



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RAFAEL CAETANO DA SILVA

**FONTES INORGÂNICAS DE NITROGÊNIO E ÓXIDO
NÍTRICO ALTERAM A MORFOLOGIA DAS RAÍZES DE
ESPÉCIES ARBÓREAS NEOTROPICAIS DE DIFERENTES
GRUPOS SUCESSIONAIS**

Londrina
2020

RAFAEL CAETANO DA SILVA

**FONTES INORGÂNICAS DE NITROGÊNIO E ÓXIDO
NÍTRICO ALTERAM A MORFOLOGIA DAS RAÍZES DE
ESPÉCIES ARBÓREAS NEOTROPICAIS DE DIFERENTES
GRUPOS SUCESSIONAIS**

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

Orientador: Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira

Londrina
2020

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

D229f da Silva, Rafael.

FONTES INORGÂNICAS DE NITROGÊNIO E ÓXIDO NÍTRICO ALTERAM A MORFOLOGIA DAS RAÍZES DE ESPÉCIES ARBÓREAS NEOTROPICAIS DE DIFERENTES GRUPOS SUCESSIONAIS / Rafael da Silva. - Londrina, 2020.
70 f. : il.

Orientador: Halley Caixeta de Oliveira.

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

Inclui bibliografia.

1. Botânica - Tese. 2. Ciências Biológicas - Tese. 3. Fisiologia Vegetal - Tese. I. Caixeta de Oliveira, Halley . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDU 574

RAFAEL CAETANO DA SILVA

**FONTES INORGÂNICAS DE NITROGÊNIO E ÓXIDO NÍTRICO
ALTERAM A MORFOLOGIA DAS RAÍZES DE ESPÉCIES ARBÓREAS
NEOTROPICAIS DE DIFERENTES GRUPOS SUCESSIONAIS**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Marília Gaspar Maïs
Instituto de Botânica de São Paulo

Prof. Dr. Artur Berbel Lirio Rondina
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Weliton José da Silva
Universidade Estadual de Londrina – UEL

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

Londrina, 20 de fevereiro de 2020.

*Dedico esse trabalho
à minha família, pelo apoio e amor.*

AGRADECIMENTOS

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

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

À minha irmã Mariana, por toda a atenção, carinho, preocupação e auxílio.

À Natália por ter sido tão gentil, companheira, paciente e amorosa, me auxiliando sempre que possível.

À Prof^a. Dr^a. Amedea Barozzi Seabra e ao pessoal da Universidade Federal do ABC (UFABC) por terem disponibilizado os doadores e sequestradores de NO, assim como terem auxiliado em diversas análises.

À Prof^a. Dr^a. Cláudia Martinez, por disponibilizar seu laboratório para análises.

À Universidade Estadual de Londrina pela minha formação e disponibilidade de espaços para a realização deste e outros trabalhos.

Ao Prof. Dr. Waldemar Zangaro e Dr. Artur Berbel Rondina por toda ajuda, disposição e paciência.

Ao Professor Halley por ter me apoiado e transmitido tanto conhecimento, sempre acreditando em mim.

Aos amigos Tatiane, Lara, Karina, Bruno, Anderson, André e Diego que me auxiliaram em diversas análises, me apoiaram e me animaram.

Aos colegas de laboratório pela ajuda, companhia no laboratório e por todos os momentos juntos.

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

Aos meus pais Sônia e Élisson, pelo apoio, paciência e força durante todos esses anos de estudo.

