. (Meliaceae), a shade-tolerant species typical of the understory. The seeds were collected from forest fragments in the region of Londrina, Paraná State, Brazil.

The experiment was carried out in a greenhouse at the State University of Londrina (23°19'29" S and 51°11'51"W). Seeds were germinated in a box with washed sand. After the complete expansion of the first eophyll, the seedlings were transplanted for hydroponic cultivation. The average temperature and relative humidity during the experiment were 22.8 °C ( $\pm 2.40$ ) and 73.5% ( $\pm 12.4$ ), respectively (meteorological data obtained by the Agronomic Institute of Paraná – IAPAR).

### *Treatments*

Sixteen individuals of each species were used, eight of which were kept under lower light intensity (LL, with retention of 80% of solar radiation; 20-60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of PAR) and the other eight under higher light intensity (HL, with retention of 67% of solar radiation; 200-450  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of PAR). The LL corresponds to the light intensity found in understory, which is around 2-3% of the above-canopy PAR (Lindner 2011). The HL was chosen based on trials performed with the three species (see also Calzavara et al. 2019 for *C. pachystachya* and *C. estrellensis*), which indicated that this light intensity is significantly higher than the light compensation point of all species, but it does not saturate the photosynthesis of any of the species, avoiding oxidative stress. Regardless of the light treatment, the plants were grown in 500-mL hydroponic pots filled with a constantly aerated nutrient solution containing equimolar concentrations of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  (1.0 mM  $\text{KNO}_3$ , 0.5 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.0 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 1.0 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1.0 mM  $\text{CaCl}_2$ , 50  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4\text{-EDTA}$ , 46.3  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 9.0  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$ , 0.75  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ , 0.3  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , and 0.35  $\mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$ ). The nutrient solution was renewed weekly and its pH kept around 5.5.

After 35 days of growth under the two light conditions, each plant was transferred to a 150-mL flask with N-free nutrient solution to allow the consumption of endogenous inorganic N and decrease the dilution of the  $^{15}\text{N}$  to be added (Oliveira et al. 2013). After one day, the solution was supplemented with 1 mM  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  + 1 mM  $\text{KNO}_3$  or 1 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  + 1 mM  $\text{K}^{15}\text{NO}_3$  (with  $^{15}\text{N}$  enrichment of 20% at the indicated atom), resulting in four individuals per treatment. The seedlings were kept for 24 h in the  $^{15}\text{N}$ -containing solutions. After this period, morphological and biochemical parameters were analyzed. Some plants were kept in a medium without  $^{15}\text{N}$ -enriched sources as a control to be used in the calculation of  $^{15}\text{N}$  enrichment in amino acids (see Equation 2).

### ***Biometric and biochemical determinations***

Total leaf area (LA;  $\text{cm}^2$ ) was measured using the LI-3000 leaf area integrator (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). To determine the dry weights (g) of roots (RDW) and shoots (SDW), they were incubated at 60 °C for 72 h. The obtained values were used to calculate the total dry weight (TDW = RDW + SDW), root-to-shoot dry weight ratio (RSR = RDW/SDW), and leaf area ratio (LAR = LA/TDW).

To extract the metabolites, fine roots and the youngest completely expanded leaves were collected. The samples (0.2 g) were ground to a powder in liquid  $\text{N}_2$  and the amino acids were extracted with 2 mL of MCW (methanol: chloroform: water, 12:5:3, v:v:v), following the procedures described by Oliveira and Sodek (2013). The proteins were extracted with 0.1 M NaOH from the resulting precipitate and quantified with the Coomassie Blue reagent (Bradford 1976).

The xylem sap was extracted from the bark-removed stems using a Scholander-type pressure chamber SAPS2, model 3115 (Soil Moisture Equipment, Santa Barbara, USA). The collected sap was used directly to assess the contents of  $\text{NO}_3^-$  and amino acids.

The  $\text{NO}_3^-$  content was determined after its reduction to  $\text{NO}_2^-$  by the vanadium chloride catalyst (0.4%  $\text{VCl}_3$  in 0.5 M HCl) at 37 °C for 30 min. The reaction product was dosed using the Griess reagent (1% sulfanilamide in 1.5 M HCl, followed by the addition of 0.02% N-(naphthyl)-ethylenediamine) and reading the absorbance at 540 nm (Miranda et al. 2001).

NR activity was analyzed *in vivo* in the first fully expanded leaves and fine roots by incubating 0.15 g of segments of the organs for 40 min in 5 mL of a medium

containing 0.05 M KNO<sub>3</sub>, 0.05 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.5), and 1% propanol, and subsequently measuring the NO<sub>2</sub><sup>-</sup> formed using the Griess reagent (Stewart et al. 1986).

To analyze the glutamine synthetase (GS) activity *in vitro*, root and leaf samples (0.1 g) were ground to powder in liquid N<sub>2</sub> and extracted with 0.5 mL of a medium containing 50 mM HEPES buffer (pH 7.5), 10 mM 2-mercaptoethanol, 2% polyvinylpyrrolidone, 1 mM EDTA, 0.11 M NaCl, 1.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2.3 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 5 mM MgCl<sub>2</sub>. After centrifugation at 12,000 g and 4 °C for 20 min, GS activity was determined by the Fe-γ-glutamyl hydroxamate (GGH) biosynthesis method, according to O'Neal and Joy (1974), with some modifications. The extract (24 μL) was incubated at 30 °C with 51 μL of the reaction medium (100 mM Tris-HCl buffer pH 7.5, 25 mM glutamate, 10 mM 2-mercaptoethanol, 82 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM hydroxylamine, and 20 mM ATP) and, after 20 min, the reaction was interrupted by the addition of 75 μL of a solution containing 0.12 M FeCl<sub>3</sub>, 0.5 M HCl, and 0.25 M TCA. The absorbance was then read at 540 nm and compared to a standard curve of GGH.

All the spectrophotometric analyses were performed in a Spectramax Plus 384 spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, USA).

### ***<sup>15</sup>N incorporation into amino acids***

The content of each amino acid and its <sup>15</sup>N enrichment in roots, leaves, and xylem sap were analyzed using the gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) system Shimadzu QP2010 Plus (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan), equipped with a DB-5 column (30 m, 0.32 mm, 0.25 μm film thickness; J&W Scientific, Folsom, CA, USA). The MCW extracts were purified using a Dowex 50W H<sup>+</sup> column and then dried with N<sub>2</sub> gas, as described by Oliveira and Sodek (2013). The xylem sap was dried with N<sub>2</sub> gas, treated with 50 μL of 0.1 M HCl and then dried again (Oliveira et al. 2013). The dried xylem sap and MCW samples were derivatized with 30 μL of *N*-methyl-*N*-(tert-butyl)dimethylsilyl) trifluoroacetamide (Sigma, Saint Louis, USA) in 30 μL of pyridine at 70 °C for 30 min. The amino acids were analyzed in the SIM mode, following the conditions described by Chaves das Neves and Vasconcelos (1987).

The quantification of amino acids (in nmol) was performed by comparing the peak areas in the samples with those of a standard amino acid solution. The relative amount of each amino acid (RAA) was calculated using equation 1.

$$RAA \text{ (mol\%)} = \frac{\text{Amount of individual amino acid} \times 100}{\text{Total amount of aminoacids in the sample}} \quad (1)$$

The  $^{15}\text{N}$  enrichment in amino acids was calculated according to equation 2 (Silvester et al. 1996, Godber and Parsons 1998).

$$^{15}\text{N enrichment (\%)} = \frac{100 \times (Re - Rc)}{1 + (Re - Rc)} \quad (2)$$

In which  $Re = [(M + 1) / M]$  of samples from material exposed to  $^{15}\text{N}$ , and  $Rc$  is equal to the same ratio for samples of control material (not exposed to  $^{15}\text{N}$  but containing significant amounts of naturally occurring isotopes – see Godber and Parsons 1998). The values  $(M + 1)/M$  represent the relative intensities of two forms of the same fragment. The formula takes into account both the relative increase in signal of the  $M+1$  fragment due to  $^{15}\text{N}$  incorporation of the  $M$  fragment as well as the loss of signal from the  $M+1$  fragment (becoming  $M+2$ ) upon  $^{15}\text{N}$  incorporation. The total content of  $^{15}\text{N}$ -amino acids derived from  $^{15}\text{NO}_3^-$  or  $^{15}\text{NH}_4^+$  in each organ was calculated as the sum of individual  $^{15}\text{N}$ -amino acids (obtained by multiplying the  $^{15}\text{N}$  enrichment in each amino acid per its respective amount in  $\text{nmol g}^{-1}$  FW).

### ***Statistical analysis***

The normality of data distribution (Shapiro Wilk test) and homogeneity of variances (Levene test) were evaluated and, when necessary, data were log-transformed. For each species, means of the biometrical and biochemical parameters were compared between the LL and HL treatments, while means of  $^{15}\text{N}$  enrichment in amino acids were compared between the LL and HL treatments with the same  $^{15}\text{N}$  source, using the Student's  $t$ -test ( $p < 0.05$ ) and the Statistica v. 10.0 software (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). Principal component analysis (PCA) was also carried out with the biochemical parameters to evaluate the grouping of the three species in response to LL and HL treatments, using the software R (Stats package, version 4.0.2).

## **Results**

### ***Biometric traits***

The light intensity affected the leaf area and dry weight of seedlings of the three species studied, with the highest values in the HL treatment (Table 1). In contrast, HL

decreased the leaf area ratio of all species. *Cecropia pachystachya* was the most responsive species to the increase in light intensity (around 3- and 6-fold increases in leaf area and total dry weight, and 2.3-fold decrease in leaf area ratio). *Guarea kunthiana* showed a higher RSR under HL, while the other species did not demonstrate a significant difference in this parameter between light treatments.

**Table 1** Leaf area (LA), total dry weight (TDW), root-to-shoot ratio (RSR), and leaf area ratio (LAR) of *Cecropia pachystachya* (*Cp*), *Cariniana estrellensis* (*Ce*), and *Guarea kunthiana* (*Gk*) seedlings cultivated under lower light (LL) or higher light (HL) intensity. Data are the mean  $\pm$  SE ( $n = 8$ ). Asterisks indicate significant difference between light treatments, for each species, according to the Student's *t*-test ( $P < 0.05$ ).

Species	Light	LA (cm <sup>2</sup> )	TDW (g)	RSR (g g <sup>-1</sup> )	LAR (cm <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )
<i>Cp</i>	LL	100 $\pm$ 7.9	0.22 $\pm$ 0.033	0.79 $\pm$ 0.09	538 $\pm$ 43.2*
	HL	307 $\pm$ 22.3*	1.35 $\pm$ 0.10*	0.73 $\pm$ 0.04	229 $\pm$ 7.56
<i>Ce</i>	LL	89.8 $\pm$ 6.34	0.55 $\pm$ 0.03	0.87 $\pm$ 0.12	165 $\pm$ 11.4*
	HL	165 $\pm$ 10.8*	1.29 $\pm$ 0.08*	0.66 $\pm$ 0.04	119 $\pm$ 10.3
<i>Gk</i>	LL	65 $\pm$ 3.79	0.61 $\pm$ 0.02	0.70 $\pm$ 0.03	107 $\pm$ 4.64*
	HL	98 $\pm$ 8.65*	1.38 $\pm$ 0.071*	1.07 $\pm$ 0.07*	69.9 $\pm$ 2.63

### Root and leaf N metabolism

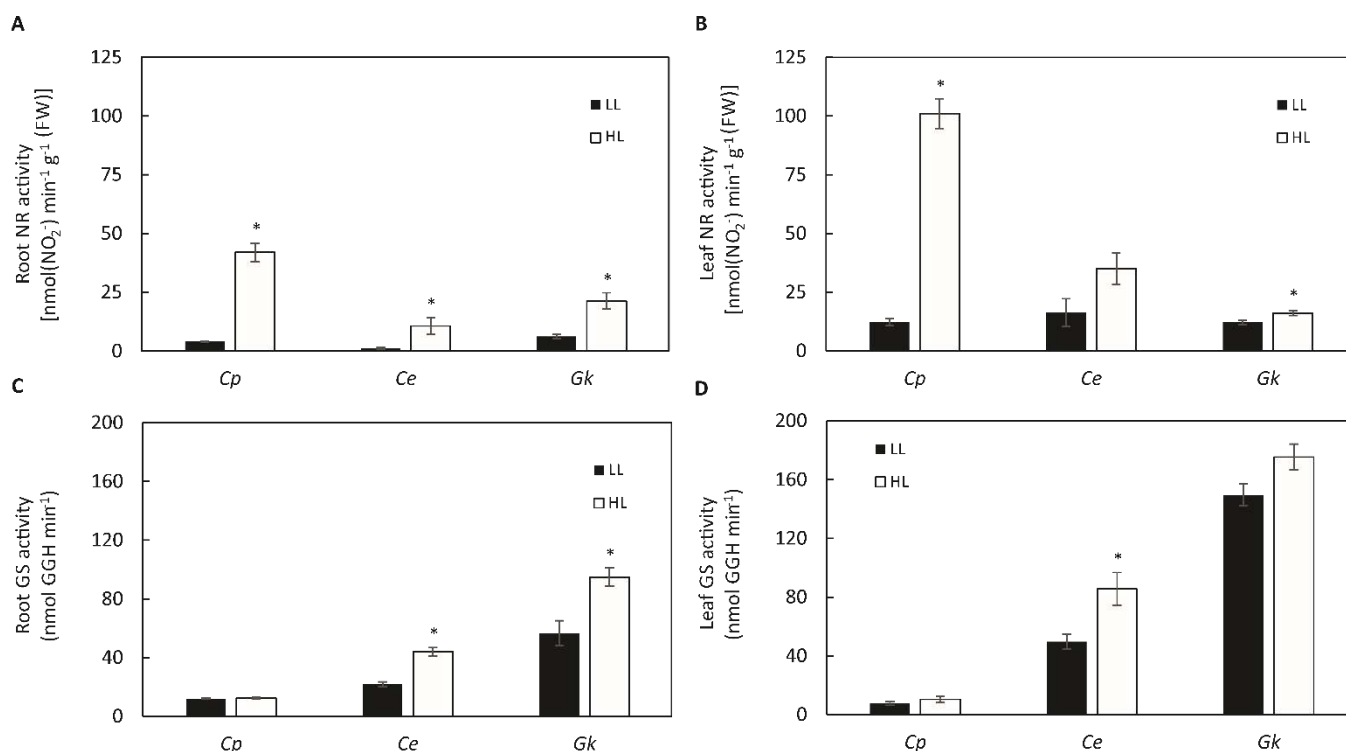
NR activity was higher in the HL treatment compared to the LL treatment in both roots and leaves of *C. pachystachya* and *G. kunthiana* (Fig. 1A and B). In the roots of *C. estrellensis*, NR activity also increased in the HL treatment (Fig. 1A), while in the leaves no significant difference was detected (Fig. 1B).

GS activity was not altered by light intensity in the roots or leaves of *C. pachystachya* seedlings (Fig. 1C and D). In the roots of *C. estrellensis* and *G. kunthiana*, the activity of this enzyme was higher in the HL treatment compared to the LL (Fig. 1C). In the leaves of *C. estrellensis*, GS activity was also higher in the HL than the LL, while in the leaves of *G. kunthiana* no difference was verified between light treatments (Fig. 1D).

The NO<sub>3</sub><sup>-</sup> content in *C. pachystachya* roots increased by around 2-fold in the HL treatment, while it did not change in roots of the other species (Fig. S1). In the leaves of *C. pachystachya* and *G. kunthiana*, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> content was higher in the LL treatment

compared to the HL (about 2- and 2.5-fold, respectively) (Fig. S1). In *C. estrellensis* leaves,  $\text{NO}_3^-$  content slightly increased in the HL treatment (Fig. S1).

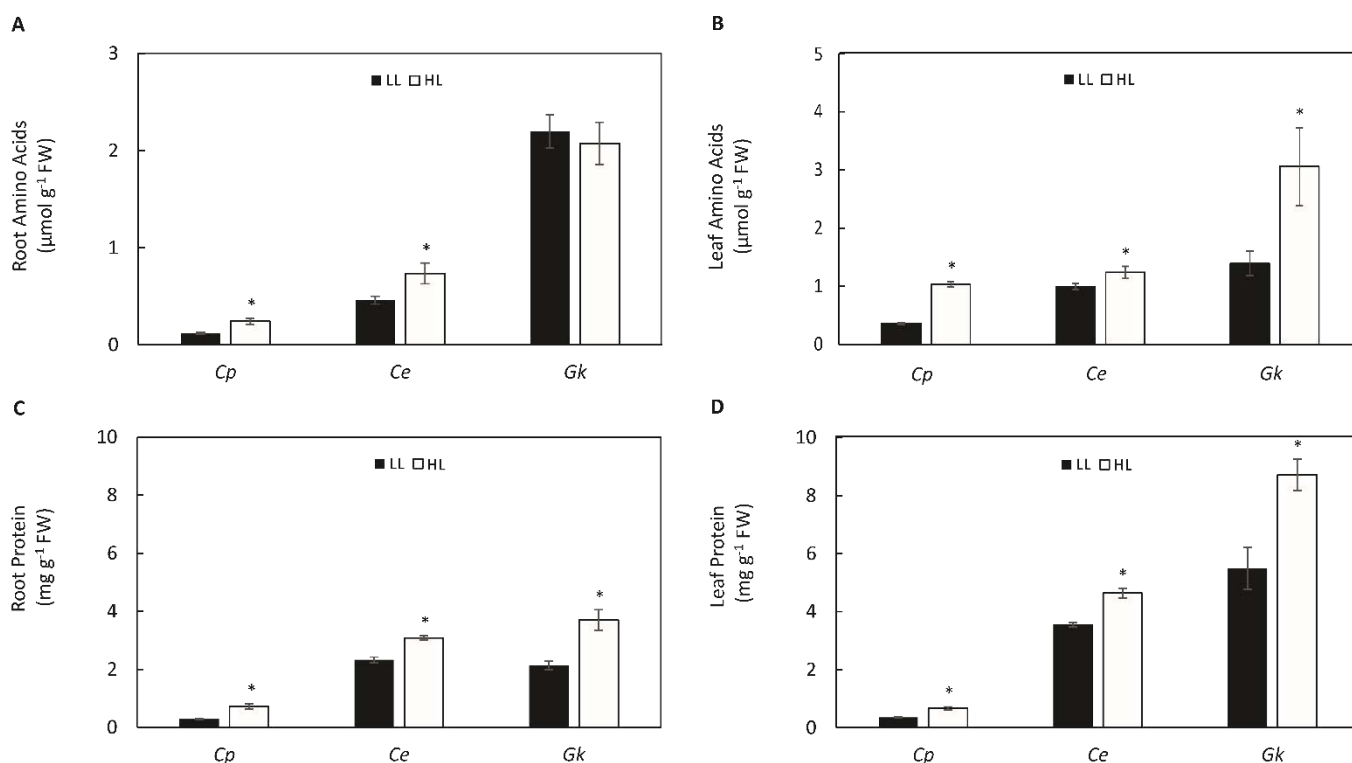
Light intensity also affected the free amino acid and protein contents in the roots and leaves of all species, which were higher in the HL treatment (Fig. 2). The only exception was the total amino acid levels of *G. kunthiana* roots, which were not altered by light treatments (Fig. 2A).



**Figure 1** Activity of nitrate reductase (NR) in roots (A) and leaves (B), and activity of glutamine synthetase (GS) in roots (C) and leaves (D) of *Cecropia pachystachya* (Cp), *Cariniana estrellensis* (Ce), and *Guarea kunthiana* (Gk) seedlings cultivated under lower light (LL) or higher light (HL) intensity. Data are means  $\pm$  SE ( $n = 4$ ). Asterisks indicate significant differences between light treatments, for each species, according to the Student's *t*-test ( $P < 0.05$ ).

When evaluating the amino acid composition, there was a decrease in the proportion of Asparagine (Asn) (from 20.6% to 9.0%) and Aspartate (Asp) (from 10.7% to 2.72%) and an increase in the proportion of Glutamine (Gln) (from 2.7% to 13.0%) in *C. pachystachya* roots induced by HL (Fig. S2). Similarly, in *C. pachystachya* leaves, HL led to decreases in Asp (from 21.6% to 13.0%), Glutamate (Glu) (from 27.7% to 11.5%), and Serine (Ser) (from 14.2% to 10.0%), and an increase in Gln (from 0.9% to 14.5%) (Fig. S3). The Gln/Asn ratio increased under HL in roots (0.135 from to 1.98;  $p = 0.027$ ) and leaves (0.122 from to 1.28;  $p < 0.001$ ).

Lower proportions of Arginine (Arg) (from 7.3% to 2.9%), Asp (from 20.8% to 12.5%), and Glu (from 27.8% to 15.9%) and a higher proportion of Gln (from 13.3% to 38.8%) were observed in *C. estrellensis* roots with the increase in light intensity (Fig. S2). In the leaves of the same species, the percentage of Alanine (Ala) decreased (from 17.0% to 10.7%), while Proline (Pro) increased (from 3.2% to 12.4%) under HL (Fig. S3). The Gln/Asn ratio increased under HL only in roots (24.1 from to 58.6;  $p = 0.008$ ).



**Figure 2** Total content of free amino acids in roots (A) and leaves (B), and soluble proteins in roots (C) and leaves (D) of *Cecropia pachystachya* (Cp), *Cariniana estrellensis* (Ce), and *Guarea kunthiana* (Gk) seedlings cultivated under lower light (LL) or higher light (HL) intensity. Data are means  $\pm$  SE ( $n = 4$ ). Asterisks indicate significant differences between light treatments, for each species, according to the Student's  $t$ -test ( $P < 0.05$ ).

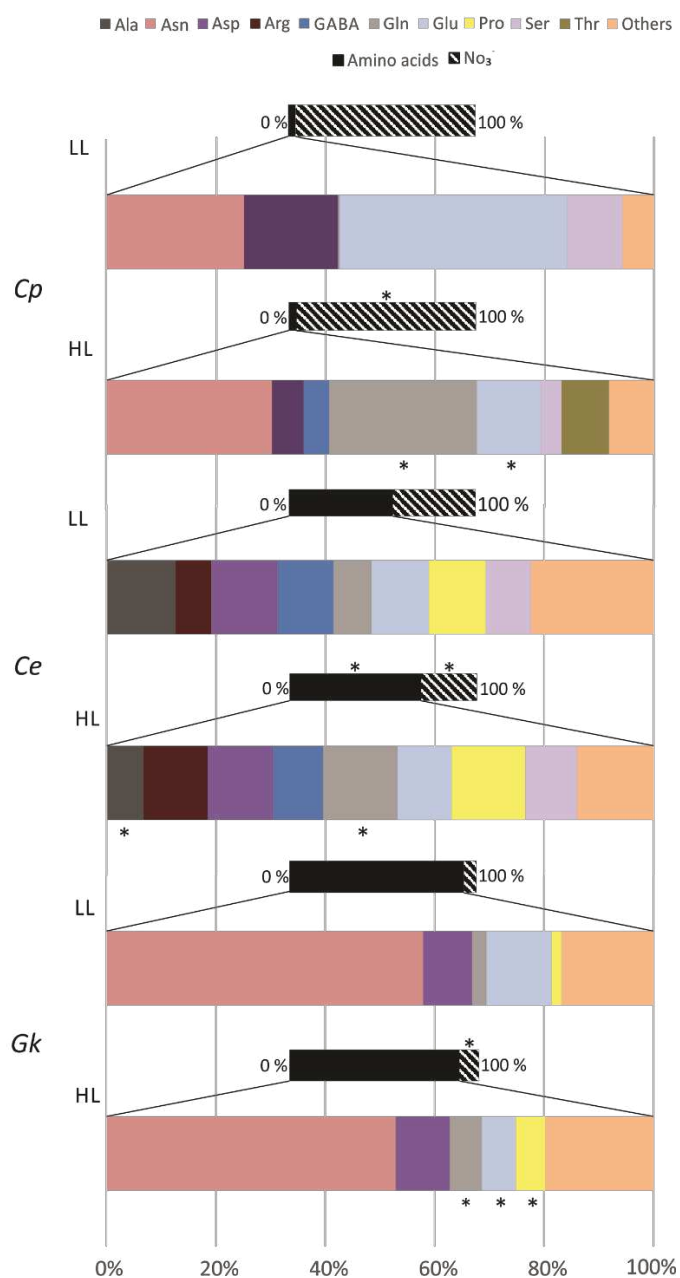
In the roots of *G. kunthiana* seedlings, no difference was verified in the proportion of each amino acid, with a predominance of Asn (around 75%) regardless of the light treatment (Fig. S2). In the leaves, the proportion of Asn decreased from 49.7% (LL) to 26.5% (HL) accompanied by an increase in Gln (from 5.1% to 25.6%) (Fig. S3). The Gln/Asn ratio increased under HL only in leaves (0.108 from to 1.12;  $p = 0.005$ ).

### *N* translocation in the xylem sap

In *C. pachystachya* seedlings, there was a great predominance of  $\text{NO}_3^-$  over amino acids in the xylem sap, which was further increased by HL (from 93.2% to 95.8%). No difference in total amino acid content was found between light treatments,

but HL increased the translocation of Gln (from 0.25% to 27%), resulting in higher Gln/Asn ratio (0.012 from to 0.913;  $p = 0.004$ ), while Glu was decreased (from 41% to 11.6%) (Fig. 3).

In *C. estrellensis*, HL increased the translocation of Gln (from 7% to 13.6%) and decreased Ala (from 12.6% to 6.7%) in the xylem sap (Fig. 3). The total amino acids content in the xylem sap also increased in HL, with a proportionally lower translocation of  $\text{NO}_3^-$  in relation to the LL treatment.



**Figure 3** Relative amounts (in mol%) of individual amino acids, together with the relative molar concentration of total amino acids and  $\text{NO}_3^-$  in the xylem sap of *Cecropia pachystachya* (Cp), *Cariniana estrellensis* (Ce), and *Guarea kunthiana* (Gk) seedlings cultivated under lower

light (LL) or higher light (HL) intensity. Data are means  $\pm$  SE ( $n = 4$ ). Asterisks indicate significant differences between light treatments, for each species, according to the Student's *t*-test ( $P < 0.05$ ). Only amino acids detected in an amount above 3% are shown: Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid), Pro, Ser, and Thr. The amino acids included in “others” are Gly, Ile, Leu, Phe, Tyr, and Val.

HL increased the translocation of Gln (from 2.6% to 5.8%) and Pro (from 1.8% to 5.44%) in the xylem sap of *G. kunthiana* seedlings, but the translocation of Glu decreased from 11.9% to 6.2% (Fig. 3). Under HL, the Gln/Asn ratio increased in the xylem sap (0.046 from to 0.112;  $p = 0.006$ ). There was a predominance of amino acids over  $\text{NO}_3^-$  in the xylem sap, and the proportion of translocated  $\text{NO}_3^-$  was higher in the HL treatment (10.3%) in relation to LL (6.8 %).

### ***<sup>15</sup>N incorporation into amino acids***

In the roots of *C. pachystachya* seedlings, all amino acids showed higher  $^{15}\text{N}$  enrichment in the presence of  $^{15}\text{NO}_3^-$  under HL compared to the LL treatment. Similarly,  $^{15}\text{NH}_4^+$ -derived  $^{15}\text{N}$  enrichment was greater under HL in almost all amino acids, except for Ala and  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) (Table 2). In the leaves, when comparing the HL and LL treatments, a higher  $^{15}\text{NO}_3^-$ -derived  $^{15}\text{N}$  enrichment was verified only in Asn, while incorporation of  $^{15}\text{N}$  from  $^{15}\text{NH}_4^+$  increased in Ala, GABA, Gln, Glu, and Ser, in relation to LL (Table 2). The total content of amino acids with  $^{15}\text{N}$  in both organs was greater in the HL treatment (Fig. 4A). The content of amino acids in the roots with  $^{15}\text{N}$  derived from  $^{15}\text{NO}_3^-$  and  $^{15}\text{NH}_4^+$  increased under HL around 12.5 and 4.5-fold, respectively. In the leaves, the amount of  $^{15}\text{N}$ -amino acids derived from  $^{15}\text{NO}_3^-$  and  $^{15}\text{NH}_4^+$  was about 4 and 3-fold greater in the HL treatment (Fig. 4A).

In the roots of *C. estrellensis*, HL induced increases in  $^{15}\text{N}$  incorporation from  $^{15}\text{NO}_3^-$  in Ala and from  $^{15}\text{NH}_4^+$  in Ala, Asp, GABA, and Glu (Table 3). In the leaves, HL increased the  $^{15}\text{NO}_3^-$ -derived  $^{15}\text{N}$  enrichment in Asn, GABA, and Ser, but decreased the Gln. Similarly, the  $^{15}\text{NH}_4^+$ -derived  $^{15}\text{N}$  enrichment increased in Asn and GABA and decreased in Gln under HL (Table 3). In the roots of *C. estrellensis*, the total amount of  $^{15}\text{N}$ -amino acids derived from  $^{15}\text{NO}_3^-$  was not altered by light intensity, whereas in the presence of  $^{15}\text{NH}_4^+$  the amount of  $^{15}\text{N}$ -amino acids increased by about 60% under HL (Fig. 4B). In the leaves, HL led to a 3-fold increase in the content of  $^{15}\text{N}$ -amino acids from  $^{15}\text{NO}_3^-$ , while no difference was detected when  $^{15}\text{NH}_4^+$  was provided (Fig. 4B).