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

*“O poder não vem do conhecimento mantido,
mas do conhecimento compartilhado”*

William Henry Gates III

SILVA, Rafael Caetano. **Fontes inorgânicas de nitrogênio e óxido nítrico alteram a morfologia das raízes de espécies arbóreas neotropicais de diferentes grupos sucessionais.** 2020. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

A obtenção de diferentes fontes de nitrogênio (N) a partir do solo pode causar alterações morfofisiológicas nas plantas. O óxido nítrico (NO) é conhecido por atuar como molécula sinalizadora na regulação do metabolismo vegetal e da morfologia das raízes. Mesmo com a alta demanda de mudas de espécies arbóreas neotropicais em programas de reflorestamento, são raros os estudos abordando-as. Desse modo, foram utilizadas mudas de espécies pioneiras (*Cecropia pachystachya* Trécul, *Croton floribundus* Spreng., *Schinus terebinthifolius* Raddi, *Solanum mauritianum* Scop. e *Trema micranta* (L.) Blume) e não-pioneiras (*Cabralea canjerana* (Vell.) Mart., *Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg, *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze, *Guarea kunthiana* A.Juss. e *Poecilanthus parviflora* Benth.), a fim de analisar as alterações estimuladas pelo cultivo em nitrato (NO_3^-) ou amônio (NH_4^+) sobre a morfologia de raízes. Além disso, avaliou-se a influência do NO sobre a morfologia das raízes de *C. pachystachya* e *C. estrellensis*. Para isso, realizaram-se análises de parâmetros morfológicos (massa seca da parte aérea e raiz, número e comprimento médio de raízes laterais, comprimento da raiz principal, comprimento total das raízes, diâmetro das raízes finas, incidência e comprimento de pelos absorventes) e bioquímicos (emissão de NO, níveis de S-nitrosotióis, malondialdeído (MDA) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2)). O cultivo hidropônico das mudas foi efetuado em casa de vegetação, utilizando soluções nutritivas contendo 2 mM de NO_3^- ou NH_4^+ , com duração média de 30 dias. Para a análise do efeito do NO, utilizaram-se 10 μM e 100 μM de S-nitrosoglutationa (GSNO), um doador de NO, ou 1 μM de PTIO, um sequestrador de NO. O cultivo com NO_3^- resultou em maiores massas secas de raiz e parte aérea, assim como maior comprimento total das raízes, de todas as espécies pioneiras, indicando grande preferência por essa fonte de nitrogênio. Levando em consideração os mesmos parâmetros, houve variação na resposta das espécies não-pioneiras às diferentes fontes de N, sendo possível observar para a maioria delas diferenças menos acentuadas. Para os parâmetros relacionados às raízes laterais e pelos absorventes, observaram-se comportamentos espécie-específicos, não seguindo um padrão quanto ao grupo pertencente. Utilizando *C. pachystachya* e *C. estrellensis*, observou-se que os níveis de MDA e H_2O_2 não se alteraram em ambas as espécies sob as diferentes fontes de N, sugerindo que não há toxicidade nesses cultivos ou que essa não está relacionada com o estresse oxidativo. Por outro lado, o cultivo com NO_3^- resultou em maior emissão de NO pelas raízes de ambas as espécies. Já os níveis radiciais de S-nitrosotióis foram maiores sob cultivo com NO_3^- apenas na espécie pioneira. A resposta das mudas cultivadas com NH_4^+ ao tratamento com GSNO também se mostrou ser espécie-específica. *Cecropia pachystachya* foi mais responsiva à aplicação de GSNO do que *C. estrellensis*, tendo seu crescimento favorecido pela menor dose de doador de NO. No entanto, o tratamento de plantas sob NO_3^- com o sequestrador de NO levou a efeitos pontuais, não mimetizando o fenótipo de plantas cultivadas com NH_4^+ . Observa-se, desse modo, que tanto as fontes de N quanto o NO podem alterar a morfologia das raízes de mudas de espécies arbóreas neotropicais e que essas respostas não necessariamente estão relacionadas ao grupo sucessional pertencente.

Palavras-chave: Metabolismo de nitrogênio. Cultivo hidropônico. Mata Atlântica. Pioneiras. Não-Pioneiras.