In *G. kunthiana* roots, HL caused an increase in  $^{15}\text{N}$  enrichment from  $^{15}\text{NO}_3^-$  in Ala and Asn, whilst it decreased the  $^{15}\text{N}$  enrichment from  $^{15}\text{NH}_4^+$  in GABA (Table 4). In the leaves, all amino acids presented increased  $^{15}\text{NO}_3^-$ -derived  $^{15}\text{N}$  enrichment under HL. The enrichment from  $^{15}\text{NH}_4^+$  was not affected by light treatments (Table 4). In roots and leaves of *G. kunthiana*, there was a large increase in the total amount of  $^{15}\text{N}$ -amino acids derived from  $^{15}\text{NO}_3^-$  under HL (11.2 and 17.0-fold increases, respectively) (Fig. 4C). The total content of  $^{15}\text{N}$ -amino acids in the presence of  $^{15}\text{NH}_4^+$  did not differ between the light intensities (Fig. 4C).

**Table 2**  $^{15}\text{N}$  enrichment (%) in amino acids in roots and leaves of *Cecropia pachystachya* seedlings cultivated under lower light (LL) or higher light (HL) intensity in the presence of  $^{15}\text{N}$ -labeled  $\text{NO}_3^-$  or  $\text{NH}_4^+$  (20%  $^{15}\text{N}$ ). Data are means  $\pm$  SE ( $n = 4$ ). Asterisks indicate significant difference between light treatments, according to the Student's  $t$ -test ( $P < 0.05$ ). nd = not determined.

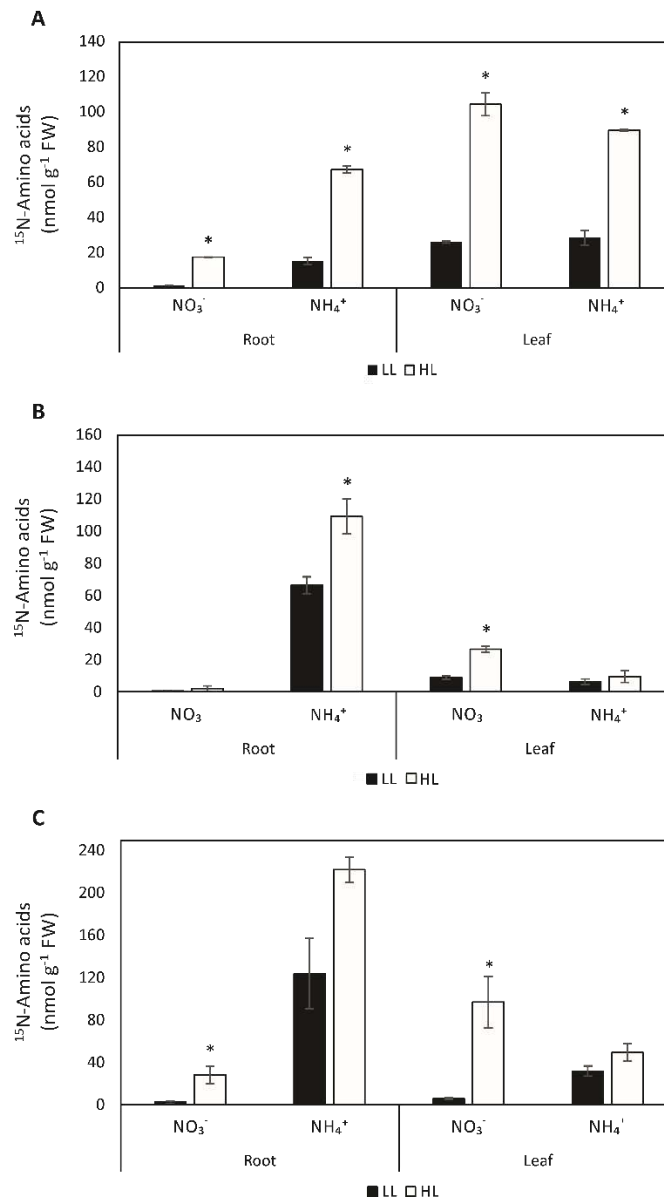
Organ	$^{15}\text{N}$ source	Light	$^{15}\text{N}$ -Ala (%)	$^{15}\text{N}$ -Asn (%)	$^{15}\text{N}$ -Asp (%)	$^{15}\text{N}$ -GABA (%)	$^{15}\text{N}$ -Gln (%)	$^{15}\text{N}$ -Glu (%)	$^{15}\text{N}$ -Ser (%)
Root	$\text{NO}_3^-$	LL	0.71 $\pm$ 0.151	1.47 $\pm$ 0.389	1.26 $\pm$ 0.307	1.59 $\pm$ 0.193	2.67 $\pm$ 0.322	1.35 $\pm$ 0.369	0.44 $\pm$ 0.051
		HL	9.32 $\pm$ 1.125*	6.44 $\pm$ 0.650*	6.88 $\pm$ 0.564*	9.78 $\pm$ 0.699*	12.0 $\pm$ 1.10*	8.61 $\pm$ 0.555*	3.90 $\pm$ 0.535*
	$\text{NH}_4^+$	LL	15.4 $\pm$ 1.06	15.5 $\pm$ 1.37	17.9 $\pm$ 0.839	20.6 $\pm$ 1.02	19.23 $\pm$ 2.60	7.0 $\pm$ 3.20	3.52 $\pm$ 0.063
		HL	15.7 $\pm$ 0.660	20.0 $\pm$ 0.654*	13.9 $\pm$ 0.554*	18.1 $\pm$ 0.762	33.6 $\pm$ 1.06*	15.1 $\pm$ 0.712*	6.44 $\pm$ 0.189*
Leaf	$\text{NO}_3^-$	LL	8.30 $\pm$ 1.19	1.95 $\pm$ 0.370	nd	8.39 $\pm$ 1.28	nd	8.30 $\pm$ 1.01	7.29 $\pm$ 0.951
		HL	9.56 $\pm$ 0.769	6.37 $\pm$ 1.12*	9.39 $\pm$ 0.490	10.0 $\pm$ 0.555	16.6 $\pm$ 1.69	9.90 $\pm$ 0.651	6.21 $\pm$ 1.25
	$\text{NH}_4^+$	LL	3.95 $\pm$ 1.06	20.8 $\pm$ 3.58	7.19 $\pm$ 1.07	5.09 $\pm$ 1.05	7.76 $\pm$ 1.72	3.53 $\pm$ 1.07	3.31 $\pm$ 0.952
		HL	10.0 $\pm$ 0.758*	16.5 $\pm$ 1.60	9.45 $\pm$ 0.510	9.98 $\pm$ 0.608*	17.7 $\pm$ 1.62*	10.1 $\pm$ 0.568*	7.25 $\pm$ 0.885*

**Table 3**  $^{15}\text{N}$  enrichment (%) in amino acids in roots and leaves of *Cariniana estrellensis* seedlings cultivated under lower light (LL) or higher light (HL) intensity in the presence of  $^{15}\text{N}$ -labeled  $\text{NO}_3^-$  or  $\text{NH}_4^+$  (20%  $^{15}\text{N}$ ). Data are means  $\pm$  SE ( $n = 4$ ). Asterisks indicate significant difference between light treatments, according to the Student's  $t$ -test ( $p < 0.05$ ). nd = not determined.

Organ	$^{15}\text{N}$ source	Light	$^{15}\text{N}$ -Ala (%)	$^{15}\text{N}$ -Asp (%)	$^{15}\text{N}$ -GABA (%)	$^{15}\text{N}$ -Gln (%)	$^{15}\text{N}$ -Glu (%)	$^{15}\text{N}$ -Pro (%)	$^{15}\text{N}$ -Ser (%)
Root	$\text{NO}_3^-$	LL	0.04 $\pm$ 0.036	nd	0.31 $\pm$ 0.025	0.39 $\pm$ 0.112	0.24 $\pm$ 0.143	0.11 $\pm$ 0.09	0.17 $\pm$ 0.015
		HL	0.38 $\pm$ 0.082*	0.96 $\pm$ 0.073	0.042 $\pm$ 0.207	0.46 $\pm$ 0.116	0.48 $\pm$ 0.211	0.04 $\pm$ 0.003	0.16 $\pm$ 0.049
	$\text{NH}_4^+$	LL	11.8 $\pm$ 0.522	11.8 $\pm$ 0.443	13.6 $\pm$ 0.271	25.3 $\pm$ 3.22	14.7 $\pm$ 0.647	3.09 $\pm$ 0.25	2.62 $\pm$ 0.172
		HL	14.7 $\pm$ 0.600*	19.0 $\pm$ 0.710*	19.3 $\pm$ 0.749*	19.0 $\pm$ 1.50	18.5 $\pm$ 1.19*	4.20 $\pm$ 0.40	4.69 $\pm$ 0.322*
Leaf	$\text{NO}_3^-$	LL	1.24 $\pm$ 0.080	1.081 $\pm$ 0.150	3.25 $\pm$ 0.642	37.4 $\pm$ 1.50*	0.911 $\pm$ 0.087	1.98 $\pm$ 1.00	0.974 $\pm$ 0.041
		HL	2.09 $\pm$ 0.448	2.12 $\pm$ 0.368	6.31 $\pm$ 0.531*	10.3 $\pm$ 0.566	2.35 $\pm$ 0.388*	0.07 $\pm$ 0.04	2.07 $\pm$ 0.260*
	$\text{NH}_4^+$	LL	0.133 $\pm$ 0.101	nd	1.39 $\pm$ 0.136	36.9 $\pm$ 1.18*	0.289 $\pm$ 0.049	0.85 $\pm$ 0.26	0.214 $\pm$ 0.069
		HL	1.29 $\pm$ 0.414	1.25 $\pm$ 0.425	2.38 $\pm$ 0.145*	30.0 $\pm$ 0.486	1.32 $\pm$ 0.439	0.09 $\pm$ 0.05	0.675 $\pm$ 0.297

**Table 4**  $^{15}\text{N}$  enrichment (%) in amino acids in roots and leaves of *Guarea kunthiana* seedlings cultivated under lower light (LL) or higher light (HL) intensity in the presence of  $^{15}\text{N}$ -labeled  $\text{NO}_3^-$  or  $\text{NH}_4^+$  (20%  $^{15}\text{N}$ ). Data are means  $\pm$  SE ( $n = 4$ ). Asterisks indicate significant difference between light treatments, according to the Student's  $t$ -test ( $p < 0.05$ ). nd = not determined.

Organ	$^{15}\text{N}$ source	Light	$^{15}\text{N}$ -Ala (%)	$^{15}\text{N}$ -Asn (%)	$^{15}\text{N}$ -Asp (%)	$^{15}\text{N}$ -GABA (%)	$^{15}\text{N}$ -Gln (%)	$^{15}\text{N}$ -Glu (%)	$^{15}\text{N}$ -Ser (%)
Root	$\text{NO}_3^-$	LL	0.349 $\pm$ 0.044	0.160 $\pm$ 0.047	0.611 $\pm$ 0.297	nd	nd	nd	0.324 $\pm$ 0.022
		HL	3.53 $\pm$ 0.439*	0.658 $\pm$ 0.087*	1.94 $\pm$ 0.427	1.64 $\pm$ 0.405	4.07 $\pm$ 1.00	1.94 $\pm$ 0.283	0.609 $\pm$ 0.119
	$\text{NH}_4^+$	LL	15.2 $\pm$ 1.52	6.18 $\pm$ 0.375	11.7 $\pm$ 0.571	20.5 $\pm$ 0.867*	20.8 $\pm$ 2.65	18.5 $\pm$ 0.666	3.69 $\pm$ 0.824
		HL	15.1 $\pm$ 1.60	4.76 $\pm$ 0.99	10.6 $\pm$ 1.44	15.8 $\pm$ 0.829	21.9 $\pm$ 1.49	16.3 $\pm$ 1.59	3.83 $\pm$ 0.443
Leaf	$\text{NO}_3^-$	LL	0.933 $\pm$ 0.094	0.083 $\pm$ 0.050	nd	0.678 $\pm$ 0.163	1.14 $\pm$ 0.072	0.573 $\pm$ 0.038	0.403 $\pm$ 0.122
		HL	4.50 $\pm$ 0.529*	2.04 $\pm$ 0.278*	nd	3.68 $\pm$ 0.718*	7.43 $\pm$ 1.19*	4.56 $\pm$ 0.735*	3.26 $\pm$ 0.511*
	$\text{NH}_4^+$	LL	2.11 $\pm$ 0.540	3.25 $\pm$ 0.702	nd	1.66 $\pm$ 0.553	1.48 $\pm$ 0.404	1.66 $\pm$ 0.108	1.30 $\pm$ 0.285
		HL	0.945 $\pm$ 0.178	2.83 $\pm$ 1.17	nd	0.917 $\pm$ 0.222	1.74 $\pm$ 0.760	1.54 $\pm$ 0.219	1.03 $\pm$ 0.315



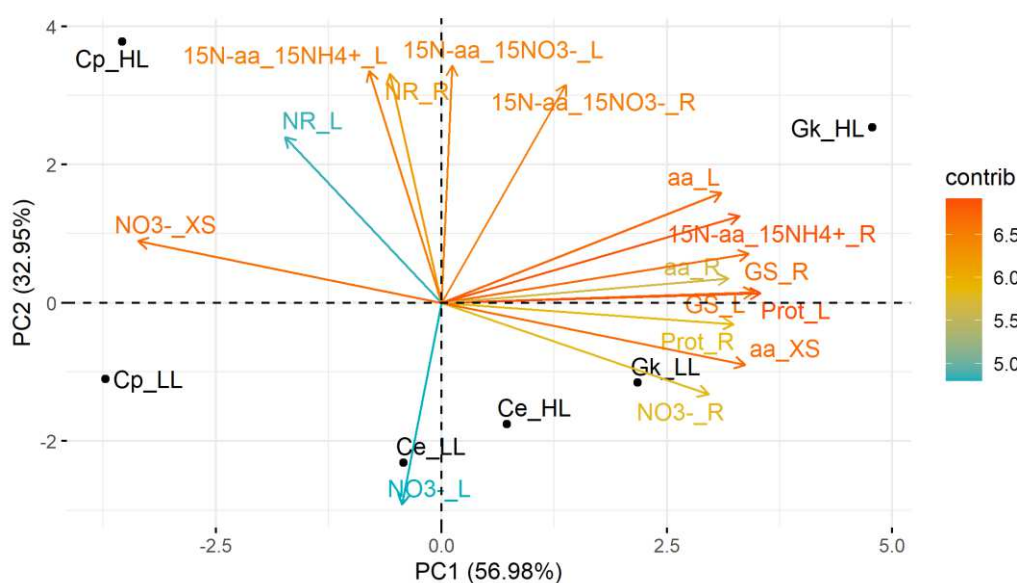
**Figure 4** Total content of <sup>15</sup>N-enriched amino acids in roots and leaves of seedlings of *Cecropia pachystachya* (A), *Cariniana estrellensis* (B), and *Guarea kunthiana* (C) seedlings cultivated under lower light (LL) or higher light (HL) intensity in the presence of <sup>15</sup>N-labeled NO<sub>3</sub><sup>-</sup> or NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (20% <sup>15</sup>N). Data are means ± SE (*n* = 4). Asterisks indicate significant differences between light treatments, for each species, according to the Student's *t*-test (*P* < 0.05).

### *Principal component analysis of biochemical data*

The PCA explained 90% of the data variance in the first two components (PC1 = 57.0% and PC2 = 33.0%) (Fig. 5). Regardless of the light treatments, there was a clear separation between *C. pachystachya* and *G. kunthiana* in PC1, while *C. estrellensis* was located in an intermediate position. When evaluating each species, the distance between LL and HL treatments was higher for *G. kunthiana* (in both components), followed by

*C. pachystachya* (mainly in PC2). *Cariniana estrellensis* showed the smallest separation between light intensities.

*Guarea kunthiana* seedlings grown under the two light intensities were positively related in the positive part of PC1 to leaf amino acid content, root  $\text{NO}_3^-$  content, root  $^{15}\text{NH}_4^+$ -derived  $^{15}\text{N}$ -amino acid content, GS activity in roots and leaves, and protein content in roots and leaves. In the LL treatment, *G. kunthiana* showed a strong negative correlation with leaf NR activity and  $\text{NO}_3^-$  content in the xylem sap. Under HL, this species had a positive correlation with  $^{15}\text{NO}_3^-$ -derived  $^{15}\text{N}$ -amino acid content in leaves and roots and with the variables located in the positive portion of PC1.



**Figure 5** Principal component analysis based on biochemical data obtained from seedlings *Cecropia pachystachya* (*Cp*), *Cariniana estrellensis* (*Ce*), and *Guarea kunthiana* (*Gk*) seedlings cultivated under lower light (LL) or higher light (HL) intensity. The biochemical variables used in the analysis were the activity of nitrate reductase (NR) and glutamine synthetase (GS),  $\text{NO}_3^-$  content, total content of free amino acids (aa), soluble proteins (Prot) and  $^{15}\text{N}$ -amino acids derived from  $^{15}\text{NO}_3^-$  ( $^{15}\text{N-aa-}^{15}\text{NO}_3^-$ ) or  $^{15}\text{NH}_4^+$  ( $^{15}\text{N-aa-}^{15}\text{NH}_4^+$ ) in roots (R) and leaves (L); and percentage of  $\text{NO}_3^-$  and amino acids (aa) in the xylem sap (XS).

Compared to the LL treatment, *C. pachystachya* seedlings under HL were more positively related to  $\text{NO}_3^-$  content in the xylem sap and NR activity in roots and leaves, and the amount of  $^{15}\text{N}$ -amino acids from  $^{15}\text{NH}_4^+$  and  $^{15}\text{NO}_3^-$  in leaves and to a lesser extent from  $^{15}\text{NO}_3^-$  in roots (in the positive part of PC2).

In the case of *C. estrellensis* seedlings, the LL treatment was positively related mainly to  $\text{NO}_3^-$  content in the leaves in the negative part of PC2. Compared to the HL treatment, LL had a stronger negative correlation with the amount of  $^{15}\text{N}$ -amino acids from  $^{15}\text{NO}_3^-$  in leaves and roots.

## Discussion

Our data showed a sharp difference in N use and response to light between the species that occupy the most contrasting ecological niches: *C. pachystachya*, a shade-intolerant species, and *G. kunthiana*, a shade-tolerant understory species. On the other hand, the shade-tolerant canopy species (*C. estrellensis*) demonstrated intermediate responses of its N use strategies to light intensity. More importantly, our study is the first to show the plasticity of plants in the assimilation of  $\text{NO}_3^-$  or  $\text{NH}_4^+$  in contrasting light levels and how this plasticity is species-dependent.

The three species presented common responses to the HL treatment, such as increased growth and a decreased leaf area ratio, which have frequently been observed in plants exposed to increased light availability compared to plants growing in extremely shaded environments (Freschet et al. 2015, Sevillano et al. 2016). Furthermore, N assimilation was promoted by HL, as indicated by the increases in NR and GS activities, together with the increases in amino acid and protein content in roots and leaves observed in most cases. It is well known that N metabolism is positively influenced by light, as it activates photosynthesis and N assimilation enzymes, in addition to inducing  $\text{NO}_3^-$  flow into cells and providing reductants and ATP for N metabolism (Lillo 2008).

The light-induced increased availability of C skeletons may also favor N storage and translocation as Gln, whereas under lower light or in the dark Asn is used as a more efficient N storage and translocation compound (Oliveira et al. 2001, Kambhampati et al. 2017). Herein, we observed that although HL increased the Gln/Asn ratio in the xylem sap of *C. pachystachya* and *G. kunthiana*, there were remarkable differences among them when evaluating roots and leaves. While *C. pachystachya* showed the classical response to light of an increased Gln/Asn ratio in roots and leaves, in *G. kunthiana* seedlings the same occurred only in the leaves, and Asn remained unchanged as the predominant amino acid in the roots regardless of the light condition, which might be a C-saving strategy in the roots of this understory species (Oliveira et al. 2001). In the case of *C. estrellensis* seedlings, the levels of Asn in their tissues were always very low. The increase in Gln in the roots under HL occurred at the expense of Asp and Glu decay but this alteration did not occur in the leaves.

In both light intensities, *C. pachystachya* seedlings had a large predominance of  $\text{NO}_3^-$  in relation to amino acids in the xylem sap, in addition to high NR activity, especially in the leaves. This strategy corroborates the results found by Oliveira et al.

(2017) and Debiasi et al. (2019) for shade-intolerant species, characterized by the preferential use of  $\text{NO}_3^-$  in the leaves. However, in the HL treatment, *C. pachystachya* roots and leaves increased the assimilation of both  $^{15}\text{NO}_3^-$  and  $^{15}\text{NH}_4^+$  into amino acids. Coherently NR activity was strongly enhanced by HL, as well as which this light condition decreased content of  $\text{NO}_3^-$  in the leaves. Being shade-intolerant, the sharpest HL induction of metabolism and growth of *C. pachystachya* compared to the other species was expected. *Cecropia pachystachya* also shows a relatively high tolerance to  $\text{NH}_4^+$  when compared to other shade-intolerant species (Oliveira et al. 2017). Indeed, it has a wide geographic distribution in the neotropics and inhabits diverse well-illuminated habitats, including waterlogged, hypoxic soils, in which the main available N source is  $\text{NH}_4^+$  (dos Santos et al. 2020). Our results further reinforced the plasticity of *C. pachystachya* in the use of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$ .

In contrast, seedlings of the understory, shade-tolerant species (*G. kunthiana*) showed low NR activity in the leaves, a predominance of amino acids over  $\text{NO}_3^-$  in the xylem sap, high GS activity, and high amounts of  $^{15}\text{N}$ -amino acids derived from  $^{15}\text{NH}_4^+$  in the roots under both light intensities, which indicates the preference for the use of  $\text{NH}_4^+$  in the roots. This was particularly evident in the LL treatment, where  $^{15}\text{NO}_3^-$  assimilation was negligible. Thus, the strong preference for  $\text{NH}_4^+$  under limited light availability might be an adaptative response to the deeply shaded forest understory, avoiding the energetically more expensive assimilation of  $\text{NO}_3^-$ . However, this species showed plasticity in the use of N and, specifically, increased use of  $\text{NO}_3^-$  under HL, as indicated by the light-induced increment of  $^{15}\text{N}$  in most root and leaf amino acids in the presence of  $^{15}\text{NO}_3^-$ , but not of  $^{15}\text{NH}_4^+$ . Moreover, HL increased NR activity and the amount of  $^{15}\text{NO}_3^-$ -derived  $^{15}\text{N}$ -amino acids in both organs, as well as increasing the translocation of  $\text{NO}_3^-$  by the xylem sap and decreasing its accumulation in the leaves, which further reinforces the promotion of  $\text{NO}_3^-$  assimilation by HL. Although there was still a predominance of the  $^{15}\text{N}$ -amino acids derived from  $^{15}\text{NH}_4^+$  in the roots, the amount of  $^{15}\text{NO}_3^-$ -derived  $^{15}\text{N}$ -amino acids surpassed that for  $^{15}\text{NH}_4^+$  in HL leaves, indicating major relevance of foliar  $\text{NO}_3^-$  assimilation in this condition. It remains to be evaluated whether the HL-induced  $\text{NO}_3^-$ -assimilation by *G. kunthiana* leaves constitutes a photoprotective mechanism of photochemical quenching through the consumption of photosynthesis-generated reductants and ATP, as observed in cotton leaves (Guilherme et al. 2019). This strategy could help this species to deal with the seasonal changes in luminosity of the understory in semi(deciduous) forests. Seedlings of *G. kunthiana* also

showed a higher RSR under HL, which can be considered a regulation of biomass allocation by light to maximize growth in this condition (Sugiura and Tateno 2011), further reinforcing the plasticity of this species, which could contribute to its fitness.

*Cariniana estrellensis* demonstrated intermediate strategies of N use compared to the other species, as indicated by its values of foliar NR activity, GS activity, and  $\text{NO}_3^-$  content in the xylem sap. Moreover, data of  $^{15}\text{N}$  enrichment in amino acids indicate that, in this species, the assimilation of N from  $\text{NO}_3^-$  occurred especially in the leaves, while that of  $\text{NH}_4^+$  predominated in the roots, regardless of the light condition, ratifying the results found by Oliveira et al. (2017) and Debiasi et al. (2019). *Cariniana estrellensis* seedlings also showed intermediate N use responses to light intensity when compared to *C. pachystachya* and *G. kunthiana*. The HL treatment increased the assimilation of  $^{15}\text{NO}_3^-$  in the leaves and that of  $^{15}\text{NH}_4^+$  in the roots. In the leaves, the Ala content decreased, while the Pro content increased under HL. However, in HL leaves, there was no increase in  $^{15}\text{N}$  enrichment in Pro and the  $^{15}\text{NO}_3^-$ -derived  $^{15}\text{N}$  enrichment of Gln decreased, indicating that there was N remobilization in this light condition. Pro content also increased in *C. pachystachya* leaves and *G. kunthiana* xylem sap under HL and may play an important role in N storage and remobilization (Dellero et al. 2020), as well as in antioxidant defense under HL (Szabados and Savouré 2010). In addition, the accumulated Pro can be transported to the mitochondria to be used as a reducing power to maintain the high growth rates under HL (Szabados and Savouré 2010).

Overall, the hypothesis that the increase in light intensity induces the use of  $\text{NO}_3^-$  to the detriment of the use of  $\text{NH}_4^+$  by seedlings of neotropical tree species from different functional groups was partially accepted. Seedlings of *C. pachystachya* presented an increase in the use of both N sources with the increase in light intensity, indicating overall hampering of N metabolism of this shade-intolerant species under LL. *Guarea kunthiana* was extremely plastic, and the assimilation of  $\text{NO}_3^-$  in the roots and leaves increased substantially in the HL treatment, while it was almost completely avoided under LL. Seedlings of *C. estrellensis* assimilated very little  $\text{NO}_3^-$  in the roots and increased the assimilation of  $\text{NH}_4^+$  in this organ with light increases. In this species, the assimilation of  $\text{NO}_3^-$  increased in the leaves to the detriment of the use of  $\text{NH}_4^+$  under HL. In summary, the shade-intolerant species (*C. pachystachya*) showed an overall increase in N metabolism, while one of the shade-tolerant species (*G. kunthiana*) presented extreme plasticity in the use of N to changes in light intensity, which was much less intense in *C. estrellensis*.

These findings may help to elucidate the species distribution in neotropical forests, which can be extrapolated to other species of the same functional group in different tropical forests and possibly even other forest ecosystems. Plasticity in the N use, according to the light availability, could be determinant for the maintenance of an individual in a forest, where light varies both spatially and temporally, especially in the understory. The N source preferably used under certain conditions may provide a competitive advantage in such a variable environment that is subjected to disturbances (such as the opening of clearings) and consequently to substantial and sudden increases in light intensity.

### **Author Contributions**

TVD, HCO, LS: Ideas and formulation of research goals and aims. TVD: application of statistical analyses. HCO, LS: acquisition of the financial support for the project leading to this publication. TVD, AKC: conducting the research and investigation process, specifically performing the experiments. TVD, AKC, LS: development or design of methodology. HCO: management and coordination responsibility for the research activity planning and execution. HCO, LS: provision of the study materials. TVD, HCO: preparation and writing of the initial draft. TVD, AKC, LS, HCO: preparation of the manuscript, specifically critical review and revision.

### **Acknowledgements**

This study was financed in part by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) - Finance Code 001 (AKC, TVD), and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (HCO, grant 306583/2017-8). The authors are grateful to Diego Genuário Gomes for helping with the principal component analysis, to the Laboratory of Biodiversity and Ecosystem Restoration of the State University of Londrina for making the seeds available, and to the Department of Physiological Sciences from State University of Londrina for access to equipment used in biochemical analyses.

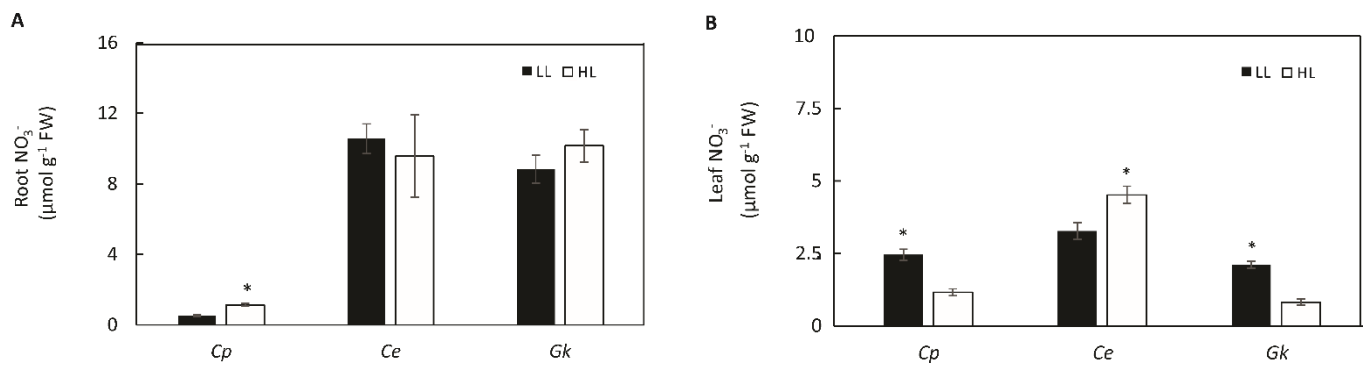
## References

- Aidar MPM, Schmidt S, Moss G, Stewart GR, Joly CA (2003) Nitrogen use strategies of neotropical rainforest trees in threatened Atlantic Forest. *Plant Cell Environ* 26: 389-399
- Ali A (2020) Nitrate assimilation pathway in higher plants: critical role in nitrogen signalling and utilization. *Plant Sci Today* 7: 182-192
- Andersen KM, Turner BL (2013) Preferences or plasticity in nitrogen acquisition by understory palms in a tropical montane forest. *J Ecol* 101: 819-825
- Andrews M, Raven JA, Lea PJ (2013) Do plants need nitrate? The mechanism by which nitrogen form affects plants. *Ann Appl Biol* 163: 174-199
- Ariz I, Asensio AC, Zamarreño AM, García-Mina JM, Aparicio-Tejo PM, Moran JF (2012) Changes in the C/N balance caused by increasing external ammonium concentrations are driven by carbon and energy availabilities during ammonium nutrition in pea plants: the key roles of asparagine synthetase and anaplerotic enzymes. *Physiol Plant* 148: 522-537
- Ashton IW, Miller AE, Bowman WD, Suding KN (2010) Niche complementarity due to plasticity in resource use: plant partitioning of chemical N forms. *Ecology* 91: 3252-3260
- Bloom AJ (2015) Photorespiration and nitrate assimilation: a major intersection between plant carbon and nitrogen. *Photosynth Res* 123: 117-128
- Boudsocq S, Niboyet A, Lata JC, Raynaud X, Loeuille N, Mathieu J, Blouin M, Abbadie L, Barot S (2012) Plant preference for Ammonium versus Nitrate: a neglected determinant of ecosystem functioning? *Am Nat* 180: 60-69
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Britto DT, Kronzucker HJ (2002)  $\text{NH}_4^+$  toxicity in higher plants: a critical review. *J Plant Physiol* 159: 567-584
- Calzavara AK, Bianchini E, Pimenta JA, Oliveira HC, Stolf-Moreira R (2019) Photosynthetic light-response curves of light-demanding and shade-tolerant seedlings of neotropical tree species. *Photosynthetica* 57: 470-474
- Chaves das Neves HJ, Vasconcelos AMP (1987) Capillary gas chromatography of amino acids, including asparagine and glutamine: sensitive gas chromatographic-mass spectrometric and selected ion monitoring gas chromatographic-mass spectrometric detection of the N, O (S)-*tert*-butyldimethylsilyl derivatives. *J Chromatogr* 392: 249-258
- Daryanto S, Wang L, Gilhooly III WP, Jacinthe PA (2019) Nitrogen preference across generations under changing ammonium nitrate ratios. *J Plant Ecol* 12: 235-244
- Dellero Y, Clouet V, Marnet N, Pellizzaro A, Dechaumet S, Niogret MF, Bouchereau A (2020) Leaf status and environmental signals jointly regulate proline metabolism in winter oilseed rape. *J Exp Bot* 71: 2098-2111
- Debiasi TV, Calzavara AK, da Silva LMI, da Silva JG, Bianchini E, Pimenta JA, Stolf-Moreira R, Aidar MPM, Sodek L, Oliveira HC (2019) Nitrogen metabolism of

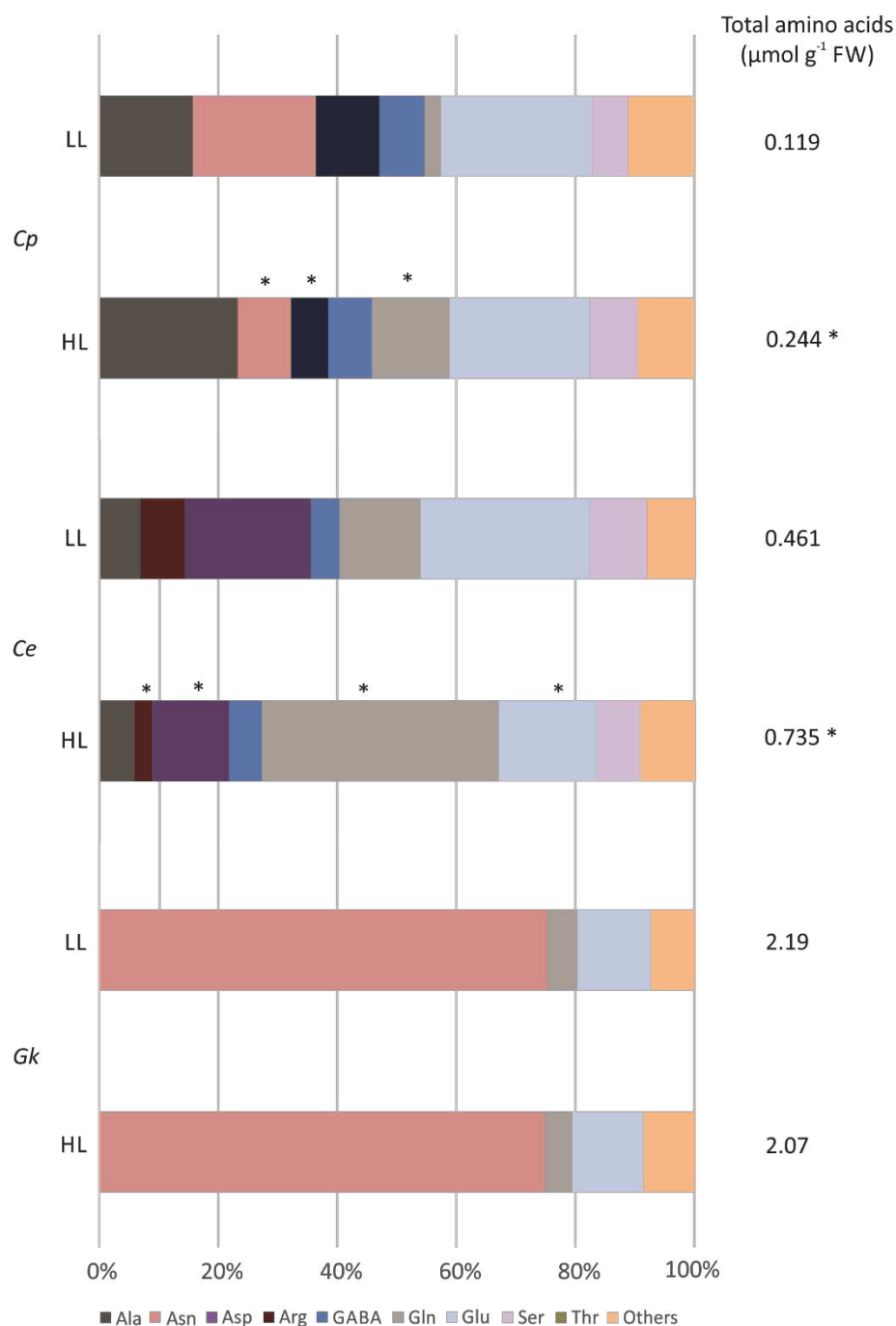
- Neotropical tree seedlings with contrasting ecological characteristics. *Acta Physiol Plant* 41: 131
- Delhon P, Gojon A, Tillard P, Passama L (1996) Diurnal regulation of  $\text{NO}_3^-$  uptake in soybean plants IV. Dependence on current photosynthesis and sugar availability to the roots. *J Exp Bot*: 47: 893-900
- Esteban R, Ariz I, Cruz C, Moran JF (2016) Review: Mechanisms of ammonium toxicity and the quest for tolerance. *Plant Sci* 248: 92-101
- Freschet GT, Swart EM, Cornelissen JHC (2015) Integrated plant phenotypic responses to contrasting above- and below-ground resources: key roles of specific leaf area and root mass fraction. *New Phytol* 206: 1247-1260
- Gessler A, Schneider S, Von Sengbusch D, Weber P, Hanemann U, Huber C, Rothe A, Kreutzer K, Rennenberg H (1998) Field and laboratory experiments on net uptake of nitrate and ammonium by the roots of spruce (*Picea abies*) and beech (*Fagus sylvatica*) trees. *New Phytol* 138: 275-285
- Godber IM, Parsons R (1998) Translocation of amino acids from stem nodules of *Sesbania rostrata* demonstrated by GC-MS in planta  $^{15}\text{N}$  isotope dilution. *Plant Cell Environ* 21: 1089-99
- Guilherme EA, Carvalho FEI, Daloso DM, Silveira JAG (2019) Increase in assimilatory nitrate reduction and photorespiration enhances  $\text{CO}_2$  assimilation under high light-induced photoinhibition in cotton. *Environ Exp Bot* 159: 66-74
- Hachiya T, Sakakibara H (2017) Interactions between nitrate and ammonium in their uptake, allocation, assimilation, and signaling in plants. *J Exp Bot* 68: 2501-2512
- Houlton BZ, Sigman DM, Shuur EAG, Heding LO (2007) A climate-driven switch in plant nitrogen acquisition within tropical forest communities. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 21
- Kambhampati S, Ajewole E, Marsolais F (2017) Advances in Asparagine Metabolism. In: Cánovas F, Luttge U, Matyssek R. *Progress in Botany*. Springer International Publishing, London, pp 49-74
- Lejay L, Wirth J, Pervent M, Cross JMF, Tillard P, Gojon A (2008) Oxidative Pentose Phosphate Pathway-Dependent Sugar Sensing as a Mechanism for Regulation of Root Ion Transporters by Photosynthesis. *J Plant Physiol* 146: 2036-2053
- Lemos-Filho JP, Barros CFA, Dantas GPM, Dias LG, Mendes RS (2010) Spatial and temporal variability of canopy cover and understory light in a Cerrado of Southern Brazil. *Braz J Biol* 70: 19-24
- Lillo C (2008) Signalling cascades integrating light-enhanced nitrate metabolism. *Biochem J* 415: 11-19
- Lindner A (2011) Small scale structure and dynamics in the Atlantic Forest – Notes on understory light fluctuation. *Trop Ecol* 52: 139-150
- Liu Y, von Wiren N (2017) Ammonium as a signal for physiological and morphological responses in plants. *J Exp Bot* 68: 2581-2592
- Ma X, Zhu C, Yang N, Gan L, Xia K (2016)  $\gamma$ -Aminobutyric acid addition alleviates ammonium toxicity by limiting ammonium accumulation in rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Physiol Plant* 158: 389-401

- Magalhães JR, Wilcox GE (1984) Ammonium toxicity development in tomato plants relative to nitrogen form and light intensity. *J Plant Nutr* 7: 1477-1496
- Miranda KM, Espey MG, Wink DA (2001) A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 5: 62-71
- Oliveira HC, Sodek L (2013) Effect of oxygen deficiency on nitrogen assimilation and amino acid metabolism by soybean root segments. *Amino Acids* 44: 743-755
- Oliveira HC, Freschi L, Sodek L (2013) Nitrogen metabolism and translocation in soybean plants subjected to root oxygen deficiency. *Plant Physiol Biochem* 66: 141-149
- Oliveira HC, da Silva LMI, de Freitas LD, Debiasi TV, Marchiori NM, Aidar MPM, Bianchini E, Pimenta JA, Stolf-Moreira R (2017) Nitrogen use strategies of seedlings from neotropical tree species of distinct successional groups. *Plant Physiol Biochem* 114: 119-127
- Oliveira IC, Brenner E, Chiu J, Hsieh MH, Kouranov A, Lam HM, Shin MJ, Coruzzi G (2001) Metabolite and light regulation of metabolism in plants: lessons from the study of a single biochemical pathway. *Braz J Med Biol Res* 34: 567-575
- O'Neal D, Joy KW (1974) Glutamine Synthetase of Pea Leaves. *J Plant Physiol* 54: 773-779
- Santos GL, Pereira MG, Delgado RC, Magistral IC, Silva CG, Oliveira CMM, Teodoro PE (2020) Antropogenic and climatic influences in the swamp environment of the Pandeiros River basin, Minas Gerais- Brazil. *Environ Monit Assess* 192: 219
- Sevillano I, Short I, Grant J, O'Reilly C (2016) Effects of light availability on morphology, growth and biomass allocation of *Fagus sylvatica* and *Quercus robur* seedlings. *Forest Ecol Manag* 374: 11-19
- Silvester WB, Parsons R, Watt PW (1996) Direct measurement of release and assimilation of ammonia in the *Gunnera-Nostoc* symbiosis. *New Phytol* 132: 617-625
- Stewart GR, Popp M, Holzappel I, Stewart JA, Dickie-Eskew A (1986) Localization of nitrate reduction in ferns and its relationship to environment and physiological characteristics. *New Phytol* 104: 373-384.
- Sugiura D, Tateno M (2011) Optimal Leaf-to-Root Ratio and Leaf Nitrogen Content Determined by Light and Nitrogen Availabilities. *Plos One* 6: e22236.
- Smirnoff N, Stewart GR (1985) Nitrate assimilation and translocation by higher plants: Comparative physiology and ecological consequences. *Physiol Plant* 64: 133-140
- Szabados L, Savouré A (2010) Proline: a multifunctional amino acids. *Trends Plant Sci* 15:89-97
- Wang L, Macko SA (2011) Constrained preferences in nitrogen uptake across plant species and environments. *Plant Cell Environ* 34: 525-534
- Xu X, Stange CF, Richter A, Wanek W, Kuzyakov Y (2008) Light affects competition for inorganic and organic nitrogen between maize and rhizosphere microorganisms. *Plant Soil* 304: 59-72
- Zhu Z, Gerendas J, Bendixen R, Schinner K, Tabrizi H, Sattelmacher B, Hansen UP (2000) Different tolerance to light stress in  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  grown *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Biol* 2: 558-570

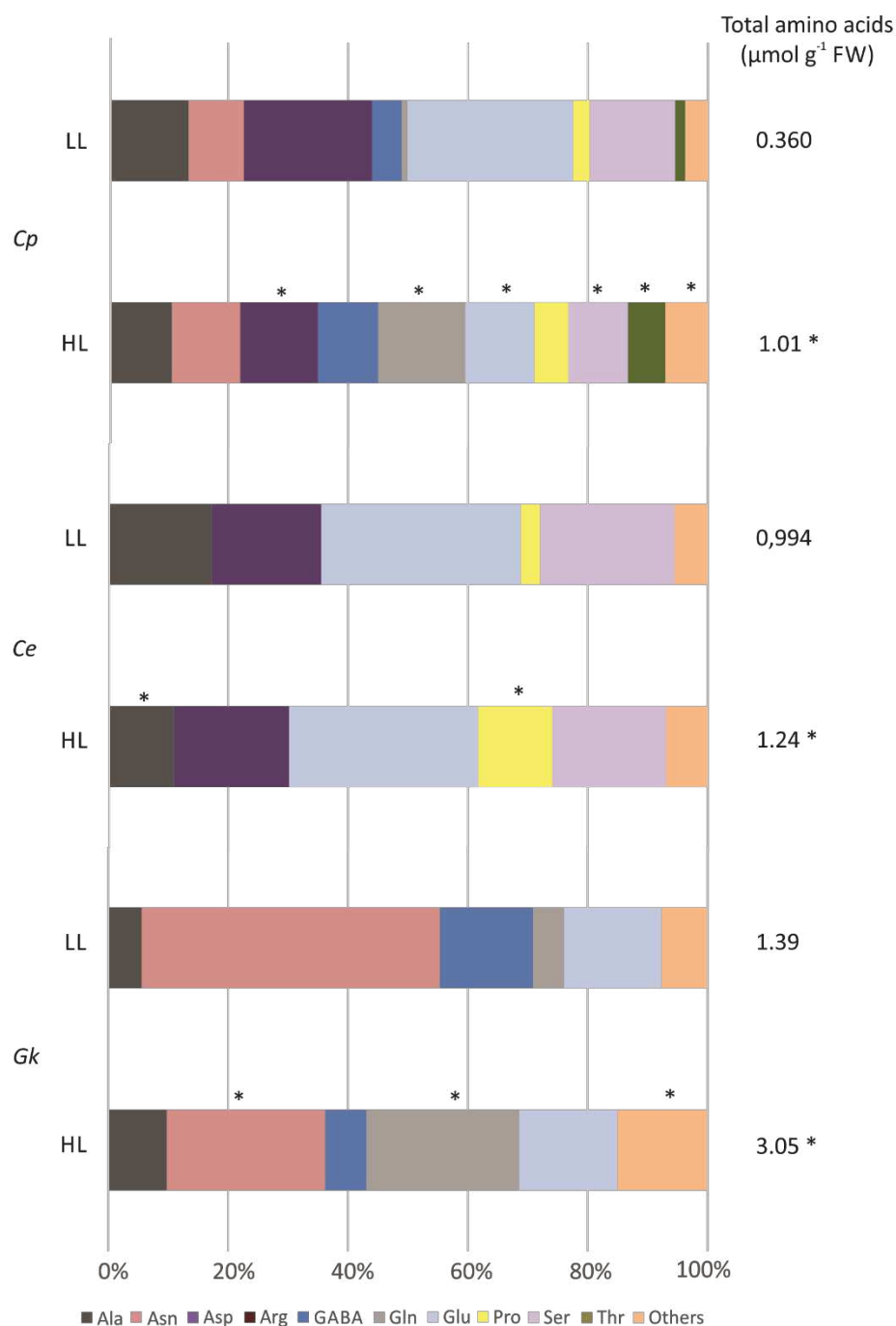
## Supplementary data



**Figure S1**  $\text{NO}_3^-$  contents in roots (A) and leaves (B) of *Cecropia pachystachya* (Cp), *Cariniana estrellensis* (Ce), and *Guarea kunthiana* (Gk) seedlings cultivated under lower light (LL) or higher light (HL) intensity.



**Figure S2** Relative amounts [in mol%] of individual amino acids and total amino acid content [in  $\mu\text{mol g}^{-1}$ ] in the roots of *Cecropia pachystachya* (*Cp*), *Cariniana estrellensis* (*Ce*), and *Guarea kunthiana* (*Gk*) seedlings cultivated under lower light (LL) or higher light (HL) intensity. Data are means  $\pm$  SE ( $n = 4$ ). Asterisks indicate significant differences between light treatments, for each species, according to the Student's *t*-test ( $p < 0.05$ ). Only amino acids detected in an amount above 3% are shown: Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid), Ser, and Thr. The amino acids included in "Others" are Gly, Ile, Leu, Phe, Pro, Tyr, and Val.



**Fig. S3** Relative amounts [in mol%] of individual amino acids and total amino acid content [in  $\mu\text{mol g}^{-1}$ ] in the leaves of *Cecropia pachystachya* (Cp), *Cariniana estrellensis* (Ce), and *Guarea kunthiana* (Gk) seedlings cultivated under lower light (LL) or higher light (HL) intensity. Data are means  $\pm$  SE ( $n = 4$ ). Asterisks indicate significant differences between light treatments, for each species, according to the Student's *t*-test ( $p < 0.05$ ). Only amino acids detected in an amount above 3% are shown: Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid), Pro, Ser, and Thr. The amino acids included in "Others" are Gly, Ile, Leu, Phe, Tyr, and Val.

## 4. CAPÍTULO 2 - Influência da intensidade luminosa nas respostas à fonte de nitrogênio de mudas de espécies arbóreas neotropicais de grupos funcionais distintos

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

Department of Animal and Plant Biology, UEL—Londrina State University, Londrina, PR, Brazil

\*Correspondence: [halley@uel.br](mailto:halley@uel.br)

**Pretende-se submeter esse artigo na revista *Physiologia Plantarum***

**Regras:** <http://physiologiaplantarum.org/instructions-for-manuscrip/>

### Resumo

A assimilação do N depende de energia e esqueletos de carbono gerados na fotossíntese. O consumo energético pelas plantas é mais elevado quando o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) é utilizado, em comparação ao uso direto de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ). Neste estudo, foi testada a hipótese de que o cultivo com  $\text{NO}_3^-$  é desfavorável ao desenvolvimento de mudas arbóreas neotropicais sob baixa luminosidade, mas, conforme a intensidade luminosa aumenta, o cultivo com esse ânion se torna favorável em relação ao  $\text{NH}_4^+$ . Mudas de *Cecropia pachystachya* (intolerante à sombra), *Guarea kunthiana* (tolerante à sombra, de sub-bosque) e *Cariniana estrellensis* (tolerante à sombra, que atinge o dossel) foram cultivadas em meio hidropônico com  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  como fonte única de N e submetidas a diferentes intensidades luminosas: 3,5 (BL), 26,5 (ML) ou 100% (AL) da luminosidade ambiente, por 60 dias. Foram avaliados parâmetros de crescimento, fotossintéticos e bioquímicos. As três espécies apresentaram decréscimo do crescimento no cultivo com  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao  $\text{NO}_3^-$ , sob ML e AL, mas não sob BL. Essa diminuição foi de 64% (ML) e 54% (AL) em *C. pachystachya*, de 22% (ML) e 36% (AL) em *G. kunthiana* e de 32% (ML) e 20% (AL) em *C. estrellensis*. A assimilação aumentada de N em aminoácidos no tratamento com  $\text{NH}_4^+$  provavelmente foi um dreno energético que levou à redução do crescimento nas três espécies sob ML e AL. O menor crescimento foi associado à diminuição da área foliar e à limitação estomática da fotossíntese em *C. pachystachya*, e à menor área foliar, à limitação em parâmetros fotossintéticos e ao estresse oxidativo em *G. kunthiana*. As três espécies tiveram a absorção de cátions afetada negativamente pelo  $\text{NH}_4^+$ , principalmente de cálcio e manganês, além de potássio em *C. pachystachya* e *G. kunthiana*. *Cariniana estrellensis* teve a concentração de nutrientes menos afetada pelo  $\text{NH}_4^+$  e foi a espécie que demonstrou maior tolerância ao  $\text{NH}_4^+$  sob maiores luminosidades. Dentre as mudas cultivadas com  $\text{NH}_4^+$ , *C. estrellensis* foi a única que aumentou o crescimento sob ML (+130%) e AL (+158%), em comparação com BL e não apresentou redução da área foliar, acúmulo de  $\text{NH}_4^+$  nas folhas e limitações da fotossíntese sob ML e AL. Não é possível afirmar que o cultivo com  $\text{NO}_3^-$  foi desfavorável ao desenvolvimento das mudas sob baixa luminosidade, sendo que a luz limitou o crescimento de maneira similar em ambos os tratamentos de N. Com o aumento da intensidade luminosa, o cultivo com  $\text{NO}_3^-$  foi amplamente favorável ao desenvolvimento das mudas, em comparação ao cultivo com  $\text{NH}_4^+$ .

**Palavras-chave:** amônio, árvore, assimilação, fotossíntese, luz, metabolismo, nitrato, nitrogênio.

## 1. Introdução

O nitrogênio (N) é um nutriente mineral absorvido pelas raízes que compõe diversas moléculas orgânicas nas plantas, como proteínas, clorofilas e ácidos nucleicos (Ali, 2020). As formas inorgânicas do nitrogênio são encontradas no solo principalmente como nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) (Baslam et al., 2021). A fonte de N afeta processos metabólicos e fisiológicos nos vegetais, sendo que entre as espécies de plantas a tolerância ou preferência a uma determinada fonte de N está vinculada ao ambiente ao qual é adaptada (Araus et al., 2020; Ortigosa et al., 2020).

A absorção e assimilação do N são dispendiosas. O consumo energético é mais elevado quando o  $\text{NO}_3^-$  é utilizado, em comparação ao uso direto de  $\text{NH}_4^+$ , uma vez que este cátion não precisa ser reduzido para ser assimilado (Rubio-Asensio e Bloom, 2017). Enquanto o  $\text{NO}_3^-$  pode ser armazenado em altas concentrações nos vacúolos até ser utilizado (Liu et al., 2014), a maioria das espécies vegetais mostram sintomas de estresse (redução de crescimento) em concentrações de moderada ou alta de  $\text{NH}_4^+$  (Britto e Kronzucker, 2002; Esteban et al., 2016). Dentre as principais causas descritas para a redução do crescimento, estão a redução da fotossíntese, a inibição da absorção de cátions essenciais, como potássio, magnésio e cálcio, e a energia envolvida com mecanismos de detoxificação, como o bombeamento de  $\text{NH}_4^+$  para o meio externo e a rápida assimilação desse cátion em aminoácidos nas raízes (Jian et al., 2018; de la Peña et al., 2019; Carr et al., 2020; Feng et al., 2020).

A assimilação do N depende de energia e esqueletos de carbono (C) gerados na fotossíntese (Ali, 2020). A redução do  $\text{NO}_3^-$  até o  $\text{NH}_4^+$  ocorre principalmente durante o dia, devido ao uso de redutores gerados na fotossíntese (Baslam et al., 2021). Os fotoassimilados gerados na fotossíntese são usados na glicólise e posteriormente no ciclo dos ácidos tricarbóxicos e rotas anapleróticas associadas, gerando os esqueletos de C necessários à assimilação do N (Vega-Mas et al., 2019). Mesmo que o  $\text{NH}_4^+$  não precise ser reduzido para ser assimilado, há um gasto excessivo de energia na presença de alta concentração desse cátion, especialmente nas raízes, para que haja sua rápida assimilação em aminoácidos, evitando sua translocação para a parte aérea (Vega-Mas et al., 2019; Hachiya et al., 2021).

A luz é a fonte de energia para a absorção e assimilação do N. Sob luminosidades baixas, o crescimento vegetal é negativamente afetado, devido à insuficiência de energia, o que limita a taxa fotossintética e, conseqüentemente, o metabolismo do C e do N (Pascual et al., 2017). Por outro lado, o excesso de luz sobrecarrega os complexos

coletores de luz e pode gerar espécies reativas de oxigênio e levar à fotoinibição (Sharma et al., 2019). Espécies pioneiras, intolerantes à sombra e de rápido crescimento, são caracterizadas por terem alta demanda por luz e apresentarem elevadas taxas fotossintéticas, de respiração e de absorção de nutrientes, além de alto potencial de produção de fotoassimilados e alta concentração de N em seus tecidos (Prado-Junior et al., 2016). Já espécies tolerantes à sombra são adaptadas a ambientes com menos luz e apresentam menores taxas fotossintéticas, respiratórias e de crescimento (Prado-Junior et al., 2016).

Para uma análise abrangente dos efeitos da luminosidade em plantas cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ , é crucial a escolha de espécies vegetais com diferentes demandas por luz. *Cecropia pachystachya* é uma típica espécie intolerante à sombra, com elevadas taxas de crescimento e fotossíntese (Oliveira et al, 2017; Debiasi et al., 2021). *Cariniana estrellensis* e *Guarea kunthiana* são intolerantes à sombra, mas *C. estrellensis* é uma espécie que atinge o dossel e apresenta maior demanda de luz do que *G. kunthiana*, uma espécie típica de sub-bosque (Oliveira et al, 2017; Debiasi et al., 2021). As três espécies demonstraram tolerância moderada ao  $\text{NH}_4^+$  em experimento realizado com areia como substrato (Oliveira et al., 2017). Quando cultivadas com nitrato de amônio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), o aumento de luminosidade induz a assimilação de ambas as fontes de N ( $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$ ) nas raízes e folhas de *C. pachystachya*, de  $\text{NO}_3^-$  nas raízes e folhas de *G. kunthiana* e de  $\text{NH}_4^+$  nas raízes e  $\text{NO}_3^-$  nas folhas de *C. estrellensis* (Debiasi et al., 2021).

Como não há estudos que avaliam os efeitos da variação de luminosidade em mudas de espécies arbóreas neotropicais cultivadas com uma única fonte de N ( $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ ), é difícil prever as respostas das plantas. Deve-se considerar que o  $\text{NO}_3^-$  tem um alto gasto energético para ser assimilado, mas também que a síndrome do  $\text{NH}_4^+$  envolve sua rápida assimilação em moléculas orgânicas, altamente dispendiosa. Neste estudo, objetivou-se verificar os efeitos das diferentes fontes de N ( $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ ) sobre o crescimento, fotossíntese e metabolismo de mudas de espécies arbóreas neotropicais de grupos funcionais distintos, sob diferentes intensidades luminosas. Foi levantada a hipótese de que o cultivo com  $\text{NO}_3^-$  é desfavorável ao desenvolvimento de mudas sob baixa luminosidade, mas, conforme a intensidade luminosa aumenta, o cultivo com esse ânion se torna favorável em relação ao  $\text{NH}_4^+$ .

## 2. Material e métodos

### 2.1. Material vegetal e condições de crescimento

Foram utilizadas espécies arbóreas empregadas em programas de reflorestamento desenvolvidos pelo viveiro de mudas do Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas (LABRE), da Universidade Estadual de Londrina (UEL). As espécies com diferentes características ecológicas selecionadas para o estudo foram *Cecropia pachystachya* Trécul (Urticaceae), espécie pioneira e intolerante à sombra, *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze (Lecythidaceae), espécie que atinge o dossel, tolerante à sombra e *Guarea kunthiana* A. Juss. (Meliaceae), espécie típica de sub-bosque, com alto grau de tolerância à sombra.