SILVA, Rafael Caetano. **Inorganic nitrogen sources and nitric oxide alter the root morphology of neotropical tree species of different successional groups**. 2020. 69 p. Dissertation (Master's Degree Dissertation) – State University of Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

Nitrogen (N) acquisition from different sources in the soil may cause morphophysiological alteration in plants. Nitric oxide (NO) is known for act as a signaling molecule regulating plant metabolism and root morphology. Despite their importance in reforestation programs, studies using neotropical tree species from different ecological successional groups are scarce. Thereby, we used seedlings of pioneer species (*Cecropia pachystachya* Trécul, *Croton floribundus* Spreng., *Schinus terebinthifolius* Raddi, *Solanum mauritianum* Scop. e *Trema micranta* (L.) Blume) and non-pioneer species (*Cabralea canjerana* (Vell.) Mart., *Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg, *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze, *Guarea kunthiana* A.Juss. e *Poecilanthe parviflora* Benth.), in order to analyze the effects of nitrate (NO_3^-) or ammonium (NH_4^+) cultivation on root morphology. We also evaluated the NO influence in *C. pachystachya* and *C. estrellensis* root morphology. We analyzed morphological (root and shoot dry matter, number and mean length of lateral roots, primary root length, total length of root, fine root diameter, root hair incidence and length) and biochemical parameters (NO emission, levels of S-nitrosothiols, malondialdehyde (MDA), and hydrogen peroxide (H_2O_2)). Seedlings were grown hydroponically in a greenhouse, using a nutrient solution containing 2 mM of NO_3^- or NH_4^+ , for about 30 days. To evaluate the NO effect, we used 10 and 100 μM of the NO donor S-nitrosoglutathione (GSNO) or 1 μM of the NO scavenger PTIO. NO_3^- cultivation resulted in higher root and shoot dry matter, as well as higher total length of root, of all pioneer species, showing their preference for this N source. We also observed variation among species of non-pioneer group with these same parameters, having less significant alterations than in pioneer species. Species-specific responses were observed in lateral roots and root hair parameters, not following a pattern within each group. Using *C. pachystachya* and *C. estrellensis* we did not observe any alterations in MDA and H_2O_2 levels in response to N source, suggesting the absence of toxicity or that is not related to oxidative stress. NO_3^- cultivation led to higher NO emission in both species. On the other hand, root RSNO levels were higher only in pioneer species. Seedlings response to NH_4^+ cultivation with GSNO also seems to be species-specific. *Cecropia pachystachya* was more responsive to GSNO application than *C. estrellensis*, being benefited by the lowest dose. However, NO_3^- plants treated with NO scavenger had punctual effects, not mimicking the phenotype of NH_4^+ -grown plants. Overall, both N sources and NO can alter the root morphology in seedlings of neotropical tree species and these are not necessarily related to ecological successional group belonging

Keywords: Nitrogen metabolism. Hydroponic cultivation. Atlantic Forest. Pioneer Species. Non-pioneer Species.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Esquema de assimilação de nitrato (NO_3^-), amônio (NH_4^+) e óxido nítrico (NO) em células vegetais. Abreviações: AMT, transportador de NH_4^+ ; GOGAT, glutamato sintase; GS, glutamina sintetase; NiR, nitrito redutase; NR, nitrato redutase; NRT, transportador de NO_3^- . Adaptado de Lu et al. (2016). 20
- Figura 2** Esquema simplificado da homeostase do óxido nítrico (NO). Abreviações: GR – glutatona redutase, GSH – glutatona reduzida, GSNO - S-nitrosoglutatona, GSNOR – S-nitrosoglutatona redutase, GSSG – glutatona oxidada, NiR – nitrito redutase, NH_3 – amônia, NH_4^+ - amônio, NO_2^- - nitrito, NO_3^- - nitrato, NR – nitrato redutase. Adaptado de Salgado et al. (2013). 24
- Figura 3** Análise de componentes principais baseada nos dados de comprimento da raiz principal (CRP), comprimento total de raiz (CTR), diâmetro da raízes finas (DRF), incidência de pelos absorventes (IP), massa seca da raiz (MSR) e número de raízes laterais (NRL) das mudas de Cf (Croton floribundus), Cp (Cecropia pachystachya), Sm (Solanum mauritianum), St (Schinus terebinthifolius), Tm (Trema micrantha) – pioneiras, e Cc (Cabralea canjerana), Ce (Cariniana estrellensis), Cx (Campomanesia xanthocarpa), Gk (Guarea kunthiana) e Pp (Poecilanthe parviflora) – não-pioneiras, cultivadas com nitrato (N) ou amônio (A). 38