Em casa de vegetação, as sementes das espécies arbóreas foram germinadas em caixas com areia esterilizada. Após a expansão completa do primeiro eófilo, as mudas foram transferidas para a hidroponia, onde foram submetidas aos tratamentos. Cada muda foi cultivada em recipiente de 550 mL de solução nutritiva que foi aerada continuamente e renovada semanalmente. O pH foi mantido próximo a 5,5. Ao todo, foram cultivados 54 indivíduos de cada espécie, divididos igualmente em dois tratamentos de fontes de nitrogênio ( $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ ). Os recipientes correspondentes a cada tratamento foram preenchidos com solução nutritiva composta por 0,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 50  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$ -EDTA, 46,3  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 9  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$ , 0,75  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ , 0,3  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 0,35  $\mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$  e 2 mM  $\text{KNO}_3$  ou 1 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fonte de N ([N] total = 2 mM), com suplementação de KCl 2 mM no tratamento de  $\text{NH}_4^+$ . As mudas de cada tratamento de N foram cultivadas sob diferentes níveis de luz ao longo do experimento: baixa luminosidade (BL: 20-60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de radiação fotossinteticamente ativa (PAR)), média luminosidade (ML: 200-450  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e alta luminosidade (AL: 1000-1700  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), resultando em 9 indivíduos por tratamento com variações de luminosidade. Os tratamentos de N foram casualizados dentro de cada nível de luz. A intensidade de luz desejada foi atingida com o uso de telas do tipo sombrite. Após 60 dias, foram realizadas análises fotossintéticas, medição dos parâmetros biométricos e coletadas amostras de raízes e folhas para análise dos parâmetros bioquímicos.

## 2.2. Análises de crescimento

Para avaliar o crescimento das mudas, foi medida a área foliar total da planta (AF) usando o medidor de área foliar LI-3000 (LiCor Inc., Lincoln, NE, EUA). As massas secas da raiz, da parte aérea e total (raiz + parte aérea) foram medidas ao término do experimento. Para isso, as partes vegetativas foram secas a 60 °C por 72 h e, depois, pesadas. Foi calculada a razão de massa seca da raiz/parte aérea (R/PA).

### 2.3. Análises fotossintéticas

#### 2.3.1. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*

Ao final do experimento, foram avaliados parâmetros fotossintéticos das mudas. As análises foram feitas na folha intacta mais nova completamente expandida, utilizando-se um analisador portátil de gases por infravermelho, modelo LICOR 6400 XT (LiCor Inc., Lincoln, NE, EUA), conectado a uma câmara de medição de 6 cm<sup>2</sup> com fonte de luz artificial (a 1500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) suficiente para saturar a fotossíntese das três espécies. As análises foram realizadas entre 8 e 10 h (M: início da manhã) e entre 12 e 14 h (MD: meio-dia). Nos dois períodos, foram medidas a assimilação líquida de CO<sub>2</sub> ( $A_{\text{max}}$ ), a condutância estomática ( $g_s$ ) e a concentração intercelular de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ).

A fluorescência da clorofila *a* foi medida com um fluorômetro OS1p (OptiSciences), permitindo verificar a atividade potencial do fotossistema II ( $F_v/F_0$ ), em folhas intactas (Lichtenthaler et al., 2005). Durante 10 minutos, as folhas foram mantidas no escuro com cliques foliares para a análise da fluorescência inicial ( $F_0$ ). Em seguida, a fluorescência máxima ( $F_m$ ) foi analisada após pulso de irradiância saturante e a fluorescência variável ( $F_v$ ) foi calculada utilizando a seguinte fórmula:  $F_v = F_m - F_0$ . A razão  $F_v/F_0$  foi medida antes do amanhecer (M) e às 12 h (MD) para verificar a ocorrência de fotoinibição crônica e dinâmica, respectivamente.

#### 2.3.2. Curvas de resposta da fotossíntese à concentração de CO<sub>2</sub>

As curvas  $A-C_i$  foram feitas com o analisador portátil de gases por infravermelho LICOR 6400 XT com a *PAR* da câmara foliar definida para 1500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e CO<sub>2</sub> de referência inicial para 400  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ . Após o início, a concentração de CO<sub>2</sub> da câmara foi alterada, sequencialmente, para 250, 150, 50, 400, 600, 1000, 1300, 1600, 1900 e 2200  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ . A eficiência de carboxilação ( $\epsilon$ ) e a taxa fotossintética líquida saturada por CO<sub>2</sub> ( $A_{\text{max,CO}_2}$ ) foram determinadas a partir dos ajustes das porções inicial linear e final saturada das curvas  $A-C_i$ , respectivamente. O modelo de Excel descrito por Sharkey et al. (2007) foi usado para estimar a taxa de carboxilação máxima pela ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (rubisco) ( $V_{\text{cmax}}$ ), taxa de transporte de elétrons fotossintéticos ( $J$ ), taxa de uso de trioses-fosfato ( $TPU$ ), taxa de respiração diurna ( $R_d$ ) e a condutância do mesófilo ( $g_m$ ). A limitação estomática da fotossíntese ( $L_s$ ) foi calculada de acordo com a equação 1 (Stangl et al., 2021):

$$L_s = \frac{A_{Ca} - A_{Ci}}{A_{Ca}} \times 100 \quad (1)$$

Em que  $A_{Ca}$  é a assimilação de  $\text{CO}_2$  considerando-se a  $C_i$  igual à concentração de  $\text{CO}_2$  do ambiente, ou seja, sem limitação à difusão, e  $A_{Ci}$  é a assimilação de  $\text{CO}_2$  que realmente ocorre sob a concentração de  $\text{CO}_2$  do ambiente.

### 2.3.3. Curvas de resposta da taxa de transporte de elétrons do fotossistema II à luz

Curvas rápidas de luz, da taxa de transporte de elétrons do fotossistema II ( $ETR$ ) pela  $PAR$ , foram feitas com o fluorômetro, entre 8 e 10 h. Após 30 min de aclimação das folhas ao escuro, a  $PAR$  foi aumentada gradativamente (0, 25, 50, 75, 200, 300, 400, 500, 700 e 1000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). O rendimento quântico efetivo do PSII, expresso por  $\Delta F/F_m'$ , foi determinado após 30 s em cada  $PAR$ , e a  $ETR$  foi calculada de acordo com a equação 2 (Baker, 2008):

$$ETR = \frac{0,5 \times 0,84 \times \Delta F}{F_m' \times PAR} \quad (2)$$

A produtividade quântica aparente do fotossistema II ( $\alpha$ ), a taxa máxima de transporte de elétrons do PSII ( $ETR_{max}$ ) e o ponto de saturação luminoso da  $ETR$  ( $PSL_{ETR}$ ) foram determinados usando o ajuste da curva rápida de luz a uma função exponencial simples no programa Sigma Plot 10.0 (SPSS Inc., San Rafael, CA, USA) (Rascher et al., 2000). O quenching não fotoquímico ( $NPQ$ ) foi calculado em 500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , de acordo com a equação 3 (Baker 2008):

$$NPQ = \frac{F_m}{F_m'} - 1 \quad (3)$$

## 2.4. Análises bioquímicas

### 2.4.1. Coleta

Porções finas das ramificações da raiz primária e as últimas folhas desenvolvidas, completamente expandidas, foram coletadas para análises de metabólitos. As porções de raízes e folhas foram coletadas em  $\text{N}_2$  líquido e armazenadas a  $-80^\circ\text{C}$ .

#### 2.4.2. Determinação dos níveis de amônio, aminoácidos, açúcares redutores e clorofila

Para extração dos metabólitos, as amostras foram pulverizadas em N<sub>2</sub> líquido. Compostos de baixo peso molecular (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, aminoácidos livres e açúcares solúveis) foram extraídos com MCW (metanol/clorofórmio/água, 12/5/3, v/v/v), de acordo com Oliveira e Sodek (2013).

O teor de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> foi determinado pelo método fenol-hipoclorito (McCullough, 1967), com modificações. Para isso, a amostra foi misturada com o reagente 1 (fenol 1 % e nitroprussiato de sódio 0,2 mM) e, subsequentemente, com o reagente 2 (NaOH 125 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 150 mM e NaClO 0,12 %). Após reagir por 35 minutos a 37 °C, a absorbância foi lida a 625 nm. A concentração de aminoácidos livres foi quantificada pelo ensaio com ninhidrina (Yemm e Cocking, 1955). Para isso, a amostra, tampão citrato 0,2 mM (pH 5), ninhidrina (5 % em metilcelusolve) e KCN (10 mM em metilcelusolve) foram misturados e mantidos a 100 °C por 20 minutos. Depois, a mistura foi diluída em etanol 60% e a absorbância foi lida a 570 nm. Em ambas as dosagens, as leituras das absorbâncias foram feitas em leitor de microplacas SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA).

O teor de açúcares redutores totais (ART) foi determinado pelo método de Somogyi-Nelson (Maldonado et al., 2013), com modificações. Para isso, a amostra foi hidrolisada utilizando HCl 2N e aquecida em banho maria a 100 °C por 10 minutos. Subsequentemente, a amostra foi resfriada em banho de gelo e acrescentado NaOH 2N para neutralizar a reação. Após a hidrólise, a amostra foi misturada com o reagente 1 (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 25 mM, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 193 mM, NaHCO<sub>3</sub> 190 mM, KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>.4H<sub>2</sub>O 42 mM, NaSO<sub>4</sub> 126 mM), aquecida a 100 °C por 6 minutos e posteriormente foi adicionado o reagente 2 ((NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O 2mM, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2%, Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O 32 mM). Após a adição dos reagentes, a mistura ficou em repouso por 5 minutos e, em seguida, foi acrescentada água destilada e feita a leitura a 540 nm. As leituras das absorbâncias foram feitas em leitor de microplacas SpectraMax Plus 384.

Clorofilas foram extraídas de folhas acondicionadas no escuro por 15 dias em acetona 80% diluída em tampão fosfato (pH 7,2). O teor total de clorofilas (Chl) foi determinado utilizando os coeficientes de extinção e equações de Lichtenthaler e Wellburn (1983). A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro Genesys 10S UV-VIS (Thermo Fischer Scientific, Waltham, EUA).

### 2.4.3. Nitrogênio total

O teor de N foi dosado usando matéria seca de raízes e folhas. As amostras foram pulverizadas e, posteriormente, uma alíquota de 0,1 g de cada amostra foi digerida em 1,5 mL de ácido sulfúrico, na presença de catalisador (0,05 g de  $K_2SO_4 + CuSO_4$  10:1, m/m), a 350 °C. Após a digestão, o material foi diluído em água destilada (1/600). Em seguida, foi adicionado, em 1 mL da diluição, 1 mL do reagente A ( $C_7H_6O_3$  50 g  $L^{-1} + C_6H_5Na_3O_7$  50 g  $L^{-1} + NaOH$  25 g  $L^{-1}$ ), 1 mL do reagente B ( $Na_2[Fe(CN)_5NO] \cdot 2H_2O$  1,0 g  $L^{-1}$ ) e 1 mL do reagente C (NaClO 0,15%), de acordo com Willis et al. (1996). Após 1 h, foi realizada leitura a 697 nm em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific). O teor de N total em raízes e folhas ( $N_{tot}$ ) foi calculado pela multiplicação do teor de N em  $mg\ kg^{-1}$  pela massa seca do órgão.

### 2.4.4. Nutrientes

Nutrientes foram dosados usando matéria seca de raízes e folhas. Aproximadamente 0,1 g das amostras foi transferido para tubos de 15 mL. Em seguida, 1,5 mL de  $HNO_3$  (concentrado) foi adicionado aos tubos e as amostras foram deixadas em repouso por aproximadamente 48 h (etapa de pré-digestão). Após este período, as amostras foram aquecidas em banho maria a uma temperatura de 90 °C por 4 h. Por fim, os tubos foram preenchidos com água ultrapura até completarem 15 mL.

Para controlar possíveis contaminações dos reagentes e do manuseio das amostras durante o procedimento de preparo de amostras, brancos analíticos foram preparados e submetidos às mesmas etapas e procedimentos das amostras. Por fim, as amostras foram analisadas por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS 7900, Agilent, Japão), para determinar os teores de cálcio (Ca), cobre (Cu), ferro (Fe) potássio (K), manganês (Mn), magnésio (Mg) e zinco (Zn), de acordo com de Oliveira Maximino et al. (2020).

### 2.4.5. Estresse oxidativo

As concentrações de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e de dienos conjugados foram medidas em raízes e folhas, como marcadores de estresse oxidativo. Após extração com TCA (0,2 %) diluído em metanol, seguida de centrifugação, o sobrenadante foi tratado com iodeto de potássio em tampão fosfato. Após 1 h de reação no escuro, a concentração de  $H_2O_2$  foi determinada pela leitura da absorbância a 390 nm utilizando-se leitor de

microplacas Victor TM 3 (Perkin Elmer, Turku, Finlândia) (Alexieva et al. 2001). Para determinar o teor de dienos conjugados, as amostras foram extraídas com etanol 96%, seguida de centrifugação. O sobrenadante foi diluído em etanol 96% e as leituras das absorbâncias foram feitas em 234 e 500 nm (Boveris et al. 1980). A diferença entre os dois valores obtidos foi utilizada para calcular o teor de dienos conjugados usando o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon = 2,65 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### 2.5. Análise estatística

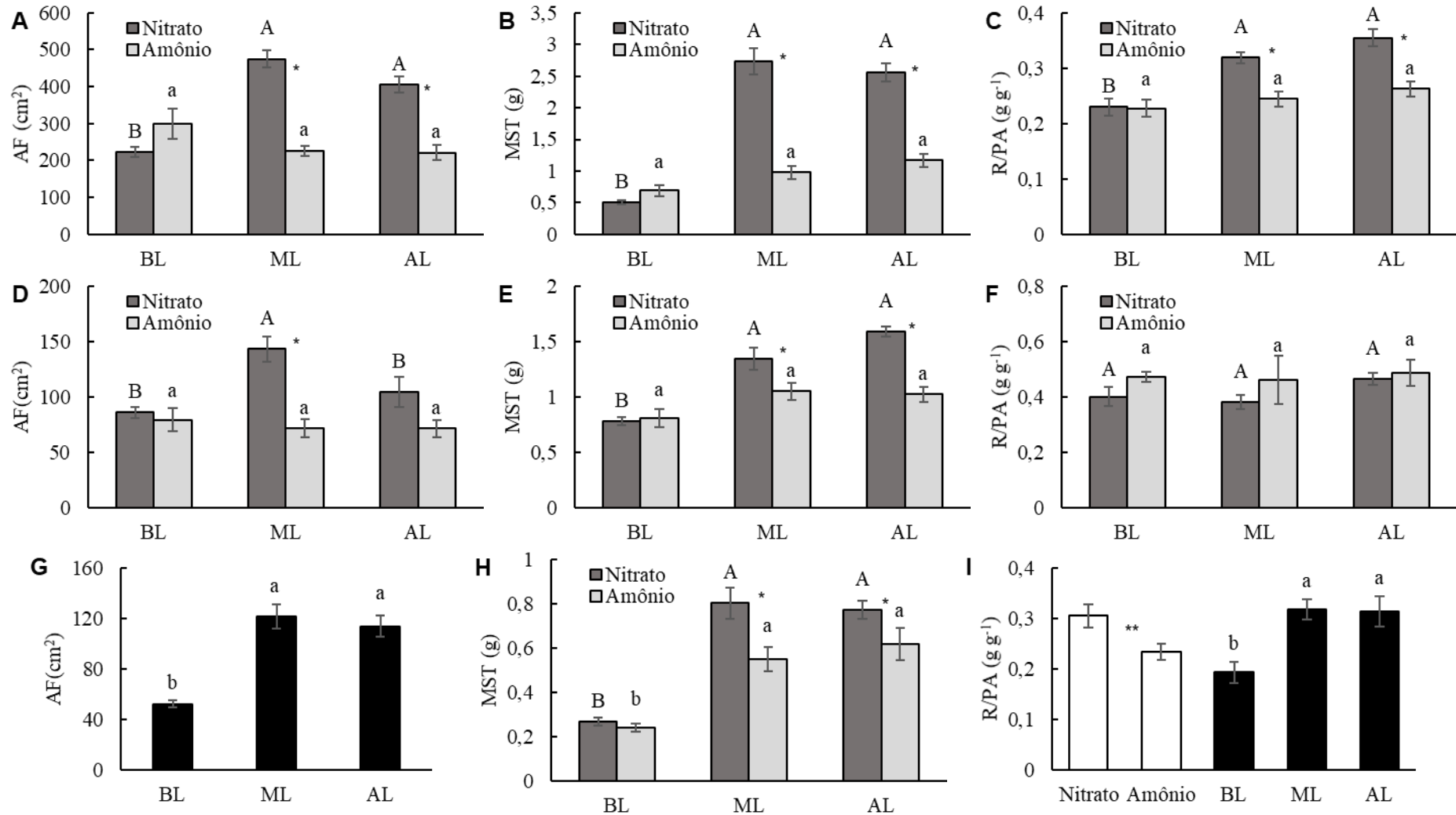
Os dados foram submetidos à análise de variância (*ANOVA*) de dois fatores e, quando houve efeito da interação (fonte de N  $\times$  luminosidade), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey HSD ( $P < 0,05$ ) dentro de cada nível dos fatores fonte de N ( $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ ) e luminosidade (BL, ML e AL). Em caso de interação não significativa, foram testados os efeitos, separadamente, da fonte de N (teste *F*) e da luminosidade (*Tukey HSD*,  $P < 0,05$ ). As análises estatísticas foram feitas no programa Statistica, versão 12.0 (StatSoft, Tulsa, EUA). Os valores de *F* e *P* da *ANOVA* de dois fatores com as variáveis utilizadas no estudo constam na tabela S1.

Foi feita uma análise de componentes principais (PCA) com as variáveis de crescimento, fotossintéticas e bioquímicas para avaliar como a intensidade luminosa e as fontes de N influenciaram cada espécie, utilizando o programa R (Stats package, versão 4.0.2).

## 3. Resultados

### 3.1. Análises de crescimento

As mudas de *C. pachystachya* apresentaram maior AF quando cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  sob ML e AL, em relação à BL (Fig. 1A). Sob ML e AL, a AF foi maior no tratamento com  $\text{NO}_3^-$ , em relação ao  $\text{NH}_4^+$  (Fig. 1A). A MST aumentou sob ML e AL, em relação à BL, quando cultivadas com  $\text{NO}_3^-$ , efeito que não foi verificado em plantas cultivadas com  $\text{NH}_4^+$  (Fig. 1B). Dessa forma, o cultivo com  $\text{NO}_3^-$  sob ML e AL levou ao expressivo aumento da MST, em comparação com o  $\text{NH}_4^+$  (Fig. 1B). No tratamento com  $\text{NO}_3^-$ , a R/PA foi maior sob ML e AL, em relação à BL, sendo que nas maiores luminosidades as plantas cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  apresentaram maior R/PA, em relação ao  $\text{NH}_4^+$  (Fig. 1C). Vale destacar que, em mudas cultivadas sob BL, nenhum dos parâmetros de crescimento foi afetado pela fonte de N.



**Figura 1** Área foliar (AF), massa seca total (MST) e razão massa seca da raiz/parte aérea (R/PA) de mudas de *Cecropia pachystachya* (A-C), *Guarea kunthiana* (D-F) e *Cariniana estrellensis* (G-I) cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fonte de nitrogênio. Os dados são médias  $\pm$  erros-padrão. Nas colunas brancas, asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos de N, de acordo com a ANOVA (teste F; \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ;  $n = 27$ ). Nas colunas pretas, médias com letras iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de luz (Tukey HSD;  $P < 0,05$ ;  $n = 18$ ). Nas colunas cinzas claras e escuras, médias com letras maiúsculas (comparam tratamentos com  $\text{NO}_3^-$ ) ou minúsculas (comparam tratamentos com  $\text{NH}_4^+$ ) iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de luz, e asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos com diferentes fontes N dentro de cada tratamento de luz (Tukey HSD;  $P < 0,05$ ;  $n = 9$ ).

Em mudas de *G. kunthiana*, a AF foi maior quando cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  sob ML, em relação à BL e AL, sendo que sob ML a AF foi maior no  $\text{NO}_3^-$ , em relação ao  $\text{NH}_4^+$  (Fig. 1D). A MST aumentou sob ML e AL, em relação à BL, quando cultivadas com  $\text{NO}_3^-$ , diferença não verificada em plantas cultivadas com  $\text{NH}_4^+$  (Fig. 1E). Plantas tratadas com  $\text{NO}_3^-$ , sob ML e AL, apresentaram maior MST do que plantas tratadas com  $\text{NH}_4^+$ . Sob BL, não houve diferença na AF e na MST entre as fontes de N. Além disso, a R/PA não diferiu entre os tratamentos nessa espécie (Fig. 1F).

Em *C. estrellensis*, a AF foi influenciada apenas pela luminosidade, sendo maior sob ML e AL, em relação à BL (Fig. 1G). A MST foi maior em mudas sob ML e AL, em relação à BL. Além disso, o  $\text{NO}_3^-$  influenciou positivamente a MST das mudas sob ML e AL, em comparação ao cultivo com  $\text{NH}_4^+$  (Fig. 1H). Sob BL, a fonte de N não afetou a MST. A R/PA, independente da luminosidade, foi maior em mudas cultivadas com  $\text{NO}_3^-$ , em comparação com o  $\text{NH}_4^+$  e as maiores luminosidades influenciaram positivamente a R/PA das mudas, em relação à BL, independente da fonte de nitrogênio (Fig. 1I).

### 3.2. Análises fotossintéticas

#### 3.2.1. $A_{\max}$ , $g_s$ , $C_i$ e $F_v/F_0$

Nas mudas de *C. pachystachya*, independente da luminosidade a  $A_{\max}$  M e  $g_s$  M foram maiores no cultivo com  $\text{NO}_3^-$ , em relação ao  $\text{NH}_4^+$ , e também foi maior sob ML e AL do que sob BL, independente da fonte de nitrogênio (Tabela 1). Na análise feita ao meio dia, verificou-se diminuição da  $A_{\max}$  MD e da  $g_s$  MD em mudas tratadas com  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao  $\text{NO}_3^-$ , apenas sob ML e AL. Entre plantas cultivadas com  $\text{NH}_4^+$ , a  $g_s$  foi maior sob ML, em relação à BL, enquanto no cultivo com  $\text{NO}_3^-$  foi maior sob ML e AL, em relação à BL. A  $C_i$  M foi maior no cultivo com  $\text{NO}_3^-$ , em relação ao  $\text{NH}_4^+$ , e também foi maior sob BL do que sob ML e AL (Tabela 1). A  $C_i$  MD foi maior no tratamento com  $\text{NO}_3^-$ , em relação ao  $\text{NH}_4^+$ . A  $F_v/F_0$  M foi maior sob BL e ML, em comparação à AL. Na análise feita ao meio dia, verificou-se diminuição da  $F_v/F_0$  MD sob ML e uma diminuição ainda mais drástica sob AL, em comparação à BL.

Nas mudas de *G. kunthiana*, a  $A_{\max}$  M foi influenciada apenas pela fonte de N, com aumento no tratamento  $\text{NO}_3^-$ , em relação ao  $\text{NH}_4^+$  (Tabela 2). A  $g_s$  M foi maior sob BL, em comparação com a ML. Já a  $A_{\max}$  MD, sob BL, foi maior no  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao  $\text{NO}_3^-$ , mas a situação se inverte sob ML. Sob BL, a  $g_s$  MD foi maior no tratamento com  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao  $\text{NO}_3^-$ , e entre as mudas cultivadas com  $\text{NO}_3^-$ , foi maior sob ML em comparação à BL. A  $C_i$  M foi influenciada apenas pela fonte de N, sendo maior no tratamento com  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao  $\text{NO}_3^-$ . Já a  $C_i$  MD não diferiu entre

os tratamentos. A  $F_v/F_0$  M foi maior sob BL, em comparação à ML e AL. Já ao meio-dia, verificou-se que houve diminuição progressiva da  $F_v/F_0$  MD com o aumento de luminosidade.

**Tabela 1.** Análises fotossintéticas de mudas de *Cecropia pachystachya* cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fonte de nitrogênio.

Variável		Manhã				Meio-dia			
		BL	ML	AL	Média	BL	ML	AL	Média
$A_{\max}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$\text{NO}_3^-$	7,33	13,9	14,5	12,0A	7,05bA	16,9aA	15,3aA	13,1
	$\text{NH}_4^+$	7,45	11,4	13,0	10,6B	6,42bA	13,5aB	11,1aB	10,3
	Média	7,39b	12,6a	13,7a		6,74	15,2	13,3	
$g_s$ ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$\text{NO}_3^-$	0,207	0,357	0,404	0,322A	0,165bA	0,539aA	0,406aA	0,370
	$\text{NH}_4^+$	0,171	0,218	0,289	0,231B	0,122bA	0,300aB	0,236abB	0,219
	Média	0,191b	0,288a	0,347a		0,144	0,419	0,326	
$C_i$ ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ )	$\text{NO}_3^-$	314	291	299	302A	274	287	275	279A
	$\text{NH}_4^+$	304	273	275	284B	256	263	256	258B
	Média	309a	282b	287b		265a	275a	266a	
$F_v/F_0$	$\text{NO}_3^-$	4,11	3,82	3,37	3,77A	3,12	2,35	2,14	2,54A
	$\text{NH}_4^+$	4,09	4,17	3,59	3,95A	3,04	2,84	2,28	2,72A
	Média	4,10a	3,99a	3,48b		3,08a	2,59b	2,21c	

Assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  saturada pela luz ( $A_{\max}$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ), atividade potencial do fotossistema II ( $F_v/F_0$ ). Os dados são médias ( $n = 9$ ). Médias com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre os tratamentos de luz (*Tukey HSD*;  $P < 0,05$ ;  $n = 18$ ). Médias com letras maiúsculas iguais na coluna mesma coluna não diferem significativamente entre os tratamentos de N (*ANOVA*; teste  $F$ ;  $P < 0,05$   $n = 27$ ).

**Tabela 2.** Análises fotossintéticas de mudas de *Guarea kunthiana* cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fonte de nitrogênio.

Variável		Manhã				Meio-dia			
		BL	ML	AL	Média	BL	ML	AL	Média
$A_{\max}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$\text{NO}_3^-$	6,69	5,62	7,38	6,56A	3,11aB	4,78aA	4,52aA	4,11
	$\text{NH}_4^+$	6,06	4,66	5,40	5,40B	5,27aA	2,74bB	4,32abA	4,16
	Média	6,377a	5,14a	6,34a		4,19	3,76	4,42	
$g_s$ ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$\text{NO}_3^-$	0,153	0,099	0,122	0,126A	0,029bB	0,054aA	0,049abA	0,045
	$\text{NH}_4^+$	0,152	0,121	0,118	0,131A	0,062aA	0,045aA	0,041aA	0,050
	Média	0,153a	0,110b	0,120ab		0,047	0,050	0,045	
$C_i$ ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ )	$\text{NO}_3^-$	315	302	284	301B	230	242	232	235A
	$\text{NH}_4^+$	322	323	313	319A	236	254	206	233A
	Média	319a	313a	299a		233a	248a	220a	
$F_v/F_0$	$\text{NO}_3^-$	3,38	2,40	2,46	2,72A	3,71	2,82	1,98	2,87A
	$\text{NH}_4^+$	3,34	2,47	2,20	2,67A	3,58	2,90	1,81	2,76A
	Média	3,36a	2,44b	2,33b		3,65a	2,86b	1,89c	

Assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  saturada pela luz ( $A_{\max}$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ), atividade potencial do fotossistema II ( $F_v/F_0$ ). Os dados são médias ( $n = 9$ ). Médias com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre os tratamentos de luz (*Tukey HSD*;  $P < 0,05$   $n = 18$ ). Médias com letras maiúsculas iguais na coluna mesma coluna não diferem significativamente entre os tratamentos de N (*ANOVA*; teste  $F$ ;  $P < 0,05$   $n = 27$ ).

Em *C. estrellensis*, a  $A_{\max}$  M,  $A_{\max}$  MD e  $g_s$  MD foram influenciadas apenas pela fonte de N, que foi maior no tratamento  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao  $\text{NO}_3^-$  (Tabela 3). A  $C_i$  M e  $C_i$  MD não apresentaram diferenças entre os tratamentos. A  $F_v/F_0$  M e  $F_v/F_0$  MD foram maiores no tratamento com  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao  $\text{NO}_3^-$ . Além disso, houve diminuição progressiva da  $F_v/F_0$  MD com o aumento de luminosidade, independente da fonte de nitrogênio.

**Tabela 3.** Análises fotossintéticas de mudas de *Cariniana estrellensis* cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fonte de nitrogênio.

Variável		Manhã				Meio-dia			
		BL	ML	AL	Média	BL	ML	AL	Média
$A_{\max}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$\text{NO}_3^-$	3,23	3,62	3,54	3,46B	1,60	2,31	2,37	2,14B
	$\text{NH}_4^+$	3,97	4,50	4,21	4,23A	2,33	3,57	2,74	2,90A
	Média	3,60	4,06	3,87		2,01	2,97	2,56	
$g_s$ ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$\text{NO}_3^-$	0,049	0,045	0,050	0,048A	0,023	0,026	0,031	0,027A
	$\text{NH}_4^+$	0,051	0,062	0,054	0,056A	0,030	0,046	0,036	0,037B
	Média	0,050a	0,053a	0,052a		0,026	0,035	0,033	
$C_i$ ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ )	$\text{NO}_3^-$	299	267	292	286A	253	234	275	253A
	$\text{NH}_4^+$	279	284	273	279A	252	257	255	255A
	Média	289a	276a	283a		253a	245a	264a	
$F_v/F_0$	$\text{NO}_3^-$	3,12	2,81	2,44	2,79B	3,48	1,64	1,11	2,06B
	$\text{NH}_4^+$	3,61	3,32	2,96	3,30A	3,68	2,45	1,81	2,65A
	Média	3,36	3,07	2,70		3,59a	2,05b	1,48c	

Assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  saturada pela luz ( $A_{\max}$ ), condutância estômática ( $g_s$ ), concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ), atividade potencial do fotossistema II ( $F_v/F_0$ ). Os dados são médias ( $n = 9$ ). Médias com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre os tratamentos de luz (*Tukey HSD*;  $P < 0,05$ ;  $n = 18$ ). Médias com letras maiúsculas iguais na coluna mesma coluna não diferem significativamente entre os tratamentos de N (*ANOVA*; teste  $F$ ;  $P < 0,05$ ;  $n = 27$ ).

### 3.2.2. Curvas de resposta ao $\text{CO}_2$

Mudas de *C. pachystachya* tratadas com  $\text{NO}_3^-$  tiveram maior  $A_{\max, \text{CO}_2}$  sob ML e AL, em relação à BL (Tabela 4). Quando cultivadas com  $\text{NH}_4^+$ , a  $A_{\max, \text{CO}_2}$  foi maior sob ML do que sob AL e BL. Sob ML, as mudas cultivadas com  $\text{NH}_4^+$  apresentaram maior  $A_{\max, \text{CO}_2}$ , em relação às com  $\text{NO}_3^-$ . Em mudas tratadas com  $\text{NO}_3^-$ , houve redução da  $\varepsilon$  sob BL, em relação à ML e AL, o que não foi observado em mudas tratadas com  $\text{NH}_4^+$ . Sob ML e AL, plantas tratadas com  $\text{NH}_4^+$  apresentaram menor  $\varepsilon$  do que as tratadas com  $\text{NO}_3^-$ . A  $V_{\text{cmax}}$ ,  $J$  e  $TPU$  foram maiores nos tratamentos ML e AL, em relação ao BL e houve influência da fonte de N, sendo maior no  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao  $\text{NO}_3^-$ . A  $R_d$  foi maior nos tratamentos ML e AL, em relação ao BL e houve influência da fonte de N, sendo maior no  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao  $\text{NO}_3^-$ . A  $g_m$  foi menor sob ML e AL quando tratadas com  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao  $\text{NO}_3^-$ . Entre as plantas tratadas com  $\text{NO}_3^-$ , a  $g_m$  foi maior sob ML e AL, em relação à BL. A  $L_s$  foi maior no cultivo com  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao  $\text{NO}_3^-$  e também foi maior sob ML e AL, em relação à BL.

Em mudas de *G. kunthiana*, apenas sob AL, a  $A_{\max,CO_2}$  foi maior no tratamento com  $NO_3^-$ , em relação ao  $NH_4^+$ . Em plantas tratadas com  $NO_3^-$  em BL apresentaram menor  $A_{\max,CO_2}$ , do que aquelas em AL (Tabela 5). Nos tratamentos ML e AL houve diminuição da  $\epsilon$  em mudas cultivadas com  $NH_4^+$ , em relação à BL, sendo que sob AL houve redução nesta variável, em relação ao cultivo com  $NO_3^-$ . As mudas tratadas com  $NH_4^+$  sob AL apresentaram menor  $A_{\max,CO_2}$ ,  $V_{\max}$ ,  $J$  e  $TPU$ , em relação ao tratamento com  $NO_3^-$ . Entre as mudas cultivadas com  $NO_3^-$ , houve aumento da  $A_{\max,CO_2}$  sob AL e da  $V_{\max}$  e  $J$  sob ML e AL, em relação à BL. Sob AL houve a queda da  $A_{\max,CO_2}$ ,  $V_{\max}$  e  $J$  em mudas tratadas com  $NH_4^+$ , em relação ao  $NO_3^-$ . A  $TPU$  também foi influenciada pela luminosidade, aumentando sob ML e AL, em relação à BL. A  $R_d$  foi maior sob ML e AL, em comparação com a BL, independentemente da fonte de N. A  $g_m$  foi menor sob ML e AL do que sob BL, independente da fonte de N. A  $L_s$  não diferiu entre os tratamentos.

**Tabela 4.** Variáveis de curvas  $A-C_i$  de mudas de *Cecropia pachystachya* cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato ( $NO_3^-$ ) ou amônio ( $NH_4^+$ ) como fonte de nitrogênio.

Variável		BL	ML	AL	Média
$A_{\max,CO_2}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$NO_3^-$	14,1bA	26,1aB	25,9aA	22,5
	$NH_4^+$	15,8cA	33,0aA	28,2bA	25,7
	Média	15,0	29,6	27,1	
$\epsilon$ ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$NO_3^-$	0,030bA	0,067aA	0,065aA	0,054
	$NH_4^+$	0,037aA	0,049aB	0,048aB	0,045
	Média	0,034	0,058	0,057	
$V_{\max}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$NO_3^-$	36,0	74,3	72,6	60,9B
	$NH_4^+$	43,9	90,0	86,4	73,5A
	Média	40,0b	82,2a	79,5a	
$J$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$NO_3^-$	50,3	103,6	104,1	86,0B
	$NH_4^+$	58,3	117,0	115,3	96,9A
	Média	54,3b	110,3a	109,7a	
$TPU$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$NO_3^-$	4,33	8,32	8,39	7,17B
	$NH_4^+$	4,73	9,32	9,14	7,73A
	Média	4,55b	8,82a	8,76a	
$R_d$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$NO_3^-$	1,43	2,04	1,93	1,79B
	$NH_4^+$	1,27	3,58	3,77	2,87A
	Média	1,35b	2,81a	2,93a	
$g_m$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$ )	$NO_3^-$	0,918bA	2,03aA	1,56aA	1,50
	$NH_4^+$	1,23aA	0,704aB	0,870aB	0,94
	Média	1,07	1,37	1,21	
$L_s$	$NO_3^-$	18,7	24,9	24,3	22,6B
	$NH_4^+$	23,5	36,8	37,4	32,3A
	Média	21,3b	31,4a	30,9a	

Assimilação líquida de  $CO_2$  saturada pelo  $CO_2$  ( $A_{\max,CO_2}$ ), eficiência de carboxilação ( $\epsilon$ ), taxa de carboxilação máxima da rubisco ( $V_{\max}$ ), taxa de transporte de elétrons fotossintéticos ( $J$ ), taxa de utilização de trioses-fosfato ( $TPU$ ), taxa de respiração diurna ( $R_d$ ), condutância do mesofilo ( $g_m$ ), limitação estomática da fotossíntese ( $L_s$ ). Os dados são médias ( $n = 6$ ). Médias com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre os

tratamentos de luz (*Tukey HSD*;  $P < 0,05$ ;  $n = 12$ ). Médias com letras maiúsculas iguais na coluna mesma coluna não diferem significativamente entre os tratamentos de N (*ANOVA*; teste *F*;  $P < 0,05$ ;  $n = 18$ ).

Em *C. estrellensis*, a  $A_{\max,CO_2}$  foi influenciada apenas pela luminosidade, sendo maior sob ML e AL, em relação à BL (Tabela 6). A  $\varepsilon$  também foi influenciada apenas pela luminosidade nesta espécie, sendo maior sob ML, em relação à BL. A  $V_{c\max}$ ,  $J$  e  $TPU$  foram maiores sob ML e AL, em relação à BL. A  $g_m$  foi maior no cultivo com  $NO_3^-$ , em relação ao  $NH_4^+$ , ao passo que o oposto ocorreu com a  $R_d$  e  $TPU$  (maiores valores no tratamento com  $NH_4^+$ ). A  $L_s$  não diferiu entre os tratamentos.

**Tabela 5.** Variáveis de curvas  $A-C_i$  de mudas de *Guarea kunthiana* cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato ( $NO_3^-$ ) ou amônio ( $NH_4^+$ ) como fonte de nitrogênio.

Variável		BL	ML	AL	Média
$A_{\max,CO_2}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$NO_3^-$	10,9bA	12,7abA	14,8aA	12,9
	$NH_4^+$	10,8aA	10,4aA	9,3aB	10,1
	Média	10,8	11,5	12,1	
$\varepsilon$ ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$NO_3^-$	0,030aA	0,033aA	0,038aA	0,034
	$NH_4^+$	0,036aA	0,025bA	0,026bB	0,029
	Média	0,334	0,029	0,033	
$V_{c\max}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$NO_3^-$	32,2bA	58,7aA	64,9aA	51,9
	$NH_4^+$	37,9aA	46,0aA	38,8aB	40,9
	Média	35,1	52,4	51,8	
$J$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$NO_3^-$	46,3bA	66,2aA	69,9aA	60,8
	$NH_4^+$	50,5aA	60,5aA	49,6aB	53,5
	Média	48,4	63,4	59,7	
$TPU$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$NO_3^-$	3,66	5,13	5,39	4,73A
	$NH_4^+$	3,87	4,61	4,18	4,22B
	Média	3,76b	4,87a	4,78a	
$R_d$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$NO_3^-$	2,18	4,49	4,93	3,92A
	$NH_4^+$	2,60	5,27	6,18	4,65A
	Média	2,39b	4,85a	5,51a	
$g_m$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$ )	$NO_3^-$	1,09	0,511	1,05	0,895A
	$NH_4^+$	1,09	0,919	0,226	0,776A
	Média	1,09a	0,715b	0,708b	
$L_s$	$NO_3^-$	39,2	36,7	46,1	40,9A
	$NH_4^+$	36,6	38,2	39,8	38,3A
	Média	37,9a	37,4a	42,9a	

Assimilação líquida de  $CO_2$  saturada pelo  $CO_2$  ( $A_{\max,CO_2}$ ), eficiência de carboxilação ( $\varepsilon$ ), taxa de carboxilação máxima da rubisco ( $V_{c\max}$ ), taxa de transporte de elétrons fotossintéticos ( $J$ ), taxa de utilização de trioses-fosfato ( $TPU$ ), taxa de respiração diurna ( $R_d$ ), condutância do mesófilo ( $g_m$ ), limitação estomática da fotossíntese ( $L_s$ ). Os dados são médias ( $n = 6$ ). Médias com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre os tratamentos de luz (*Tukey HSD*;  $P < 0,05$ ;  $n = 12$ ). Médias com letras maiúsculas iguais na coluna mesma coluna não diferem significativamente entre os tratamentos de N (*ANOVA*; teste *F*;  $P < 0,05$ ;  $n = 18$ ).

### 3.2.2. Curvas de resposta à luz

Em mudas de *C. pachystachya*, a  $\alpha$  sofreu influência apenas da luminosidade, sendo maior sob ML e AL, em relação à BL (Tabela 7). O  $NPQ$  também só foi influenciado pela luminosidade, sendo maior no tratamento AL, em relação à BL. Quando cultivadas com  $\text{NO}_3^-$ , a  $ETR_{\text{max}}$  aumentou de acordo com a luminosidade, sendo maior sob AL e menor sob BL. Quando cultivadas com  $\text{NH}_4^+$ , a  $ETR_{\text{max}}$  foi maior sob ML e AL, em relação à BL. Além disso, houve diminuição na  $ETR_{\text{max}}$  sob AL no tratamento com  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao  $\text{NO}_3^-$ . O  $PSL_{\text{ETR}}$  foi maior nos tratamentos ML e AL, em relação ao BL, e houve influência da fonte de N, sendo maior no cultivo com  $\text{NO}_3^-$ , em relação ao  $\text{NH}_4^+$ .

**Tabela 6.** Variáveis de curvas  $A-C_i$  de mudas de *Cariniana estrellensis* cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fonte de nitrogênio.

Variável		BL	ML	AL	Média
$A_{\text{max,CO}_2}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$\text{NO}_3^-$	7,79	12,5	12,6	11,0A
	$\text{NH}_4^+$	8,33	13,0	13,8	11,7A
	Média	8,06b	12,8a	13,2a	
$\epsilon$ ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$\text{NO}_3^-$	0,022	0,028	0,027	0,025A
	$\text{NH}_4^+$	0,022	0,027	0,026	0,025A
	Média	0,022b	0,027a	0,026ab	
$V_{\text{cmax}}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$\text{NO}_3^-$	22,7	38,0	40,6	34,2A
	$\text{NH}_4^+$	22,7	35,6	46,1	34,8A
	Média	22,7b	36,7a	43,4a	
$J$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$\text{NO}_3^-$	34,9	51,8	55,1	47,0A
	$\text{NH}_4^+$	32,3	56,8	58,2	49,9A
	Média	33,7b	54,5a	56,6a	
$TPU$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$\text{NO}_3^-$	2,71	4,02	3,94	3,53B
	$\text{NH}_4^+$	2,76	4,55	4,47	3,93A
	Média	2,73b	4,30a	4,21a	
$R_d$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$\text{NO}_3^-$	1,56	2,36	2,45	2,11B
	$\text{NH}_4^+$	1,73	2,78	3,06	2,52A
	Média	1,65b	2,58a	2,76a	
$g_m$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$ )	$\text{NO}_3^-$	0,606	1,24	0,489	0,738A
	$\text{NH}_4^+$	0,753	0,532	0,432	0,572B
	Média	0,685ab	0,829a	0,460b	
$L_s$	$\text{NO}_3^-$	40,7	46,0	47,4	44,6A
	$\text{NH}_4^+$	47,1	47,7	51,6	48,8A
	Média	43,9a	46,9a	49,5a	

Assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  saturada pelo  $\text{CO}_2$  ( $A_{\text{max,CO}_2}$ ), eficiência de carboxilação ( $\epsilon$ ), taxa de carboxilação máxima da rubisco ( $V_{\text{cmax}}$ ), taxa de transporte de elétrons fotossintéticos ( $J$ ), taxa de utilização de trioses-fosfato ( $TPU$ ), taxa de respiração diurna ( $R_d$ ), condutância do mesofilo ( $g_m$ ), limitação estomática da fotossíntese ( $L_s$ ). Os dados são médias ( $n = 6$ ). Médias com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre os tratamentos de luz (*Tukey HSD*;  $P < 0,05$ ;  $n = 12$ ). Médias com letras maiúsculas iguais na coluna mesma coluna não diferem significativamente entre os tratamentos de N (*ANOVA*; teste *F*;  $P < 0,05$ ;  $n = 18$ ).

Em *G. kunthiana*, a  $\alpha$  diminuiu em plantas cultivadas com  $\text{NH}_4^+$  sob ML e AL, em relação à BL (Tabela 8). Além disso, sob ML, a  $\alpha$  foi menor no tratamento com  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao  $\text{NO}_3^-$ . O  $NPQ$  foi maior sob AL, em relação ao BL, e não foi influenciado pela fonte de N. No cultivo com  $\text{NH}_4^+$ , a  $ETR_{max}$  diminuiu sob ML e AL, em relação à BL. Sob BL, essa variável foi maior no cultivo com  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao  $\text{NO}_3^-$ , mas a situação se inverte sob ML (maior no cultivo com  $\text{NO}_3^-$ ). O  $PSL_{ETR}$  diminuiu sob ML em plantas cultivadas com  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao  $\text{NO}_3^-$ .

**Tabela 7.** Variáveis de curvas de resposta à luz de mudas de *C. pachystachya* cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fonte de nitrogênio.

Variável		BL	ML	AL	Média
$\alpha$ ( $\mu\text{mol } \mu\text{mol}^{-1}$ )	$\text{NO}_3^-$	0,135	0,187	0,200	0,174A
	$\text{NH}_4^+$	0,139	0,169	0,165	0,158A
	Média	0,137b	0,178a	0,183a	
$ETR_{max}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$\text{NO}_3^-$	43,2cA	69,2bA	91,3aA	67,9
	$\text{NH}_4^+$	29,7bA	71,4aA	67,0aB	56,0
	Média	36,5	70,3	79,1	
$PSL_{ETR}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$\text{NO}_3^-$	438	621	678	587A
	$\text{NH}_4^+$	262	570	564	465B
	Média	342b	595a	621a	
$NPQ$	$\text{NO}_3^-$	2,00	2,32	2,51	2,29A
	$\text{NH}_4^+$	2,06	1,87	2,40	2,11A
	Média	2,03b	2,10ab	2,46a	

Produtividade quântica aparente do fotossistema II ( $\alpha$ ), taxa máxima de transporte de elétrons do PSII ( $ETR_{max}$ ), ponto de saturação luminoso da  $ETR$  ( $PSL_{ETR}$ ) e Quenching não fotoquímico ( $NPQ$ ). Os dados são médias ( $n = 6$ ). Médias com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre os tratamentos de luz (*Tukey HSD*;  $P < 0,05$ ;  $n = 12$ ). Médias com letras maiúsculas iguais na coluna mesma coluna não diferem significativamente entre os tratamentos de N (*ANOVA*; teste *F*;  $P < 0,05$ ;  $n = 18$ ).

**Tabela 8.** Variáveis de curvas de resposta à luz de mudas *G. kunthiana* cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fonte de nitrogênio.

Variável		BL	ML	AL	Média
$\alpha$ ( $\mu\text{mol } \mu\text{mol}^{-1}$ )	$\text{NO}_3^-$	0,156aA	0,185aA	0,189aA	0,177
	$\text{NH}_4^+$	0,201aA	0,097bB	0,141bA	0,146
	Média	0,179	0,141	0,165	
$ETR_{max}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$\text{NO}_3^-$	33,4aB	49,6aA	43,4aA	42,1
	$\text{NH}_4^+$	53,3aA	24,8bB	33,0bA	37,2
	Média	43,3	37,2	38,7	
$PSL_{ETR}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$\text{NO}_3^-$	376aA	539aA	563aA	492
	$\text{NH}_4^+$	536aA	337bB	481abA	451
	Média	456	438	522	
$NPQ$	$\text{NO}_3^-$	1,51	1,99	2,05	1,85A
	$\text{NH}_4^+$	1,38	1,86	2,30	1,85A

	Média	1,45b	1,93ab	2,17a
--	-------	-------	--------	-------

Produtividade quântica aparente do fotossistema II ( $\alpha$ ), taxa máxima de transporte de elétrons do PSII ( $ETR_{max}$ ), ponto de saturação luminoso da  $ETR$  ( $PSL_{ETR}$ ) e Quenching não fotoquímico ( $NPQ$ ). Os dados são médias ( $n = 6$ ). Médias com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre os tratamentos de luz (*Tukey HSD*;  $P < 0,05$ ;  $n = 12$ ). Médias com letras maiúsculas iguais na coluna mesma coluna não diferem significativamente entre os tratamentos de N (*ANOVA*; teste *F*;  $P < 0,05$ ;  $n = 18$ ).

Em *C. estrellensis*, tanto a intensidade luminosa quanto a fonte de N não aferam a  $\alpha$ , A  $ETR_{max}$  foi influenciada apenas pela luminosidade, sendo maior sob AL, em comparação à BL (Tabela 9). O  $PSL_{ETR}$  nas mudas cultivadas com  $NO_3^-$  foi maior sob ML e AL, em relação à BL. Além disso, sob ML e AL, o  $PSL_{ETR}$  foi maior no tratamento com  $NO_3^-$ , em relação ao  $NH_4^+$ . O cultivo com  $NH_4^+$  levou à diminuição do  $NPQ$ , quando comparado ao  $NO_3^-$ .

**Tabela 9.** Variáveis de curvas de resposta à luz de mudas de *C. estrellensis* cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato ( $NO_3^-$ ) ou amônio ( $NH_4^+$ ) como fonte de nitrogênio.

Variável		BL	ML	AL	Média
$\alpha$ ( $\mu\text{mol } \mu\text{mol}^{-1}$ )	$NO_3^-$	0,168	0,172	0,185	0,175A
	$NH_4^+$	0,189	0,175	0,164	0,175A
	Média	0,178a	0,173a	0,175a	
$ETR_{max}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$NO_3^-$	33,7	44,5	54,6	44,3A
	$NH_4^+$	38,0	34,0	41,7	37,9A
	Média	35,9b	39,3ab	48,1a	
$PSL_{ETR}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$NO_3^-$	301bA	532aA	674aA	493
	$NH_4^+$	360aA	299aB	402aB	354
	Média	330	416	526	
$NPQ$	$NO_3^-$	1,97	2,17	1,98	2,04A
	$NH_4^+$	1,81	1,78	1,92	1,84B
	Média	1,89a	1,98a	1,95a	

Produtividade quântica aparente do fotossistema II ( $\alpha$ ), taxa máxima de transporte de elétrons do PSII ( $ETR_{max}$ ), ponto de saturação luminoso da  $ETR$  ( $PSL_{ETR}$ ) e Quenching não fotoquímico ( $NPQ$ ). Os dados são médias ( $n = 6$ ). Médias com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre os tratamentos de luz (*Tukey HSD*;  $P < 0,05$ ;  $n = 12$ ). Médias com letras maiúsculas iguais na coluna mesma coluna não diferem significativamente entre os tratamentos de N (*ANOVA*; teste *F*;  $P < 0,05$ ;  $n = 18$ ).

### 3.3. Dados bioquímicos

#### 3.3.1 Amônio, aminoácidos, açúcares totais e clorofila

Nas mudas de *C. pachystachya*, o teor de ART foi maior no cultivo com  $NH_4^+$ , em relação ao  $NO_3^-$ , e o aumento da luminosidade levou ao aumento dessa variável nas folhas (Tabela 10). O teor de aminoácidos nas raízes foi influenciado apenas pela fonte de N, sendo maior no tratamento com  $NH_4^+$ , em relação ao  $NO_3^-$ . O teor de aminoácidos totais nas folhas aumentou no cultivo com  $NH_4^+$ , apenas nas maiores luminosidades. Os teores de  $NH_4^+$  nas raízes e nas folhas foram maiores no tratamento com  $NH_4^+$  em relação ao  $NO_3^-$ . Ao avaliar o efeito da luminosidade, observa-se que

os teores de  $\text{NH}_4^+$  nas raízes e nas folhas foram menores em AL e BL, respectivamente, em relação às outras condições de luz. O Chl foi influenciado apenas pela fonte de N, sendo maior no  $\text{NO}_3^-$ , em relação ao  $\text{NH}_4^+$ .

**Tabela 10.** Variáveis bioquímicas de raízes e folhas de mudas de *C. pachystachya* cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fonte de nitrogênio.

Órgão	Variável		BL	ML	AL	Média
Raiz	ART ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	$\text{NO}_3^-$	0,066	0,089	0,094	0,083A
		$\text{NH}_4^+$	0,153	0,385	0,163	0,233A
		Média	0,114a	0,253a	0,132a	
	Aminoácidos totais ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	$\text{NO}_3^-$	9,45	9,28	14,0	10,7B
		$\text{NH}_4^+$	16,3	14,4	12,9	14,6A
		Média	12,9a	11,8a	13,4a	
	$\text{NH}_4^+$ ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	$\text{NO}_3^-$	0,833	0,645	0,357	0,611B
		$\text{NH}_4^+$	1,75	2,18	1,23	1,72A
		Média	1,29a	1,41a	0,79b	
Folha	ART ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	$\text{NO}_3^-$	0,765	3,51	7,91	4,06B
		$\text{NH}_4^+$	1,63	9,81	11,9	7,81A
		Média	1,20c	6,66b	9,95a	
	Aminoácidos totais ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	$\text{NO}_3^-$	10,6aA	10,8aB	8,89aB	10,1
		$\text{NH}_4^+$	19,2bA	31,7aA	26,7abA	25,8
		Média	14,9	21,2	17,8	
	$\text{NH}_4^+$ ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	$\text{NO}_3^-$	0,256	0,366	0,647	0,427B
		$\text{NH}_4^+$	0,409	1,48	1,54	1,14A
		Média	0,333b	0,986a	1,09a	
	Chl ( $\text{mg g}^{-1}$ MF)	$\text{NO}_3^-$	2,15	2,39	2,13	2,21A
		$\text{NH}_4^+$	2,36	1,50	1,56	1,75B
		Média	2,23a	1,84a	1,84a	

Açúcares redutores totais (ART), aminoácidos totais, amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) e teor total de clorofila (Chl). Os dados são médias ( $n = 4$ ). Médias com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre os tratamentos de luz (*Tukey HSD*;  $P < 0,05$ ;  $n = 8$ ). Médias com letras maiúsculas iguais na coluna mesma coluna não diferem significativamente entre os tratamentos de N (*ANOVA*; teste *F*;  $P < 0,05$ ;  $n = 12$ ).

Nas mudas de *G. kunthiana*, o teor de ART na raiz foi maior no cultivo com  $\text{NO}_3^-$ , em relação ao  $\text{NH}_4^+$ , apenas sob ML e AL (Tabela 11). Além disso, em plantas cultivadas com  $\text{NO}_3^-$ , teve aumento progressivo do conteúdo de ART com o aumento de luminosidade. Na folha, o teor de ART foi maior no cultivo com  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao  $\text{NO}_3^-$  (Tabela 11), e maior sob ML e AL do que sob BL. O teor de aminoácidos nas raízes e folhas foi influenciado pela fonte de N, sendo maior no tratamento com  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao  $\text{NO}_3^-$ . Nas folhas, o teor de aminoácidos foi maior sob ML e AL do que sob BL. O teor de  $\text{NH}_4^+$  nas raízes e folhas foi maior no tratamento com  $\text{NH}_4^+$ , apenas sob ML e AL. O Chl foi influenciado positivamente pelos tratamentos com  $\text{NO}_3^-$  e BL.

Nas mudas de *C. estrellensis*, o teor de ART nas raízes foi maior no cultivo com  $\text{NO}_3^-$ , em relação ao  $\text{NH}_4^+$  (Tabela 12). Nas folhas, o teor de ART foi maior sob ML e AL, em relação à BL. O teor de aminoácidos nas raízes e folhas foi maior no tratamento com  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao  $\text{NO}_3^-$ , e nas folhas, também houve influência da luz, sendo maior sob ML e AL, em relação à BL. O teor de  $\text{NH}_4^+$  nas raízes foi maior no tratamento com  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao  $\text{NO}_3^-$ , independente da intensidade luminosa. Já nas folhas, dentre as mudas tratadas com  $\text{NO}_3^-$ , houve aumento do teor de  $\text{NH}_4^+$  sob ML, em relação à BL, mas não houve influência da fonte de N. O Chl foi influenciado apenas pela luminosidade, sendo maior sob BL, em relação à AL.

**Tabela 11.** Variáveis bioquímicas de raízes e folhas de mudas de *G. kunthiana* cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fonte de nitrogênio.

Órgão	Variável		BL	ML	AL	Média
Raiz	ART ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	$\text{NO}_3^-$	0,642cA	3,24bA	7,05aA	3,64
		$\text{NH}_4^+$	0,674aA	1,22aB	1,96aB	1,29
		Média	0,658	2,48	4,50	
	Aminoácidos totais ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	$\text{NO}_3^-$	21,3	31,3	33,3	28,3B
		$\text{NH}_4^+$	49,3	42,9	53,9	48,4A
		Média	35,3a	37,1a	44,2a	
	$\text{NH}_4^+$ ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	$\text{NO}_3^-$	0,444aA	0,559aB	0,578aB	0,52
		$\text{NH}_4^+$	0,785bA	2,06aA	1,59aA	1,48
		Média	0,614	1,31	1,08	
Folha	ART ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	$\text{NO}_3^-$	2,69	3,56	6,44	4,34B
		$\text{NH}_4^+$	4,41	10,4	9,30	8,05A
		Média	3,64b	7,00ab	7,87a	
	Aminoácidos totais ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	$\text{NO}_3^-$	16,1	18,9	24,1	19,9B
		$\text{NH}_4^+$	28,3	50,5	62,0	46,9A
		Média	22,9a	34,7a	43,0a	
	$\text{NH}_4^+$ ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	$\text{NO}_3^-$	0,175aA	0,313aB	0,281aB	0,256
		$\text{NH}_4^+$	0,175bA	0,885aA	0,788aA	0,684
		Média	0,175	0,599	0,535	
	Chl ( $\text{mg g}^{-1}$ MF)	$\text{NO}_3^-$	3,25	1,78	1,61	2,21A
		$\text{NH}_4^+$	2,72	1,40	1,23	1,78B
		Média	2,98a	1,59b	1,42b	

Açúcares redutores totais (ART), aminoácidos totais, amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) e teor total de clorofila (Chl). Os dados são médias ( $n = 4$ ). Médias com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre os tratamentos de luz (*Tukey HSD*;  $P < 0,05$ ;  $n = 8$ ). Médias com letras maiúsculas iguais na coluna mesma coluna não diferem significativamente entre os tratamentos de N (*ANOVA*; teste *F*;  $P < 0,05$ ;  $n = 12$ ).

### 3.3.2. Nitrogênio total

Nas raízes e folhas de *C. pachystachya*, no cultivo com  $\text{NO}_3^-$ , houve maior acúmulo de N total ( $N_{\text{tot}}$ ) sob ML e AL, em relação à BL (Fig 2A e B). Nas raízes, sob ML e AL, o  $N_{\text{tot}}$  foi maior

no tratamento com  $\text{NO}_3^-$ , em relação ao  $\text{NH}_4^+$  (Fig 2A). Nas folhas, apenas sob ML, o  $\text{N}_{\text{tot}}$  foi maior no cultivo com  $\text{NO}_3^-$ , em relação ao  $\text{NH}_4^+$  (Fig. 2B).