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** Emissão de NO (A) e quantidade de S-nitrosotiois (RSNOs) (B) em raízes de mudas de Cp (*Cecropia pachystachya*) e Ce (*Cariniana estrellensis*) cultivadas em NO₃⁻ (barras brancas) ou NH₄⁺ (barras pretas). Os dados correspondem a média ± erros-padrão (n = 4). Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos, para cada espécie, pelo teste F (ANOVA; p < 0,05). 40
- Gráfico 2** Níveis de malondiadeído (MDA) (A) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (B) em raízes de mudas de Cp (*Cecropia pachystachya*) e Ce (*Cariniana estrellensis*) cultivadas em NO₃⁻ (barras brancas) ou NH₄⁺ (barras pretas). Os dados correspondem a média ± erros-padrão (n = 4). Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos, para cada espécie, pelo teste F (ANOVA; p < 0,05). 41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características de espécies pioneiras e não-pioneiras estudadas27
Tabela 2	Composição da solução nutritiva com nitrato (NO ₃ ⁻) e amônio (NH ₄ ⁺) e concentrações finais dos sais. Adaptado de Debiasi et al. (2019).....29
Tabela 3	Parâmetros morfológicos de mudas de espécies pioneiras - Cf (Croton floribundus), Cp (Cecropia pachystachya), Sm (Solanum mauritianum), St (Schinus terebinthifolius) e Tm (Trema micrantha) - submetidas ao cultivo hidropônico com nitrato (NO ₃ ⁻) ou amônio (NH ₄ ⁺), assim como uma razão entre as médias dos cultivos de NO ₃ ⁻ e NH ₄ ⁺ . Os valores correspondem a média ± erros-padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos, para cada espécie, pelo teste F (ANOVA; p < 0,05). O número dentro dos parênteses corresponde ao n de cada tratamento em cada espécie.35
Tabela 4	Parâmetros morfológicos de mudas de espécies não-pioneiras - Cc (Cabralea canjerana), Ce (Cariniana estrellensis), Cx (Campomanesia xanthocarpa), Gk (Guarea kunthiana), Pp (Poecilanthe parviflora) - submetidas ao cultivo hidropônico com nitrato (NO ₃ ⁻) ou amônio (NH ₄ ⁺), assim como uma razão entre as médias dos cultivos de NO ₃ ⁻ e NH ₄ ⁺ . Os valores correspondem a média ± erros-padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos, para cada espécie, pelo teste F (ANOVA; p < 0,05). O número dentro dos parênteses corresponde ao n de cada tratamento em cada espécie36
Tabela 5	Valores de p e F da PERMANOVA de um fator comparando os parâmetros morfológicos das mudas sob cultivo com nitrato ou amônio para cada uma das espécies: Cf (Croton floribundus), Cp (Cecropia pachystachya), Sm (Solanum mauritianum), St (Schinus terebinthifolius), Tm (Trema micrantha) – pioneiras, e Cc (Cabralea canjerana), Ce (Cariniana estrellensis), Cx (Campomanesia xanthocarpa), Gk (Guarea kunthiana) e Pp (Poecilanthe parviflora). O asterisco indica efeito significativo da fonte de nitrogênio (p < 0,05)..... 39
Tabela 6	Parâmetros morfológicos de mudas de Cp (Cecropia pachystachya) e Ce (Cariniana estrellensis) cultivadas com NH ₄ ⁺ como fonte de

nitrogênio e suplementadas com S-nitrosoglutationa (GSNO) nas concentrações de 10 e 100 μM . O tratamento controle não recebeu a adição de GSNO. Os valores correspondem às médias \pm erros-padrão (n = 8). Para cada parâmetro, letras iguais indicam valores que não se diferenciam dentro da espécie de acordo com ANOVA seguida de teste de Fisher (p <0,05).43