Nas raízes de mudas de *G. kunthiana* cultivadas com  $\text{NO}_3^-$ , o  $\text{N}_{\text{tot}}$  aumentou no tratamento sob ML e AL, em relação à BL. Sob AL, houve maior  $\text{N}_{\text{tot}}$  no cultivo com  $\text{NO}_3^-$ , em relação ao  $\text{NH}_4^+$ . Nas folhas de plantas tratadas com  $\text{NO}_3^-$ , houve maior  $\text{N}_{\text{tot}}$  sob AL, em comparação à BL. Apenas sob BL, houve maior  $\text{N}_{\text{tot}}$  nas folhas de mudas cultivadas com  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao  $\text{NO}_3^-$  (Fig. 2).

**Tabela 12.** Variáveis bioquímicas de raízes e folhas de mudas de *C. estrellensis* cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fonte de nitrogênio.

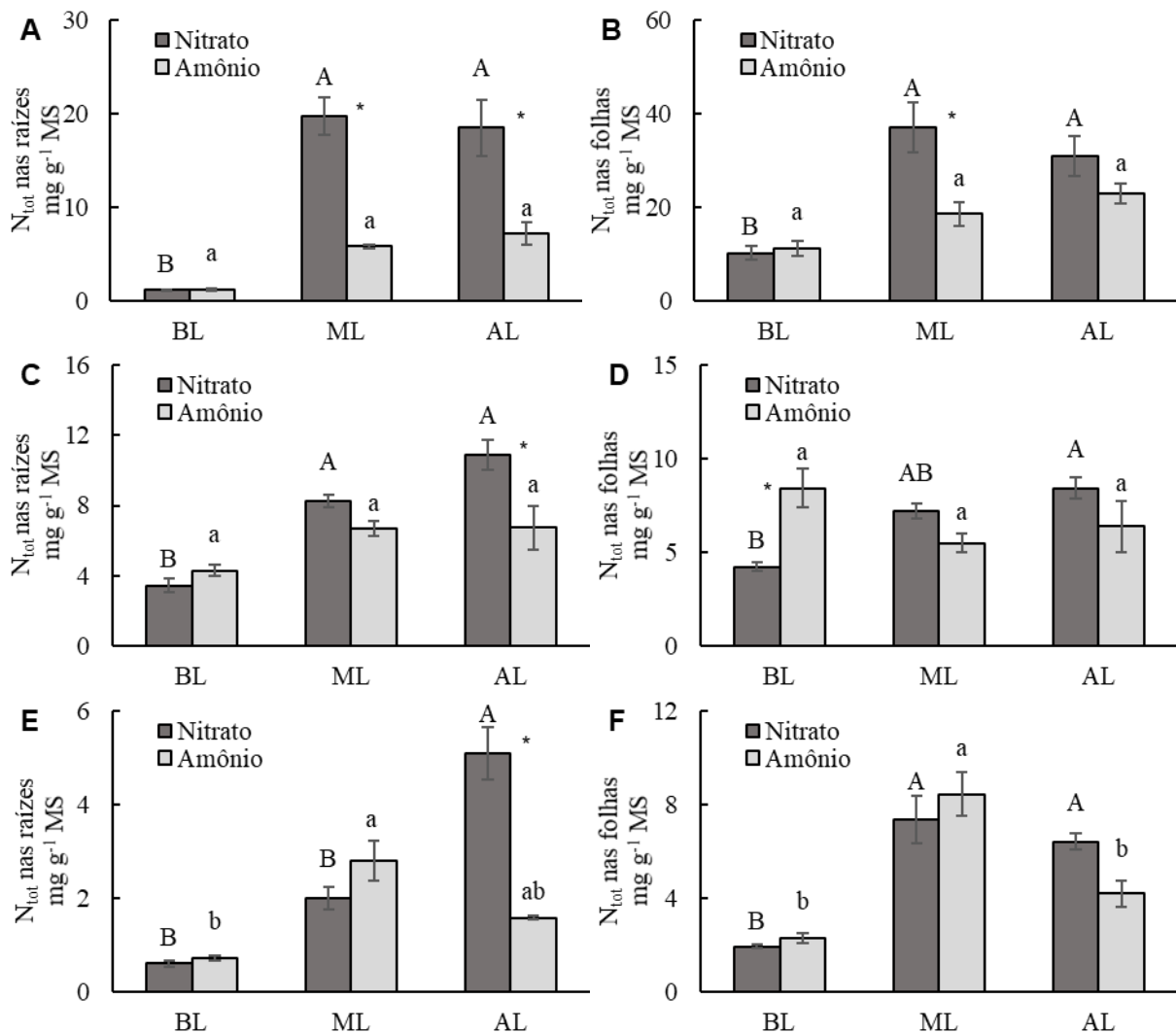
Órgão	Variável		BL	ML	AL	Média
Raiz	ART ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	$\text{NO}_3^-$	0,487	1,16	1,27	1,01A
		$\text{NH}_4^+$	0,448	0,44	0,321	0,412B
		Média	0,465a	0,805a	0,851a	
	Aminoácidos totais ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	$\text{NO}_3^-$	7,37	13,8	15,4	12,2B
		$\text{NH}_4^+$	57,1	44,2	60,2	54,5A
		Média	32,2a	27,3a	37,8a	
	$\text{NH}_4^+$ ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	$\text{NO}_3^-$	0,229	0,171	0,367	0,248B
		$\text{NH}_4^+$	1,25	1,35	1,24	1,28A
		Média	0,744a	0,765a	0,854a	
Folha	ART ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	$\text{NO}_3^-$	5,50	18,0	11,7	11,7A
		$\text{NH}_4^+$	5,89	16,1	16,7	12,9A
		Média	5,70b	17,1a	14,2a	
	Aminoácidos totais ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	$\text{NO}_3^-$	16,1	18,9	24,1	19,9B
		$\text{NH}_4^+$	28,3	50,5	62,0	46,9A
		Média	22,9b	34,7a	43,1a	
	$\text{NH}_4^+$ ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	$\text{NO}_3^-$	0,271b	0,723a	0,496ab	0,497
		$\text{NH}_4^+$	0,376a	0,542a	0,663a	0,550
		Média	0,311	0,632	0,579	
	Chl ( $\text{mg g}^{-1}$ MF)	$\text{NO}_3^-$	3,78	2,91	2,30	2,94A
		$\text{NH}_4^+$	2,63	2,66	2,23	2,50A
		Média	3,21a	2,79ab	2,27b	

Açúcares redutores totais (ART), aminoácidos totais, amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) e teor total de clorofila (Chl). Os dados são médias ( $n = 4$ ). Médias com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre os tratamentos de luz (*Tukey HSD*;  $P < 0,05$ ;  $n = 8$ ). Médias com letras maiúsculas iguais na coluna mesma coluna não diferem significativamente entre os tratamentos de N (*ANOVA*; teste *F*;  $P < 0,05$ ;  $n = 12$ ).

Em plantas de *C. estrellensis* tratadas com  $\text{NO}_3^-$ , nas raízes, o  $\text{N}_{\text{tot}}$  foi maior sob AL, em relação à ML e BL. Apenas sob AL, houve maior  $\text{N}_{\text{tot}}$  nas raízes de plantas cultivadas com  $\text{NO}_3^-$ , em relação ao  $\text{NH}_4^+$ . Nas folhas, quando cultivadas com  $\text{NO}_3^-$ , houve maior  $\text{N}_{\text{tot}}$  sob ML e AL, em relação à BL. Quando cultivadas com  $\text{NH}_4^+$ , o  $\text{N}_{\text{tot}}$  das folhas foi maior sob ML, em relação à AL e BL (Fig. 2).

### 3.3.3. Nutrientes

Nas raízes de *C. pachystachya*, o tratamento com  $\text{NH}_4^+$  levou à diminuição dos teores dos cátions Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn e Zn, em comparação com o tratamento com  $\text{NO}_3^-$  (Tabela 13). A luminosidade influenciou o teor de K nas raízes, que foi maior sob ML do que sob BL e AL. No cultivo com  $\text{NO}_3^-$ , os teores de Fe e Zn diminuíram sob ML e AL, em relação à BL, enquanto o teor de Mg aumentou sob ML e AL, em relação à BL. No cultivo com  $\text{NH}_4^+$ , o teor de Zn diminuiu sob AL, em relação à BL e ML. Nas folhas, houve diminuição do teor de Cu sob AL, em relação à BL, e diminuição do teor de Mn em plantas cultivadas com  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao  $\text{NO}_3^-$ .



**Figura 2** Teor de nitrogênio total ( $N_{\text{tot}}$ ) em raízes e folhas de mudas de *Cecropia pachystachya* (A-B), *Guarea kunthiana* (C-D) e *Cariniana estrellensis* (E-F) cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fonte de nitrogênio. Os dados são médias  $\pm$  erros-padrão. Nas colunas cinzas claras e escuras, médias com letras maiúsculas (comparam tratamentos com  $\text{NO}_3^-$ ) ou minúsculas (comparam tratamentos com  $\text{NH}_4^+$ ) iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de luz, e asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos com diferentes fontes N para cada tratamento de luz (Tukey HSD;  $P < 0,05$ ;  $n = 5$ ).

Em raízes de *G. kunthiana*, houve aumento do teor de Cu e diminuição do teor de K no cultivo com  $\text{NH}_4^+$ , comparado ao  $\text{NO}_3^-$  (Tabela 14). As concentrações de Mn e Mg nas raízes foram influenciadas pela luz apenas em plantas cultivadas com  $\text{NO}_3^-$ , sendo maiores sob AL e ML do que sob BL. O teor de Ca, em raízes de plantas cultivadas com  $\text{NH}_4^+$ , foi maior sob BL do que sob ML e AL. Nos três tratamentos de luz, os teores de Mn, Mg e Ca nas raízes foram maiores em plantas tratadas com  $\text{NO}_3^-$ , em relação ao  $\text{NH}_4^+$ . Nas folhas, o teor de Mn diminuiu, enquanto o teor de Cu aumentou no cultivo com  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao  $\text{NO}_3^-$ . O teor foliar de Cu diminuiu nas maiores luminosidades, em relação à BL. A concentração foliar de ferro aumentou no cultivo com  $\text{NH}_4^+$ , apenas sob BL, enquanto o teor foliar de K diminuiu no cultivo com  $\text{NH}_4^+$ , apenas sob ML e AL.

Nas raízes de *C. estrellensis*, apenas os teores de Ca, Mn e Mg diminuíram no tratamento com  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao  $\text{NO}_3^-$  (Tabela 15). O teor de Ca nas raízes diminuiu sob ML e AL, em relação à BL. Nas folhas, houve diminuição do teor de Ca e aumento do teor de Zn no cultivo com  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao  $\text{NO}_3^-$ .

#### 3.3.4. Estresse oxidativo

Nas raízes de *C. pachystachya*, não houve diferença entre os tratamentos no teor de dienos conjugados (Fig. 3A). Nas folhas, os teores de dienos conjugados e  $\text{H}_2\text{O}_2$  foram influenciados pela luminosidade, sendo maiores sob AL, intermediários sob ML e menores sob BL (Fig. 3C). O teor de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas raízes também teve influência apenas da luminosidade, sendo maior sob AL e ML, em relação à BL (Fig. 3B).

Nas mudas de *G. kunthiana*, a concentração de dienos conjugados na raiz foi influenciada apenas pela fonte de N, sendo maior no  $\text{NO}_3^-$ , em relação ao  $\text{NH}_4^+$  (Fig. 4A). Por outro lado, nas folhas, o teor de dienos conjugados foi maior no cultivo com  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao  $\text{NO}_3^-$ . Além disso, esse marcador de estresse oxidativo nas folhas foi maior sob ML, em relação à BL e AL (Fig. 4C). A concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas raízes teve influência apenas da fonte de N, sendo maior no cultivo com  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao  $\text{NO}_3^-$  (Fig. 4B). Nas folhas, a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi influenciada apenas pela luminosidade, sendo maior sob AL, em relação à BL (Fig. 4D).

Nas mudas de *C. estrellensis*, a concentração de dienos conjugados nas raízes foi maior no cultivo com  $\text{NO}_3^-$ , em relação ao  $\text{NH}_4^+$ , e também maior sob ML, em relação à AL (Fig. 5A). Nas folhas, essa variável sofreu redução no cultivo com  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao  $\text{NO}_3^-$ , apenas sob ML e AL (Fig. 5C). As mudas cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  apresentaram maior teor foliar de dienos conjugados sob ML, intermediário sob AL e menor sob BL e, entre as plantas cultivadas com  $\text{NH}_4^+$ , houve aumento sob ML. A concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas raízes foi influenciada somente pela fonte de N, sendo maior no cultivo com  $\text{NO}_3^-$ , em relação ao  $\text{NH}_4^+$  (Fig. 5B). Nas folhas, essa variável sofreu aumento no

cultivo com  $\text{NH}_4^+$ , em relação ao  $\text{NO}_3^-$ , apenas sob AL (Fig. 5D). Dentre as mudas cultivadas com  $\text{NO}_3^-$ , houve diminuição da concentração foliar de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sob BL, em relação à ML e AL. Nas folhas de plantas cultivadas com  $\text{NH}_4^+$ , o teor de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi maior sob AL, intermediário sob ML e menor sob BL (Fig. 5D).

**Tabela 13.** Teor de nutrientes em raízes e folhas de mudas de *C. pachystachya* cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fonte de nitrogênio.

Órgão	Nutrientes	Fonte de N	BL	ML	AL	Média
Raiz	Ca (mg g <sup>-1</sup> )	$\text{NO}_3^-$	3,92	4,65	5,14	4,57A
		$\text{NH}_4^+$	2,71	3,16	3,48	3,12B
		Média	3,32a	3,90a	4,31a	
	Cu (mg g <sup>-1</sup> )	$\text{NO}_3^-$	17,9	14,6	14,67	15,7A
		$\text{NH}_4^+$	9,73	9,55	7,69	8,99 B
		Média	13,8	12,1	11,1	
	Fe (mg g <sup>-1</sup> )	$\text{NO}_3^-$	22417aA	4162bA	4164bA	10248
		$\text{NH}_4^+$	5654aB	3418aA	1693bB	3588
		Média	14036	3790	2928	
	K (mg g <sup>-1</sup> )	$\text{NO}_3^-$	36,3	52,9	48,2	45,8A
		$\text{NH}_4^+$	29,2	41,5	28,8	33,1B
		Média	32,8b	47,2a	38,5b	
	Mn (mg g <sup>-1</sup> )	$\text{NO}_3^-$	376	1208	940	841A
		$\text{NH}_4^+$	53,2	31,4	32,8	39,2B
		Média	214a	620a	486a	
	Mg (mg g <sup>-1</sup> )	$\text{NO}_3^-$	2,71bA	7,13aA	5,33aA	5,06
		$\text{NH}_4^+$	1,57aB	1,89aB	1,84aB	1,77
		Média	2,14	4,51	3,58	
	Zn (mg g <sup>-1</sup> )	$\text{NO}_3^-$	145aA	108bA	91,9bA	115
		$\text{NH}_4^+$	41,2aB	36,7aB	22,7bB	33,5
		Média	93,3	72,6	57,3	
Folha	Ca (mg g <sup>-1</sup> )	$\text{NO}_3^-$	15,2	15,7	12,2	14,3A
		$\text{NH}_4^+$	13,6	8,84	8,61	10,3A
		Média	14,4a	12,3a	10,4a	
	Cu (mg g <sup>-1</sup> )	$\text{NO}_3^-$	7,52	5,97	4,46	5,98A
		$\text{NH}_4^+$	7,32	4,78	4,59	5,56A
		Média	7,42a	5,38ab	4,52b	
	Fe (mg g <sup>-1</sup> )	$\text{NO}_3^-$	219	272	225	239A
		$\text{NH}_4^+$	280	271	227	259A
		Média	249a	271a	226a	
	K (mg g <sup>-1</sup> )	$\text{NO}_3^-$	35,0	27,0	28,5	30,2A
		$\text{NH}_4^+$	31,0	38,6	39,2	36,3A
		Média	33,0a	32,84a	33,9a	
	Mn (mg g <sup>-1</sup> )	$\text{NO}_3^-$	105	101	92,7	99,9A
		$\text{NH}_4^+$	83,0	58,8	49,8	63,9B
		Média	94,3a	80,1a	71,3a	
	Mg	$\text{NO}_3^-$	6,00	4,54	4,53	5,02A

	(mg g <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	4,75	3,94	4,25	4,32A
		Média	5,37a	4,24a	4,39a	
Zn (mg g <sup>-1</sup> )		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	19,7	18,2	13,6	17,2A
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	15,3	13,0	11,7	13,3A
		Média	17,5a	15,6a	12,7a	

Cálcio (Ca), Cobre (Cu), Ferro (Fe), Potássio (K), Manganês (Mn), Magnésio (Mg) e Zinco (Zn). Os dados são médias ( $n = 4$ ). Médias com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre os tratamentos de luz (*Tukey HSD*;  $P < 0,05$ ;  $n = 8$ ). Médias com letras maiúsculas iguais na coluna mesma coluna não diferem significativamente entre os tratamentos de N (*ANOVA*; teste *F*;  $P < 0,05$ ;  $n = 12$ ).

**Tabela 14.** Teor de nutrientes em raízes e folhas de mudas de *G. kunthiana* cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ou amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) como fonte de nitrogênio.

Órgão	Nutrientes	Fonte de N	BL	ML	AL	Média
Raiz	Ca (mg g <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	7,51aA	8,30aA	7,47aA	7,76
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	4,80aB	2,93bB	3,63bB	3,79
		Média	6,15	5,61	5,55	
	Cu (mg g <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	9,76	8,77	8,47	9,00B
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	28,0	18,7	22,9	23,2A
		Média	18,9a	13,7a	15,7a	
	Fe (mg g <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	728	751	723	734A
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	734	501	638	625A
		Média	731a	626a	681a	
	K (mg g <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	24,4	37,6	41,6	34,6A
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	17,7	17,4	24,5	19,9B
		Média	21,1b	27,5ab	33,1a	
	Mn (mg g <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1050cA	1503bA	2193aA	1582
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	148aB	157aB	147aB	151
		Média	599	830	1170	
	Mg (mg g <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	2,40bA	3,00abA	3,04aA	2,81
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1,31aB	1,08aB	1,11aB	1,17
		Média	1,86	2,04	2,07	
	Zn (mg g <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	42,2	33,1	29,6	35,0A
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	40,2	27,3	35,7	34,4A
		Média	41,2a	30,2a	32,7a	
Folha	Ca (mg g <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	10,48	9,432	12,97	10,96A
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	12,60	7,654	8,382	9,545A
		Média	11,54a	8,543a	10,68a	
	Cu (mg g <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	4,858	1,768	3,640	3,422B
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	7,660	4,378	3,554	5,197A
		Média	6,259a	3,073b	3,597b	
	Fe (mg g <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	123,3aB	155,3aA	195,7aA	158,1
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	218,2aA	182,2aA	167,8aA	189,4
		Média	170,8	168,8	181,8	
	K (mg g <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	31,93abA	40,66aA	27,36bA	33,32
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	30,68aA	27,29aB	30,75aA	29,57
		Média	31,31	33,98	29,06	
	Mn (mg g <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	84,9aA	82,7aA	61,7aA	76,4
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	58,1aB	43,4aB	53,3aA	51,6
		Média	71,5	63,0	57,5	

	Mg (mg g <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	2,88	3,40	3,77	3,35A
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	2,94	2,28	2,81	2,68A
		Média	2,91a	2,84a	3,29a	
	Zn (mg g <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	19,81	12,78	15,57	16,0A
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	21,71	16,61	17,51	18,6A
		Média	20,76a	14,69a	16,54a	

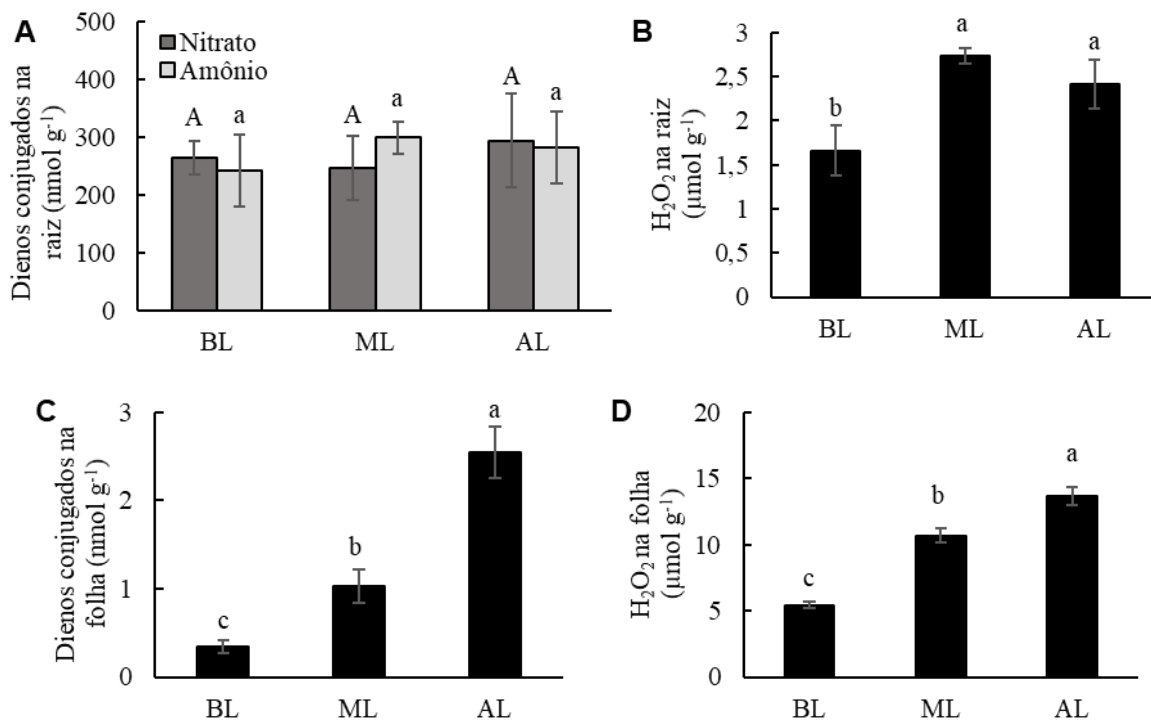
Cálcio (Ca), Cobre (Cu), Ferro (Fe), Potássio (K), Manganês (Mn), Magnésio (Mg) e Zinco (Zn). Os dados são médias ( $n = 4$ ). Médias com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre os tratamentos de luz (*Tukey HSD*;  $P < 0,05$ ;  $n = 8$ ). Médias com letras maiúsculas iguais na coluna mesma coluna não diferem significativamente entre os tratamentos de N (*ANOVA*; teste *F*;  $P < 0,05$ ;  $n = 12$ ).

**Tabela 15.** Teor de nutrientes em raízes e folhas de mudas de *C. estrellensis* cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ou amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) como fonte de nitrogênio.

Órgão	Nutrientes	Fonte de N	BL	ML	AL	Média
Raiz	Ca (mg g <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	6,09	3,85	3,30	4,41A
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	3,83	1,97	2,36	2,72B
		Média	4,96a	2,91b	2,83b	
	Cu (mg g <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	11,7	8,76	10,9	10,4A
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	14,6	17,2	12,7	14,8A
		Média	13,2a	12,9a	11,8a	
	Fe (mg g <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	2132	1459	1995	1862A
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1723	2346	1676	1915A
		Média	1928a	1903a	1835a	
	K (mg g <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	39,8	32,2	35,8	35,9A
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	35,1	39,4	35,5	36,7A
		Média	37,4a	35,8a	35,6a	
	Mn (mg g <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	74,3	82,7	99,2	85,4A
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	30,6	25,1	25,0	26,9B
		Média	52,5a	53,9a	62,1a	
	Mg (mg g <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	4,48	4,76	6,38	5,21A
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	4,35	3,85	3,76	3,99B
		Média	4,42a	4,31a	5,07a	
	Zn (mg g <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	27,7	30,7	52,0	36,8A
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	24,7	34,0	26,9	28,5A
		Média	26,2a	32,3a	39,4a	
Folha	Ca (mg g <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	8,22	14,8	15,1	12,7A
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	8,88	9,03	8,82	8,91B
		Média	8,55a	11,9a	11,9a	
	Cu (mg g <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	5,46	5,91	5,89	5,757A
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	9,99	5,82	5,51	7,112A
		Média	7,72a	5,86a	5,70a	
	Fe (mg g <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	153	185	272	203B
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	250	263	303	272A
		Média	201a	224a	287a	
	K (mg g <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	21,2	27,3	28,0	25,5A
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	21,7	22,8	22,5	22,3A
		Média	21,4a	25,0a	25,2a	
	Mn (mg g <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	81,4	177	171	143A
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	167	194	147	169A
		Média	124a	185a	159a	

Mg (mg g <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	2,37	2,89	2,56	2,61A
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	3,65	2,73	2,31	2,90A
	Média	3,01a	2,81a	2,44a	
Zn (mg g <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	13,6	11,3	10,3	11,7B
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	21,0	15,4	14,0	16,8A
	Média	17,3a	13,4a	12,1a	

Cálcio (Ca), Cobre (Cu), Ferro (Fe), Potássio (K), Manganês (Mn), Magnésio (Mg) e Zinco (Zn). Os dados são médias ( $n = 4$ ). Médias com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre os tratamentos de luz (*Tukey HSD*;  $P < 0,05$ ;  $n = 8$ ). Médias com letras maiúsculas iguais na coluna mesma coluna não diferem significativamente entre os tratamentos de N (*ANOVA*; teste *F*;  $P < 0,05$ ;  $n = 12$ ).

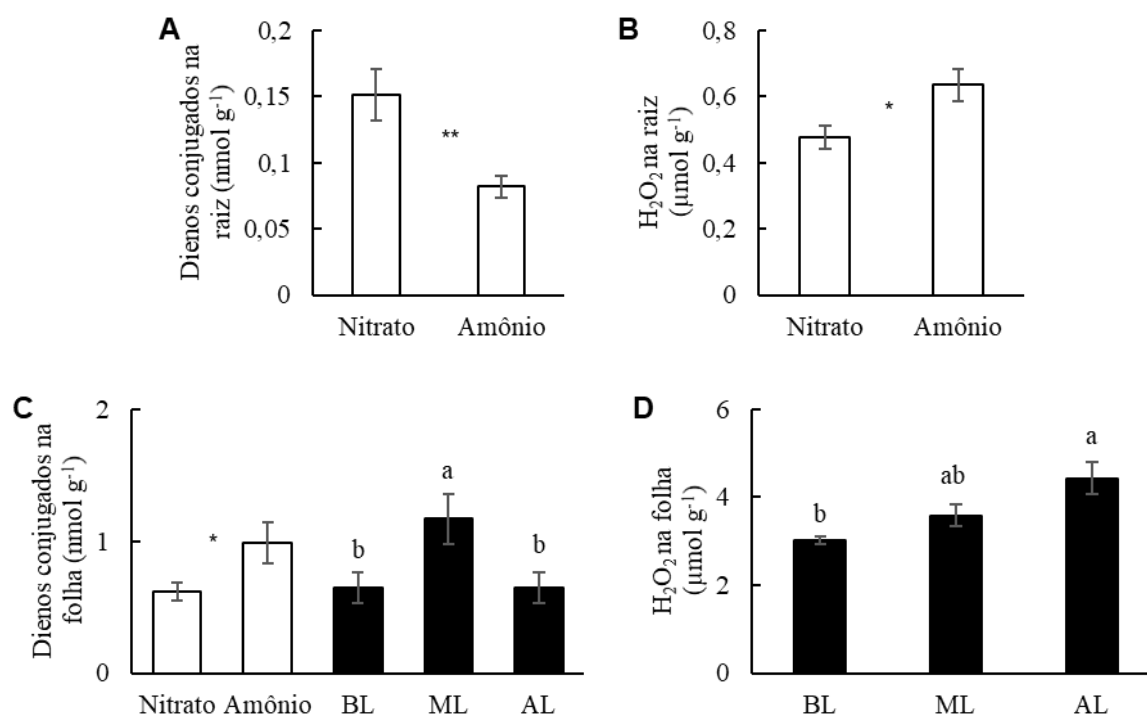


**Figura 3** Concentrações de dienos conjugados e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) nas raízes (A-B) e folhas (C-D) de mudas de *Cecropia pachystachya* cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ou amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) como fonte de nitrogênio. Os dados são médias ± erros-padrão. Nas colunas pretas, médias com letras iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de luz (*Tukey HSD*;  $P < 0,05$ ;  $n = 15$ ). Nas colunas cinza claras e escuras, médias com letras maiúsculas (comparam tratamentos com NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ou minúsculas (comparam tratamentos com NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) (*Tukey HSD*;  $P < 0,05$ ;  $n = 5$ ).

### 3.4. Análise de componentes principais das variáveis de crescimento, fotossintéticas e bioquímicas

Nas mudas de *C. pachystachya*, a PCA explicou 83% da variação nos componentes 1 (47%) e 2 (36%) (Fig. 6A). É possível distinguir três agrupamentos: plantas sob BL, plantas cultivadas com NH<sub>4</sub><sup>+</sup> sob ML e AL e plantas cultivadas com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> sob ML e AL. O componente 1 foi o que mais separou os tratamentos ML e AL do BL, o qual se relacionou positivamente com F<sub>v</sub>/F<sub>0</sub> M, F<sub>v</sub>/F<sub>0</sub> MD e Fe na raiz e Cu nas folhas. No caso de ML e AL,

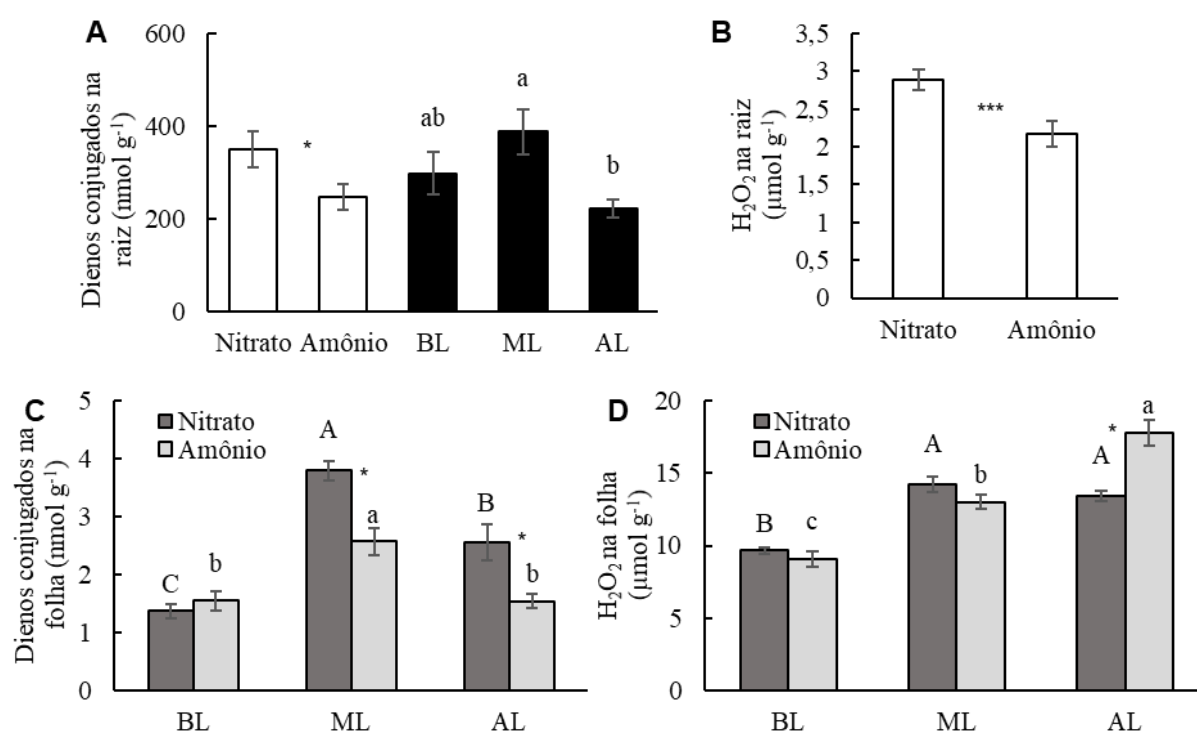
houve uma correlação positiva com variáveis de crescimento (MST e R/PA), boa parte das fotossintéticas ( $A_{\max}$  M,  $g_s$  M,  $A_{\max}$  MD,  $g_s$  MD,  $A_{\max,CO_2}$ ,  $\varepsilon$ ,  $V_{cmax}$ ,  $J$ ,  $TPU$ ,  $\alpha$ ,  $PSL_{ETR}$  e  $ETR_{\max}$ ), de estresse oxidativo ( $H_2O_2$  nas raízes e folhas e dienos nas folhas), além do  $N_{tot}$  nas raízes e folhas. Sob ML e AL, os tratamentos de N foram separados principalmente pelo componente 2, sendo as mudas tratadas com  $NH_4^+$  associadas principalmente com as variáveis da curva de  $CO_2$  (exceto  $g_m$ ), teores de ART e  $NH_4^+$ , e marcadores de estresse oxidativo. Já as mudas tratadas com  $NO_3^-$  se relacionaram positivamente com as variáveis de crescimento, fotossintéticas ( $A_{\max}$  M,  $A_{\max}$  MD,  $g_s$  M,  $g_s$  MD,  $C_i$  MD,  $g_m$ ,  $ETR_{\max}$ , NPQ),  $N_{tot}$  e teores de Mn, Cu, Mg, K e Ca nas raízes.



**Figura 4** Concentrações de dienos conjugados e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) nas raízes (A-B) e folhas (C-D) de mudas *Guarea kunthiana* cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato ( $NO_3^-$ ) ou amônio ( $NH_4^+$ ) como fonte de nitrogênio. Os dados são médias  $\pm$  erros-padrão. Nas colunas brancas, asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos com diferentes fontes de N, de acordo com a ANOVA (teste F; \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ;  $n = 15$ ). Nas colunas pretas, médias com letras iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de luz (Tukey HSD;  $P < 0,05$ ;  $n = 10$ ). Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos de N dentro de cada tratamento de luz (Tukey HSD;  $P < 0,05$ ;  $n = 5$ ).

Em *G. kunthiana*, a PCA explicou 68% da variação nos dois primeiros componentes (componente 1 = 38%; componente 2 = 30%) (Fig. 6B). Independentemente da fonte de N, o componente 2 separou os tratamentos ML e AL de BL, que se correlacionou positivamente

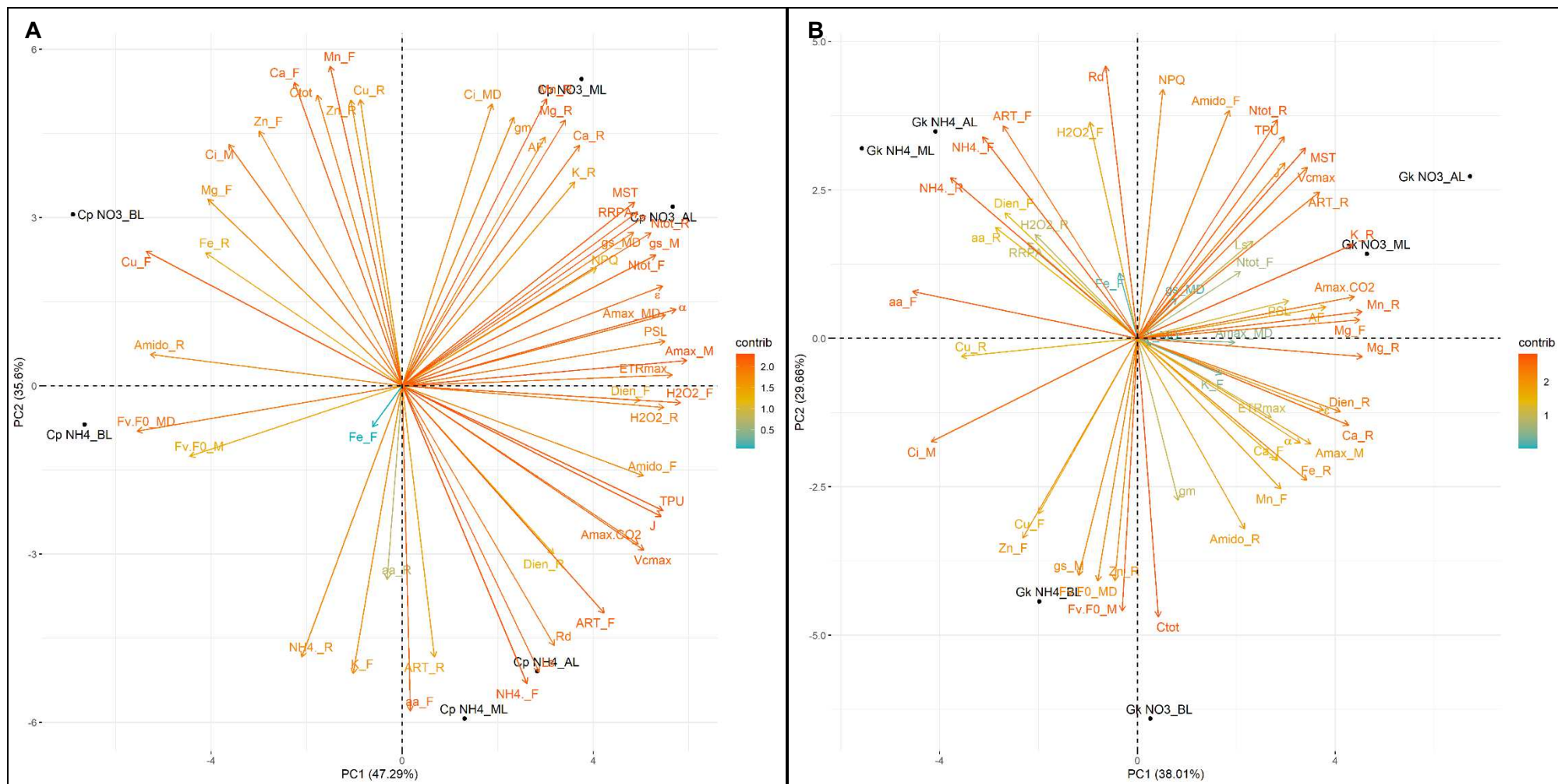
com  $g_s$ ,  $M$ ,  $F_v/F_0$ ,  $M$ ,  $F_v/F_0$  MD,  $Chl$ ,  $g_m$  e concentração de Zn na raiz e negativamente com  $MST$ ,  $V_{cmax}$ ,  $J$ ,  $TPU$ ,  $R_d$ ,  $NPQ$  e concentrações de  $H_2O_2$ , ART e  $NH_4^+$  nas folhas e  $N_{tot}$  nas raízes. Sob ML e AL, houve uma clara separação entre os tratamentos de N pelo componente 1, sendo os tratamentos de  $NH_4^+$  correlacionados com as concentrações de  $NH_4^+$  e aminoácidos nas raízes e folhas e de ART e  $H_2O_2$  nas folhas, enquanto os tratamentos de  $NO_3^-$  se correlacionaram principalmente ao crescimento (AF e MST), a variáveis fotossintéticas ( $A_{max}$ ,  $M$ ,  $A_{max,CO_2}$ ,  $\epsilon$ ,  $V_{cmax}$ ,  $J$ ,  $TPU$ ,  $\alpha$ ,  $PSL_{ETR}$  e  $ETR_{max}$ ) e nutrientes nas raízes (N, Mn, Fe, Mg, K, Ca) e folhas (Mg).

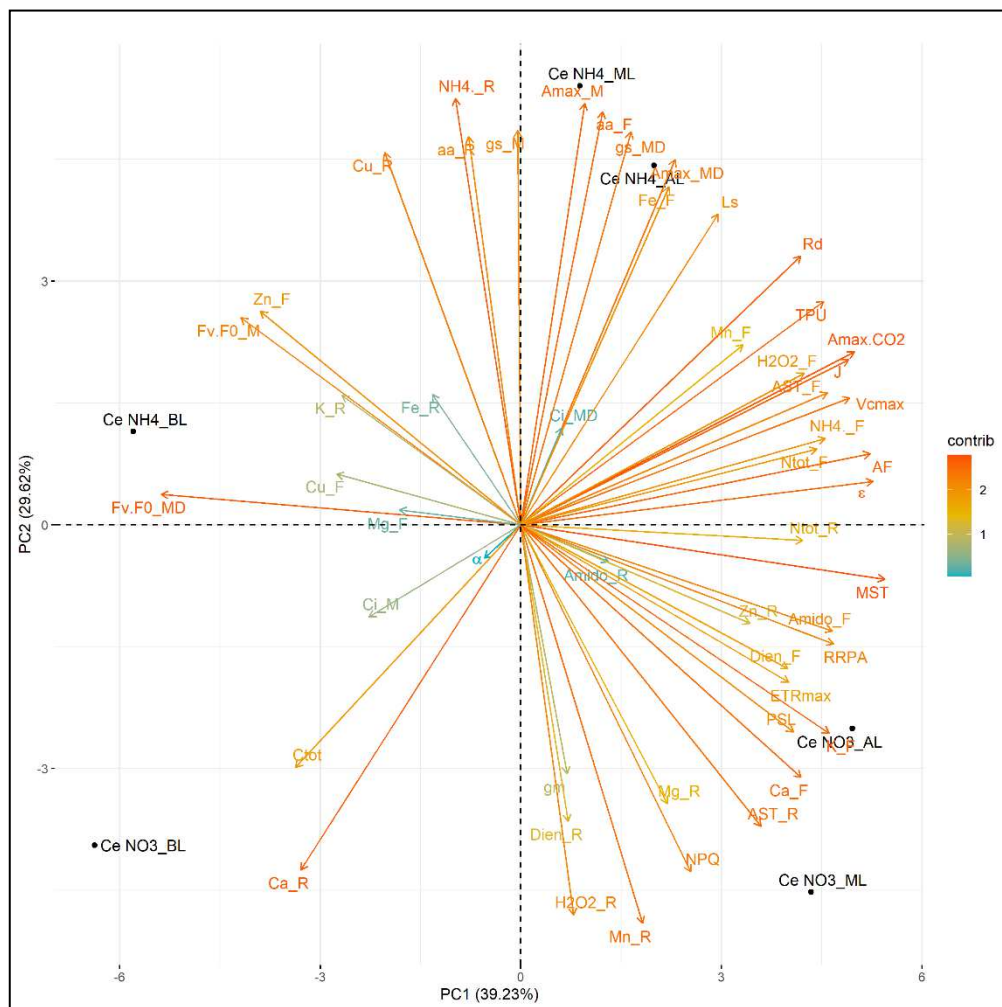


**Figura 5** Concentrações de dienos conjugados e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) nas raízes (A-B) e folhas (C-D) de mudas de *Cariniana estrellensis* (E-F) cultivadas sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade (AL) com nitrato ( $NO_3^-$ ) ou amônio ( $NH_4^+$ ) como fonte de nitrogênio. Os dados são médias  $\pm$  erros-padrão. Nas colunas brancas, asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos com diferentes fontes de N, de acordo com a ANOVA (teste F; \* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ;  $n = 15$ ). Nas colunas pretas, médias com letras iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de luz (Tukey HSD;  $P < 0,05$ ;  $n = 10$ ). Nas colunas cinzentas, médias com letras maiúsculas ( $NO_3^-$ ) ou minúsculas ( $NH_4^+$ ) iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de luz, e asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos de N dentro de cada tratamento de luz (Tukey HSD;  $P < 0,05$ ;  $n = 5$ ).

Em *C. estrellensis*, a PCA explicou 69% da variação nos dois primeiros componentes (componente 1 = 39%; componente 2 = 30%) (Fig. 6C). O componente 1 foi o principal na separação dos tratamentos de BL dos tratamentos de ML e AL. Porém, diferentemente das

outras espécies, os tratamentos de N ficaram mais separados sob BL (pelo componente 2), sendo as plantas tratadas com  $\text{NH}_4^+$  correlacionadas com  $F_v/F_0$  M,  $F_v/F_0$  MD e aos teores de K nas raízes e Cu, Zn e Mg nas folhas, enquanto as plantas cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  se relacionaram principalmente ao Chl e teor de Ca nas raízes. Sob ML e AL, os dois componentes separaram os tratamentos de N. O cultivo com  $\text{NH}_4^+$  nessas luminosidades foi correlacionado principalmente com  $A_{\text{max}}$  M,  $A_{\text{max}}$  MD,  $g_s$  MD, e teores de aminoácidos e Fe nas folhas, enquanto o cultivo com  $\text{NO}_3^-$  foi correlacionado principalmente com R/PA,  $\text{PSL}_{\text{ETR}}$ ,  $\text{ETR}_{\text{max}}$ , NPQ, e teores de ART, Zn e Mg nas raízes e de dienos, K e Ca nas folhas.





C

**Figura 6** Análise de componentes principais (PCA), com todas as variáveis utilizadas no estudo, de mudas de *Cecropia pachystachya* (Cp; A), *Guarea kunthiana* (Gk; B) e *Cariniana estrellensis* (Ce; C) cultivadas com  $NO_3^-$  ou  $NH_4^+$ , sob baixa (BL), média (ML) ou alta luminosidade.

## Discussão

Os efeitos das diferentes fontes de N no crescimento das plantas variam de acordo com a espécie em questão e com fatores ambientais, como intensidade luminosa, temperatura, concentração de N e pH do meio (Sétien et al., 2013; Piñero et al., 2018; Debiasi et al., 2021). Quanto à intensidade luminosa, nas espécies avaliadas no presente estudo, os resultados sugerem que, quando o crescimento é limitado pela luz (BL), as fontes de N ( $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ ) não interferem tanto nas variáveis fotossintéticas quanto nas bioquímicas. Porém, com o aumento de luminosidade, comparado ao  $\text{NO}_3^-$ , o  $\text{NH}_4^+$  passa a inibir (ou inibir mais fortemente) o crescimento, seja pela diminuição da fotossíntese (*C. pachystachya* e *G. kunthiana*) ou por outros mecanismos, como uma possível imposição de um gasto energético maior com mecanismos de tolerância ao  $\text{NH}_4^+$  (*C. estrellensis*).

Sob sombreamento intenso (BL), os efeitos da fonte de N são pouco perceptíveis, já que todas as espécies apresentaram crescimento similar (MST e AF) com  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ , sendo o crescimento limitado principalmente pela intensidade luminosa. As variáveis fotossintéticas e bioquímicas foram mais influenciadas pela fonte de N e/ou pela intensidade luminosa do que pela interação entre os dois fatores. As variáveis que tiveram efeitos da interação fonte de N  $\times$  intensidade luminosa, em geral, não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos de N sob BL, indicando que as respostas contrastantes foram verificadas em tratamentos de maior luminosidade. Isso é perceptível na PCA, em que os tratamentos de N ficam próximos sob BL, e tendem a se separar sob ML e AL nas três espécies.

Sob BL, mudas de *G. kunthiana* apresentaram maior taxa fotossintética ao meio dia ( $A_{\text{max}}$  MD) quando cultivadas com  $\text{NH}_4^+$ , sem resultar em ganho de massa seca, mas induzindo o aumento de  $N_{\text{tot}}$  nas folhas. Isso demonstra efeitos positivos do  $\text{NH}_4^+$  para essa espécie sob BL, luminosidade comum ao sub-bosque onde essa espécie é encontrada. Outro resultado relevante é o fato de as mudas de *G. kunthiana* não acumularem  $\text{NH}_4^+$  nas raízes e folhas sob BL, o que foi observado nas raízes e folhas de *C. pachystachya* e nas raízes de *C. estrellensis*, independentemente da luminosidade. Isso pode ser importante à tolerância ao  $\text{NH}_4^+$  de *G. kunthiana* sob sombreamento, evitando níveis tóxicos desse cátion em seus tecidos, como observado em *Arabidopsis thaliana* (Hachiya et al., 2021).

Sob luminosidade mais intensa (ML e AL), houve restrição do crescimento das mudas das três espécies no cultivo com  $\text{NH}_4^+$ , em comparação com o  $\text{NO}_3^-$ . Enquanto o aumento de luminosidade estimulou o crescimento das mudas cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  nas três espécies, em *C. pachystachya* e *G. kunthiana*, as mudas tratadas com  $\text{NH}_4^+$  e cultivadas sob ML e AL não

superaram o crescimento sob BL, mostrando efeito negativo dessa fonte de N sob maiores luminosidades. A análise feita ao meio dia apontou diminuição da assimilação de CO<sub>2</sub> ( $A_{\max}$  MD) no cultivo com NH<sub>4</sub><sup>+</sup> sob ML (em *C. pachystachya* e *G. kunthiana*) e AL (em *C. pachystachya*), o que não ocorreu no período da manhã ( $A_{\max}$  M), indicando que os efeitos negativos do cultivo com NH<sub>4</sub><sup>+</sup> devem ter sido mais severos em horários de luminosidade mais intensa. Já as mudas de *C. estrellensis* cultivadas com NH<sub>4</sub><sup>+</sup> cresceram mais sob ML e AL do que sob BL, mas não atingiram o crescimento das mudas tratadas com NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, mesmo que sua assimilação de CO<sub>2</sub> ( $A_{\max}$  M e  $A_{\max}$  MD) tenha sido maior no tratamento com NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, independentemente da luminosidade.

Mudas de *C. pachystachya*, sob ML e AL, além de apresentarem forte redução do crescimento com NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, acumularam menos N<sub>tot</sub> nas raízes (e folhas, apenas sob ML) e investiram menos no crescimento de raiz em relação à parte aérea, em comparação com plantas cultivadas com o NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Sob ML e AL, as análises fotossintéticas mostraram que o cultivo com NH<sub>4</sub><sup>+</sup> levou à diminuição da  $g_s$  MD,  $g_m$  e  $\epsilon$ , mas não da  $A_{\max,CO_2}$  (assimilação sob saturação de CO<sub>2</sub>), indicando que a fotossíntese foi limitada pelo CO<sub>2</sub> nessa espécie. Geralmente, a queda  $g_m$  é associada à alta espessura das paredes celulares e à diminuição da área de superfície de cloroplastos exposta aos espaços intercelulares, o que diminui a difusão de CO<sub>2</sub> aos cloroplastos (Gao et al., 2020). A limitação estomática ( $L_s$ ) também foi maior nas mudas tratadas com NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, independentemente da luminosidade. Torralbo et al. (2019) demonstraram que a redução da condutância estomática pode ser um mecanismo que diminui a translocação ascendente de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pelo fluxo transpiratório, evitando seu acúmulo nas folhas. A limitação estomática, somada à redução da clorofila total, pode ter levado à queda da assimilação de CO<sub>2</sub> ao meio dia e contribuído para o menor crescimento das plantas com NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Apesar do menor desvio de energia para a fotossíntese, as variáveis de estresse oxidativo (dienes conjugados e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e a  $F_v/F_0$  não foram influenciadas pela fonte de N nessa espécie, o que indica que a redução do crescimento não foi associada à fotoinibição e a danos oxidativos.

Os níveis de aminoácidos nas folhas de *C. pachystachya* foi cerca de três vezes maior em plantas tratadas com NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, sob ML e AL, e nas raízes foi maior no cultivo com NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, independentemente da luminosidade, ou seja, uma demanda muito maior de fotoassimilados e energia, em relação ao tratamento com NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. De fato, a tolerância ao NH<sub>4</sub><sup>+</sup> como fonte única de N geralmente envolve sua rápida assimilação em aminoácidos, processo que demanda energia e pode causar redução da biomassa (Liu e von Wíren, 2017; Vega-Mas et al., 2019). Debiasi et al. (2021) observaram que *C. pachystachya* apresenta alta plasticidade no uso de

$\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ , sendo que o aumento de luminosidade estimula a assimilação do N de ambas as fontes, nas raízes e folhas, quando cultivadas com nitrato de amônio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ). Os resultados observados no presente estudo corroboram a alta capacidade de assimilação de N nas raízes e folhas em *C. pachystachya*. Em suma, o menor crescimento das mudas cultivadas com  $\text{NH}_4^+$  sob ML e AL deve ser, parcialmente, da menor assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  por unidade de área foliar (causada por limitações nas condutâncias estomática e do mesófilo) e da alta demanda de C e energia para assimilar o N do  $\text{NH}_4^+$  em aminoácidos.

Em *G. kunthiana*, a diminuição do crescimento no cultivo com  $\text{NH}_4^+$  sob ML e AL também pode estar, em parte, associada à inibição da fotossíntese, o que corrobora com os estudos de Britto e Kronzucker (2002) e Esteban et al. (2016). A  $A_{\text{max}}$  M foi menor em mudas cultivadas com esse cátion, especialmente nas maiores luminosidades. O cultivo com  $\text{NH}_4^+$  também levou à diminuição da  $\alpha$ ,  $ETR_{\text{max}}$  e PSL, e à depressão fotossintética ao meio dia ( $A_{\text{max}}$  MD) sob ML, bem como à diminuição da  $A_{\text{max,CO}_2}$ ,  $\epsilon$ ,  $V_{\text{cmax}}$  e  $J$  sob AL. A limitação do transporte de elétrons ( $ETR_{\text{max}}$  e  $J$ ) ou da carboxilação da rubisco ( $\epsilon$ ,  $V_{\text{cmax}}$ ) devem estar associadas à diminuição da assimilação de  $\text{CO}_2$ , contribuindo para a diminuição do ganho de massa nas mudas dessa espécie. Diferentemente de *C. pachystachya*, a limitação da fotossíntese em *G. kunthiana* não foi resultado da limitação estomática ou da condutância do mesófilo, ou seja, da falta de  $\text{CO}_2$ , já que a  $g_s$ ,  $C_i$  e  $g_m$  não diminuíram no tratamento com  $\text{NH}_4^+$ . Uma possibilidade para a diminuição da fotossíntese é a ocorrência de danos oxidativos nas folhas (Ortigosa et al., 2020), já que mudas tratadas com  $\text{NH}_4^+$  apresentaram aumento de dienos conjugados na folha. Na PCA, ambos os marcadores de estresse oxidativo na folha se correlacionaram negativamente com os tratamentos de BL e positivamente com os tratamentos de  $\text{NH}_4^+$  sob ML e AL. Contudo, é importante notar que não houve diminuição da  $F_v/F_0$  em função da fonte de N, indicando que a redução da assimilação de  $\text{CO}_2$  não está relacionada ao comprometimento do fotossistema II.

Independentemente da luminosidade, as mudas de *G. kunthiana* tratadas com  $\text{NH}_4^+$  apresentaram maior teor de aminoácidos nas raízes e folhas. A menor concentração de açúcares solúveis sob ML e AL nas raízes (ART R), e não nas folhas, no cultivo com  $\text{NH}_4^+$ , sugere maior desvio de esqueletos de C para assimilação do  $\text{NH}_4^+$ , principalmente nas raízes, como observado no trigo (*Triticum aestivum* L.), espécie tolerante ao  $\text{NH}_4^+$  (Vega-Mas et al., 2019). De maneira geral, esses resultados sugerem que o menor ganho de biomassa por mudas de *G. kunthiana* tratadas com  $\text{NH}_4^+$  sob ML e AL ocorreu devido à limitação da fotossíntese e ao alto consumo de C para assimilar o  $\text{NH}_4^+$  (Vega-Mas et al., 2019).

Quando tratada com  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , mudas de *G. kunthiana* praticamente não usam  $\text{NO}_3^-$  sob sombreamento profundo, utilizando preferencialmente o  $\text{NH}_4^+$ , que é assimilado nas raízes (Debiasi et al., 2021). Sob maior luminosidade, as mudas mantêm a assimilação de  $\text{NH}_4^+$  nas raízes e também passam a assimilar o  $\text{NO}_3^-$ , principalmente nas folhas (Debiasi et al., 2021). Dessa forma, a expectativa era de que, sob BL, as mudas dessa espécie crescessem mais com  $\text{NH}_4^+$ , pois assimilação do N a partir desse cátion envolve duas etapas metabólicas a menos que gastam energia, catalisadas pelas enzimas nitrato redutase e nitrito redutase (Hachiya e Sakakibara, 2017). Porém, o gasto energético para não acumular  $\text{NH}_4^+$  nos tecidos (pela assimilação em aminoácidos) deve ter sido alto o suficiente para equiparar ao uso do  $\text{NO}_3^-$  sob BL. Mesmo assim, como ressaltado anteriormente, *G. kunthiana* apresentou marcadores de tolerância no cultivo com  $\text{NH}_4^+$  sob BL, como maior  $A_{\text{max}}$  MD,  $N_{\text{tot}}$  nas folhas e baixa concentração de  $\text{NH}_4^+$  nas folhas.

*Cariniana estrellensis* foi a única espécie que não teve a área foliar influenciada negativamente pelo  $\text{NH}_4^+$  sob maiores luminosidades. Além disso, a redução da MST pelo  $\text{NH}_4^+$  sob ML e AL foi menor do que nas demais espécies. Apesar do menor crescimento com  $\text{NH}_4^+$  sob ML e AL, em relação ao  $\text{NO}_3^-$ , as mudas apresentaram maior assimilação de  $\text{CO}_2$  ( $A_{\text{max}}$ ) e eficiência do fotossistema II ( $F_v/F_0$ ), tanto no período da manhã, quanto ao meio dia, independentemente da luminosidade. Isso indica que o crescimento não foi limitado pela fotossíntese no tratamento com  $\text{NH}_4^+$ , diferentemente das demais espécies. Além disso, foi a única espécie que não teve o teor de clorofilas diminuído no tratamento com  $\text{NH}_4^+$  e, possivelmente devido à maior fotossíntese nesse tratamento, teve uma menor necessidade de dissipação de energia na forma de calor (menor *NPQ*). O aumento da fotossíntese pode favorecer a tolerância ao  $\text{NH}_4^+$  ao fornecer mais esqueletos de C para sua assimilação (Ariz et al., 2011; Sétien et al., 2013; González-Moro et al. 2021). Um dos principais mecanismos de tolerância ao  $\text{NH}_4^+$  é sua rápida assimilação em moléculas orgânicas na raiz. Para isso, há alta demanda de C, proveniente do ciclo dos ácidos tricarbóxicos e das rotas anapleróticas associadas a esse ciclo, sendo um dos principais fatores que causam restrição do crescimento vegetal (Vega-Mas et al., 2019; González-Moro et al., 2021; Tian et al., 2021).

Quando ambas as fontes de N estão disponíveis ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), *C. estrellensis* usa preferencialmente o  $\text{NH}_4^+$ , assimilando-o na raiz, mesmo quando a luminosidade aumenta, mas também é capaz de aumentar a assimilação de  $\text{NO}_3^-$  nas folhas quando a intensidade luminosa é maior (Debiasi et al., 2021). De fato, o  $\text{NH}_4^+$  levou à alta assimilação em aminoácidos nas raízes, levando ao maior consumo de ART, o que pode ter causado a diminuição de massa seca na raiz, em relação à parte aérea (redução da razão R/PA) e

contribuído para o menor crescimento nesse tratamento. Das três espécies estudadas, *C. estrellensis* foi a mais tolerante ao cultivo com  $\text{NH}_4^+$  e a única a apresentar maior crescimento sob ML e AL, em relação à BL, com essa fonte de N. Parte dessa tolerância deve ser resultante da elevada assimilação de  $\text{NH}_4^+$  nas raízes e baixo acúmulo desse cátion nas folhas, órgão considerado mais sensível ao acúmulo deste cátion (Hachiya et al., 2021). Mesmo assim, comparado ao uso do  $\text{NO}_3^-$ , o uso de  $\text{NH}_4^+$  como fonte única de N inibiu seu crescimento sob maiores luminosidades. Assim, o efeito negativo do  $\text{NH}_4^+$  sob seu crescimento sob ML e AL deve ter sido resultante do maior dreno energético para a assimilação do N e, possivelmente, a mecanismos de efluxo de  $\text{NH}_4^+$ , que também consomem energia (Bittsánszky et al., 2015) e podem ter contribuído para a diminuição da massa seca nas três espécies estudadas.

Além dos efeitos que o  $\text{NH}_4^+$  pode ter sobre a fotossíntese e no uso de C, o desbalanço iônico é apontado como uma das principais causas da toxicidade do  $\text{NH}_4^+$ , pois os cátions podem competir pelo mesmo canal, havendo a diminuição da entrada de outros cátions, principalmente o potássio ( $\text{K}^+$ ), na presença de alta concentração de  $\text{NH}_4^+$  (Ariz et al., 2011; Esteban et al., 2016). O cultivo com  $\text{NH}_4^+$  levou à diminuição nas concentrações de cálcio nas raízes (nas três espécies) e folhas (*C. estrellensis*), de potássio nas raízes (*C. pachystachya* e *G. kunthiana*) e de manganês nas raízes (nas três espécies) e folhas (*C. pachystachya* e *G. kunthiana*). Esses resultados são similares aos encontrados por Siddique et al. (2002) em *Lycopersicon esculentum* L. (tomateiro), por Kowalska e Sady (2012) e Piñero et al. (2018) em *Capsicum annuum* L. (pimentão) e por de la Peña et al. (2019) em *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv., e devem ter influenciado o crescimento das plantas nesses estudos. Weng et al. (2020) demonstraram que a diminuição do potássio nas plantas é uma das causas do menor crescimento no cultivo com  $\text{NH}_4^+$ , o que explica o fato de *C. estrellensis*, espécie que teve seu perfil nutricional menos afetado pelo  $\text{NH}_4^+$ , principalmente o potássio, ser mais tolerante ao  $\text{NH}_4^+$  em comparação às outras espécies. Na planta aquática *Landoltia punctata* (G. Mey.) Les & D. J. Crawford, espécie tolerante ao  $\text{NH}_4^+$ , o aumento da expressão de genes relacionados ao transporte de  $\text{K}^+$  evitou a deficiência desse cátion (Tian et al., 2021).

Em síntese, em todas as espécies, a baixa luminosidade limitou a fotossíntese e o crescimento das mudas, mas apenas sob maiores luminosidades os efeitos negativos do  $\text{NH}_4^+$  foram perceptíveis. Provavelmente, nas três espécies, o custo energético para bombear  $\text{NH}_4^+$  para fora do citosol e o aumento da assimilação do  $\text{NH}_4^+$  foram causas importantes da diminuição da biomassa, sendo mecanismos comuns na resposta ao cultivo com  $\text{NH}_4^+$  (Britto e Kronzucker, 2002; Esteban et al., 2016; González-Moro et al., 2021). Além desses efeitos,

*C. pachystachya* e *G. kunthiana* tiveram queda da fotossíntese, sob ML e AL por limitações diferentes causadas pelo  $\text{NH}_4^+$ . A espécie que demonstrou maior tolerância ao  $\text{NH}_4^+$  sob maiores luminosidades (*C. estrellensis*) não teve sua fotossíntese limitada por essa fonte de N. Já o cultivo com  $\text{NO}_3^-$  propiciou maior acúmulo de biomassa (e em alguns casos, de  $\text{N}_{\text{tot}}$ ) nas plantas sob maiores luminosidades, nas três espécies. Dessa forma, tendo em vista principalmente o crescimento e fotossíntese das mudas sob baixa luminosidade, não é possível afirmar que o cultivo com  $\text{NO}_3^-$  foi desfavorável ao seu desenvolvimento, sendo que a luz limitou o crescimento de maneira similar em ambos os tratamentos de N. Com o aumento da intensidade luminosa, o cultivo com  $\text{NO}_3^-$  foi favorável ao desenvolvimento das mudas, em comparação ao  $\text{NH}_4^+$ .

#### 4. Referências

- Alexieva V, Sergiev I, Mapelli S, Karanov E (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell Environ* 24: 1337-1344
- Ali A (2020) Nitrate assimilation pathway in higher plants: critical role in nitrogen signaling and utilization. *Plant Sci Today* 7: 182-192
- Araus V, Swift J, Alvarez JM, Henry A, Coruzzi GM (2020) A balancing act: how plants integrate nitrogen and water signals. *J Exp Bot* 71: 4442-4451
- Ariz I, Artola E, Asensio AC, Cruchaga S, Aparicio-Tejo PM, Moran JF (2011) High irradiance increases  $\text{NH}_4^+$  tolerance in *Pisum sativum*: Higher carbon and energy availability improve ion balance but not N assimilation. *J Plant Physiol* 168: 1009-1015
- Baker NR (2008) Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo*. *Annu Rev Plant Biol* 59: 89-113
- Baslam M, Mitsui T, Sueyoshi K, Ohyama T (2021) Recent advances in carbon and nitrogen metabolism in C3 plants. *Int J Mol Sci* 22: 318
- Bittsánszky A, Pilinszky K, Gyulai G, Komives T (2015) Overcoming ammonium toxicity. *Plant Sci* 231: 184-190
- Boveris A, Cadenas E, Chance B (1980) Low-level chemiluminescence of the lipoxygenase reaction. *Photobiochem Photobiophys* 1: 175-182
- Britto DT, Kronzucker HJ (2002)  $\text{NH}_4^+$  toxicity in higher plants: a critical review. *J Plant Physiol* 159: 567-584
- Carr NF, Boaretto RM, Mattos-Jr D (2020) Coffee seedlings growth under varied  $\text{NO}_3^-$ :  $\text{NH}_4^+$  ratio: Consequences for nitrogen metabolism, amino acids profile, and regulation of plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase. *Plant Physiol Biochem* 154: 11-20
- Debiasi TV, Calzavara AK, Sodek L, Oliveira HC (2021) Nitrogen use plasticity in response to light intensity in neotropical tree species of distinct functional groups. *Physiol Plant* 172: 2226-2237

- Debiasi TV, Calzavara AK, da Silva LMI, da Silva JG, Bianchini E, Pimenta JA, Stolf-Moreira R, Aidar MPM, Sodek L, Oliveira HC (2019) Nitrogen metabolism of Neotropical tree seedlings with contrasting ecological characteristics. *Acta Physiol Plant* 41: 131
- de la Peña M, González-Moro MB, Marino D (2019) Providing carbon skeletons to sustain amide synthesis in roots underlines the suitability of *Brachypodium distachyon* for the study of ammonium stress in cereals. *AoB Plants* 11: 1-11
- de Oliveira Maximino JV, Barros LM, Pereira RP, de Santi II, Aranha BC, Busanello C, Viana VE, Freitag RA, Batista BL, Oliveira AC, Pegoraro C (2020) Mineral and fatty acid content variation in white oat genotypes grown in Brazil. *Biol Trace Elem Res* 199: 1194-1206
- Esteban R, Ariz I, Cruz C, Moran JF (2016) Review: mechanisms of ammonium toxicity and the quest for tolerance. *Plant Sci* 248: 92-101
- Feng H, Fan X, Miller AJ, Xu G (2020) Plant nitrogen uptake and assimilation: regulation of cellular pH homeostasis. *J Exp Bot* 71: 4380-4392
- Hachiya T, Inaba J, Wakazaki M, Sato M, Toyooka K, Miyagi A, Kawai-Yamada M, Sugiura D, Nakagawa T, Kiba T, Gojon A, Sakakibara H (2021) Excessive ammonium assimilation by plastidic glutamine synthetase causes ammonium toxicity in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Commun* 12: 4944
- Hachiya T, Sakakibara H (2017) Interactions between nitrate and ammonium in their uptake, allocation, assimilation, and signaling in plants. *J Exp Bot* 68: 2501-2512
- Jian S, Liao Q, Song H, Liu Q, Lepo JE, Guan C, Zhang J, Ismail AM, Zhang Z (2018) NRT1.1-Related  $\text{NH}_4^+$  toxicity is associated with a disturbed balance between  $\text{NH}_4^+$  uptake and assimilation. *J Plant Physiol* 178: 1473-1488
- Kowalska I, Sady W (2012) Effect of nitrogen form, type of polyethylene film covering the tunnel and stage of fruit development on calcium content in sweet pepper fruits. *Acta Sci Pol Hortorum Cultus* 11: 91-100
- Lichtenthaler HK, Buschmann C, Knapp M (2005) How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio  $R_{fd}$  of leaves with the PAM fluorometer. *Photosynthetica* 43: 379-393
- Liu XY, Koba K, Makabe A, Liu CQ (2014) Nitrate dynamics in natural plants: Insights based on the concentration and natural isotope abundances of tissue nitrate. *Front Plant Sci* 5: 355
- Liu Y, von Wíren N (2017) Ammonium as a signal for physiological and morphological responses in plants. *J Exp Bot* 68: 2581-2592
- Maldonado IR, Carvalho PGB, Ferreira NA, Moulin BSF (2013) Protocolo para determinação de açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson. Embrapa Hortaliças-Comunicado Técnico (INFOTECA-E).
- McCullough H (1967) The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clin Chim Acta* 17: 297-304
- Oliveira HC, da Silva LMI, de Freitas LD, Debiasi TV, Marchiori NM, Aidar MPM, Bianchini E, Pimenta JA, Stolf-Moreira R (2017) Nitrogen use strategies of seedlings from neotropical tree species of distinct successional groups. *Plant Physiol Biochem* 114: 119-127

- Oliveira HC, Sodek L (2013) Effect of oxygen deficiency on nitrogen assimilation and amino acid metabolism by soybean root segments. *Amino Acids* 44: 743-755
- Ortigosa F, Valderrama-Martin JM, Urbano-Gómez JA, Garcia-Martin ML, Ávila C, Cánovas FM, Cañas RA (2020) Inorganic nitrogen form determines nutrient allocation and metabolic responses in Maritime Pine seedlings. *Plants* 9: 481
- Pascual J, Rahikainen M, Kangasjärvi S (2017) Plant light stress. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001319.pub3>
- Piñero MC, Pérez-Jiménez M, López-Marín J, Varó P, del Amor FM (2018) Differential effect of the nitrogen form on the leaf gas exchange, amino acid composition, and antioxidant response of sweet pepper at elevated CO<sub>2</sub>. *Plant Growth Regul* 86: 37-48
- Prado-Junior JA, Schiavini I, Vale VS, Arantes CS, van der Sande MT, Lohbeck M, Poorter L (2016) Conservative species drive biomass productivity in tropical dry forests. *J Ecol* 104: 817-827
- 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 Environ* 23: 1397-1405
- Rubio-Asensio JS, Bloom AJ (2017) Inorganic nitrogen form: a major player in wheat and *Arabidopsis* responses to elevated CO<sub>2</sub>. *J Exp Bot* 68: 2611-2625
- Sétien I, Fuertes-Mendizabal T, González A, Aparicio-Tejo PM, González-Murua C, González-Moro MB, Estavillo JM (2013) High irradiance improves ammonium tolerance in wheat plants by increasing N assimilation. *J Plant Physiol* 170: 758-771
- Siddique I, Vieira IC, Schmidt S, Lamb D, Carvalho CJR, Figueiredo RO, Blomberg S, Davidson EA (2010) Nitrogen and phosphorus additions negatively affect tree species diversity in tropical forest regrowth trajectories. *Ecology* 91: 2121-2131
- Sharma A, Kumar V, Shahzad B, Ramakrishnan M, Sidhu GPS, Bali AS, Handa N, Kapoor D, Yadav P, Khanna K, Bakshi P, Rehman A, Kohli SK, Khan EA, Parihar RD, Yuan H, Thukral AK, Bhardwaj R, Zheng B (2019) Photosynthetic response of plants under different abiotic stresses: a review. *Plant Growth Regul* 39: 509-531
- Stangl ZR, Tarvainen L, Wallin G, Marshall JD (2021) Limits to photosynthesis: Seasonal shifts in supply and demand for CO<sub>2</sub> in Scots pine. *New Phytol* 233: 1108-1120
- Tian X, Fang Y, Jin Y, Yi Z, Li J, Du A, He K, Huang Y, Zhao H (2021) Ammonium detoxification mechanism of ammonium-tolerant duckweed (*Landoltia punctata*) revealed by carbon and nitrogen metabolism under ammonium stress. *Environ Pollut* 277: 116834
- Torralbo F, González-Moro MB, Baroja-Fernández E, Aranjuelo I, González-Murua C (2019) Differential regulation of stomatal conductance as a strategy to cope with ammonium fertilizer under ambient versus elevated CO<sub>2</sub>. *Front Plant Sci* 10: 597
- Vega-Mas I, Cukier C, Coletto I, González-Murua C, Limami AM, González-Moro MB, Marino D (2019) Isotopic labelling reveals the efficient adaptation of wheat root TCA cycle flux modes to match carbon demand under ammonium nutrition. *Sci Rep*: 9: 8925
- Weng L, Zhang M, Wang K, Chen G, Ding M, Yuan W, Zhu Y, Xu W, Xu F (2020) Potassium alleviates ammonium toxicity in rice by reducing its uptake through activation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase to enhance proton extrusion. *Plant Physiol Biochem* 151: 429-437

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

## Dados suplementares

Variável	Efeito	<i>Cp</i>		<i>Gk</i>		<i>Ce</i>		
		<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	
Crescimento	AF	Luz	6,718	0,002	3,502	0,037	24,940	0,000
		N	34,987	0,000	21,041	0,000	0,496	0,484
		Luz × N	24,815	0,000	5,421	0,007	0,814	0,449
	MST	Luz	68,051	0,000	26,810	0,000	49,183	0,000
		N	93,687	0,000	21,725	0,000	12,090	0,001
		Luz × N	34,281	0,000	8,104	0,001	5,487	0,043
	R/PA	Luz	16,569	0,000	0,732	0,486	9,800	0,000
		N	24,179	0,000	2,272	0,137	7,947	0,007
		Luz × N	5,666	0,006	0,229	0,796	3,104	0,054
Fotossíntese	$A_{\max}$ M	Luz	53,685	0,000	2,206	0,121	0,741	0,481
		N	5,695	0,021	4,626	0,036	6,049	0,017
		Luz × N	1,973	0,150	0,543	0,584	0,041	0,960
	$g_s$ M	Luz	8,616	0,001	3,266	0,047	0,210	0,811
		N	9,362	0,004	0,124	0,727	2,754	0,103
		Luz × N	0,943	0,396	0,301	0,741	1,133	0,330
	$C_i$ M	Luz	8,428	0,001	2,477	0,094	0,707	0,497
		N	9,344	0,004	5,875	0,019	0,609	0,439
		Luz × N	0,530	0,592	0,662	0,520	1,837	0,169
	$A_{\max}$ MD	Luz	63,339	0,000	1,135	0,329	2,941	0,062
		N	17,749	0,000	0,004	0,950	5,961	0,018
		Luz × N	5,795	0,040	11,418	0,000	0,680	0,511
	$g_s$ MD	Luz	35,111	0,000	0,339	0,714	2,704	0,077
		N	29,973	0,000	1,155	0,287	9,149	0,004
		Luz × N	4,483	0,016	7,523	0,001	2,022	0,143

Tabela S1. Continua.

Variável	Efeito	<i>Cp</i>		<i>Gk</i>		<i>Ce</i>		
		<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	
Fotossíntese	$C_i$ MD	Luz	1,594	0,213	2,593	0,084	1,497	0,234
		N	15,235	0,000	0,060	0,808	0,005	0,942
		Luz × N	0,110	0,896	1,239	0,298	1,898	0,161
	$F_v/F_0$ M	Luz	15,193	0,000	16,787	0,000	2,505	0,091
		N	3,349	0,073	0,223	0,639	4,388	0,041
		Luz × N	1,215	0,305	0,385	0,682	0,001	0,999
	$F_v/F_0$ MD	Luz	28,231	0,000	42,767	0,000	140,758	0,000
		N	3,734	0,059	0,219	0,642	28,817	0,000
		Luz × N	3,115	0,052	0,230	0,795	3,128	0,052
Curvas $A-C_i$	$A_{max,CO_2}$	Luz	173,866	0,000	1,059	0,359	50,103	0,000
		N	28,960	0,000	14,074	0,001	2,290	0,139
		Luz × N	6,157	0,006	5,160	0,012	0,199	0,821
	$E$	Luz	24,187	0,000	1,424	0,256	3,977	0,028
		N	7,732	0,009	6,967	0,013	0,113	0,739
		Luz × N	6,748	0,004	8,719	0,001	0,062	0,940
	$g_m$	Luz	1,661	0,208	1,364	0,271	5,357	0,010
		N	17,341	0,000	0,344	0,562	3,773	0,061
		Luz × N	13,163	0,000	2,264	0,121	5,603	0,008
$V_{cmax}$	Luz	56,041	0,000	5,573	0,009	20,950	0,000	
	N	11,770	0,002	5,240	0,029	0,145	0,705	
	Luz × N	0,416	0,663	3,690	0,037	0,799	0,458	
$J$	Luz	109,118	0,000	5,776	0,008	35,687	0,000	
	N	9,360	0,005	3,738	0,063	0,578	0,452	
	Luz × N	0,192	0,826	3,597	0,040	0,844	0,439	

Tabela S1. Continua.

Variável	Efeito	<i>Cp</i>		<i>Gk</i>		<i>Ce</i>		
		<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	
Curvas <i>A-C<sub>i</sub></i>	<i>TPU</i>	Luz	138,641	0,000	8,274	0,001	52,030	0,000
		N	9,119	0,005	4,207	0,049	6,877	0,013
		Luz × N	0,518	0,601	2,755	0,080	1,326	0,279
	<i>R<sub>d</sub></i>	Luz	5,627	0,009	14,437	0,000	24,552	0,000
		N	6,575	0,016	2,554	0,121	8,056	0,007
		Luz × N	2,248	0,124	0,233	0,794	0,826	0,446
	<i>L<sub>s</sub></i>	Luz	8,358	0,002	1,237	0,304	2,156	0,131
		N	19,103	0,000	0,540	0,468	3,460	0,071
		Luz × N	1,332	0,281	0,472	0,628	0,381	0,686
Curvas de resposta à luz	<i>A</i>	Luz	12,396	0,000	3,684	0,037	0,318	0,730
		N	4,038	0,054	6,973	0,013	0,034	0,856
		Luz × N	1,796	0,183	11,666	0,000	3,556	0,059
	<i>ETR<sub>max</sub></i>	Luz	38,836	0,000	1,074	0,355	4,131	0,026
		N	8,114	0,008	1,915	0,177	3,141	0,086
		Luz × N	3,398	0,047	12,937	0,000	2,252	0,123
	<i>PSL<sub>ETR</sub></i>	Luz	15,123	0,000	0,943	0,401	6,632	0,004
		N	6,799	0,014	0,619	0,437	10,284	0,003
		Luz × N	0,662	0,523	4,128	0,026	5,098	0,013
<i>NPQ</i>	Luz	4,443	0,021	5,404	0,010	0,555	0,580	
	N	1,765	0,194	0,000	0,995	8,056	0,008	
	Luz × N	1,421	0,258	0,475	0,627	1,841	0,176	
Bioquímica	ART raiz	Luz	1,142	0,338	23,052	0,000	1,087	0,355
		N	4,104	0,056	23,177	0,000	7,213	0,014
		Luz × N	0,970	0,395	10,246	0,001	1,616	0,221

Tabela S1. Continua.

Variável	Efeito	<i>Cp</i>		<i>Gk</i>		<i>Ce</i>	
		<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Aminoácidos raiz	Luz	0,289	0,752	1,176	0,326	0,956	0,399
	N	6,143	0,043	21,331	0,000	63,150	0,000
	Luz × N	1,736	0,199	1,277	0,298	1,188	0,323
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> raiz	Luz	8,029	0,002	9,805	0,001	0,050	0,952
	N	69,113	0,000	52,907	0,000	41,449	0,000
	Luz × N	2,530	0,101	6,634	0,005	0,310	0,737
ART folha	Luz	34,500	0,000	4,509	0,022	21,228	0,000
	N	18,629	0,000	9,808	0,005	0,620	0,439
	Luz × N	3,290	0,055	1,659	0,212	1,879	0,175
Aminoácidos folha	Luz	4,563	0,021	8,440	0,002	8,440	0,002
	N	83,658	0,000	43,943	0,000	43,943	0,000
	Luz × N	4,579	0,021	3,415	0,050	3,415	0,050
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> folha	Luz	6,984	0,004	8,990	0,001	12,554	0,000
	N	16,481	0,000	18,330	0,000	0,345	0,563
	Luz × N	2,700	0,088	4,218	0,028	4,721	0,020
Chl	Luz	1,718	0,211	41,654	0,000	4,570	0,022
	N	4,786	0,044	7,852	0,010	3,790	0,064
	Luz × N	3,148	0,070	0,100	0,905	1,651	0,215
N <sub>tot</sub> raiz	Luz	17,902	0,000	1,240	0,313	42,522	0,000
	N	10,529	0,004	0,054	0,818	0,242	0,629
	Luz × N	4,610	0,024	10,086	0,001	3,866	0,040
N <sub>tot</sub> folha	Luz	37,551	0,000	27,510	0,000	21,091	0,000
	N	43,928	0,000	8,369	0,010	7,286	0,017
	Luz × N	11,508	0,001	6,642	0,007	19,299	0,000

Tabela S1. Continua.

Variável	Efeito	<i>Cp</i>		<i>Gk</i>		<i>Ce</i>		
		<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	
Nutrientes	Ca raiz	Luz	2,307	0,128	4,206	0,044	17,940	0,000
		N	14,660	0,001	292,200	0,000	27,620	0,000
		Luz × N	0,120	0,888	16,260	0,001	1,452	0,267
	Cu raiz	Luz	3,491	0,073	2,939	0,079	0,460	0,640
		N	149,700	0,000	65,780	0,000	2,797	0,115
		Luz × N	1,942	0,178	1,888	0,180	3,500	0,059
	Fe raiz	Luz	61,910	0,000	0,423	0,661	1,242	0,314
		N	50,620	0,000	1,382	0,255	1,315	0,267
		Luz × N	8,608	0,002	0,654	0,532	0,203	0,818
	K raiz	Luz	9,688	0,002	4,025	0,036	0,172	0,844
		N	22,920	0,000	17,960	0,000	0,233	0,637
		Luz × N	1,726	0,208	1,388	0,275	1,119	0,354
	Mn raiz	Luz	1,131	0,352	22,730	0,000	0,167	0,848
		N	12,940	0,003	422,800	0,000	37,600	0,000
		Luz × N	0,677	0,525	22,880	0,000	0,715	0,506
	Mg raiz	Luz	48,860	0,000	2,368	0,126	0,395	0,683
		N	244,100	0,000	217,100	0,000	12,490	0,005
		Luz × N	15,850	0,000	6,399	0,009	2,688	0,112
	Zn raiz	Luz	51,220	0,000	0,975	0,405	2,186	0,149
		N	629,500	0,000	0,222	0,646	2,253	0,156
		Luz × N	4,734	0,023	0,049	0,952	2,621	0,108
	Ca folha	Luz	2,654	0,101	1,216	0,320	2,605	0,102
		N	0,782	0,390	0,768	0,392	7,365	0,014
		Luz × N	0,807	0,464	1,446	0,262	2,544	0,106

Tabela S1. Continua.

Variável	Efeito	<i>Cp</i>		<i>Gk</i>		<i>Ce</i>		
		<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	
Nutrientes	Cu folha	Luz	4,983	0,019	12,870	0,000	0,795	0,467
		N	0,296	0,593	9,305	0,007	0,781	0,389
		Luz × N	0,261	0,773	3,181	0,067	1,785	0,196
	Fe folha	Luz	0,515	0,606	0,735	0,496	2,969	0,077
		N	0,317	0,580	6,522	0,022	5,247	0,034
		Luz × N	0,309	0,738	5,665	0,015	0,421	0,663
	K folha	Luz	0,017	0,983	1,933	0,174	0,894	0,427
		N	1,578	0,225	3,357	0,084	1,457	0,243
		Luz × N	1,086	0,359	5,981	0,010	0,509	0,609
	Mn folha	Luz	3,865	0,051	3,256	0,052	2,969	0,077
		N	23,640	0,000	32,710	0,000	1,291	0,271
		Luz × N	1,114	0,360	3,341	0,060	2,720	0,093
	Mg folha	Luz	1,242	0,314	0,995	0,389	0,866	0,438
		N	1,315	0,267	0,934	0,347	0,658	0,428
		Luz × N	0,203	0,818	1,091	0,357	1,898	0,179
	Zn folha	Luz	1,842	0,187	2,539	0,107	2,108	0,151
		N	3,362	0,083	1,291	0,271	4,957	0,039
		Luz × N	0,220	0,804	0,080	0,924	0,149	0,863
Estresse oxidativo	Dienos raiz	Luz	0,192	0,827	0,154	0,858	4,065	0,031
		N	0,018	0,894	9,503	0,005	5,242	0,032
		Luz × N	0,265	0,769	0,001	0,999	0,849	0,441
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> raiz	Luz	13,780	0,000	1,376	0,272	1,452	0,255
		N	1,572	0,224	6,778	0,016	14,348	0,001
		Luz × N	0,873	0,432	0,794	0,464	3,248	0,057

Tabela S1. Continua.

Variável	Efeito	<i>Cp</i>		<i>Gk</i>		<i>Ce</i>		
		<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	
Estresse oxidativo	Dienos folha	Luz	27,308	0,000	3,970	0,033	33,861	0,000
		N	1,367	0,255	4,397	0,047	16,303	0,001
		Luz × N	0,203	0,818	0,005	0,995	6,720	0,005
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> folha	Luz	57,490	0,000	7,119	0,004	70,398	0,000
		N	3,002	0,097	2,594	0,121	3,801	0,063
		Luz × N	0,373	0,693	1,013	0,379	16,207	0,000

**Tabela S1.** Valores de *F* e *P* da análise de variância (*ANOVA*) de dois fatores (fonte de N e luz) com as variáveis utilizadas no estudo.

## 5. CONCLUSÃO GERAL

Os resultados encontrados indicaram que a intensidade luminosa exerce grande influência no metabolismo do N de mudas de espécies arbóreas neotropicais. O aumento de luminosidade aumenta a quantidade de N assimilado e altera o uso do N de forma diferente em cada espécie, estimulando o uso de ambas as fontes em *C. pachystachya*, a assimilação de  $\text{NO}_3^-$  nas raízes e folhas de *G. kunthiana* e a assimilação de  $\text{NH}_4^+$  nas raízes e de  $\text{NO}_3^-$  nas folhas de *C. estrellensis*. O cultivo com  $\text{NH}_4^+$ , como fonte única de N, não é favorável ao crescimento das mudas sob maiores luminosidades, mas não quando a intensidade luminosa é muito baixa, sendo o uso de  $\text{NO}_3^-$  favorável ao crescimento vegetal em ambientes mais iluminados. Destaca-se a plasticidade à luz no uso do N em mudas de *G. kunthiana* e reafirma-se a tolerância de mudas de *C. estrellensis* ao  $\text{NH}_4^+$ . Também é importante ressaltar a capacidade de *C. pachystachya* de intensificar a assimilação de ambas as fontes de N sob alta luminosidade, e sua relativa tolerância ao  $\text{NH}_4^+$ , incomum em espécies intolerantes à sombra.

A elucidação do uso do N e da preferência por  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  e a compreensão da toxicidade do  $\text{NH}_4^+$  em espécies arbóreas sob diferentes intensidades luminosas são de suma importância para a restauração florestal e podem auxiliar na escolha de espécies para uso em reflorestamentos, especialmente para locais com altas concentrações de  $\text{NH}_4^+$ . Os resultados também evidenciam a importância de se desenvolver estratégias de manejo que aumentem a tolerância de plantas ao  $\text{NH}_4^+$ , como o tratamento com óxido nítrico, que merece atenção em estudos futuros.