Tabela 7

Parâmetros morfológicos de mudas de Cp (*Cecropia pachystachya*) e Ce (*Cariniana estrellensis*) cultivadas com NO_3^- e tratadas com o sequestrador de NO PTIO na concentração de 1 μM . O tratamento controle não recebeu a adição de PTIO. Os valores correspondem a média \pm erros-padrão (n = 6). Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos, para cada espécie, pelo teste F (ANOVA; p < 0,05).46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP	Análise de componentes principais
AMT	Transportadores de amônio
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
Ca ²⁺	Íon cálcio
CP(n)	Componentes principais (eixos)
cPTI	2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5, -tetrametilimidazolina-1-oxi
cPTIO	2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5, -tetrametilimidazolina-1-oxi-3-óxido
Cu ²⁺	Íon cobre/ cobre (II)
DAF-2	4,5-diaminofluoresceína
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAA	Solução composta de formaldeído, ácido acético e álcool
Fd	Ferredoxina
GOGAT	Glutamato sintase
GR	Glutathiona redutase
GS	Glutamina sintetase
GSH	Glutathiona reduzida
GSNO	S-nitrosoglutathiona
GSNOR	Ferredoxina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
K ⁺	Íon potássio
KCl	Cloreto de potássio
KOH	Hidróxido de potássio
LABRE	Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas
MDA	Malondialdeído
Mg ²⁺	Íon magnésio
N	Nitrogênio
NEM	N-etilmaleimida
NH ₃	Amônia
NH ₄ ⁺	Amônio
NiR	Nitrito redutase

NO	Óxido nítrico
NO ₂ -	Nitrito
NO ₃ -	Nitrato
NR	Nitrato redutase
NRT	Transportadores de nitrato
PERMANOVA	Análise de variância permutacional
PTI	2-fenil-4,4,5,5, -tetrametilimidazolina-1-oxi
PTIO	2-fenil-4,4,5,5, -tetrametilimidazolina-1-oxi-3-óxido
RSNO	S-nitrosotiol
TCA	Ácido tricloroacético
TIR1	Resposta inibitória de transporte 1 (receptor de auxina)
UEL	Universidade estadual de Londrina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	16
2	DESENVOLVIMENTO	19
2.1	UTILIZAÇÃO DO N PELAS PLANTAS	19
2.2	EFEITOS DA FONTE DE N SOBRE A MORFOLOGIA DE RAÍZES	21
2.3	EFEITOS DO NO SOBRE A MORFOLOGIA DAS RAÍZES	22
2.4	EFEITOS DA FONTE DE N E DO NO EM MUDAS DE ESPÉCIES ARBÓREAS NATIVAS	25
2.5	HIPÓTESES	26
2.6	MATERIAL E MÉTODOS	27
2.6.1	Material Vegetal	27
2.6.2	Método de Cultivo e Tratamentos	29
2.6.2.1	Efeitos da fonte de N sobre a morfologia de raiz	29
2.6.2.2	Efeitos do NO sobre a morfologia de raiz	30
2.6.3	Análises Bioquímicas	30
2.6.4	Análises dos Parâmetros Morfológicos	31
2.6.5	Análises Estatísticas	31
2.7	RESULTADOS	32
2.7.1	Efeito da Fonte de N Sobre a Morfologia de Raízes	32
2.7.2	Efeito da Fonte de N Sobre os Níveis de NO, RSNOs e Marcadores de Estresse Oxidativo	40
2.7.3	Efeito do Tratamento com Doador de NO Sobre a Morfologia das Raízes de Plantas Cultivadas com NH ₄ ⁺	41
2.7.4	Efeito do Tratamento com Sequestrador de NO Sobre a Morfologia de Raízes de Plantas Cultivadas com NO ₃ ⁻	45
2.8	DISCUSSÃO	47
2.8.1	Efeitos da fonte de N sobre a morfologia de raiz	47
2.8.2	Efeitos do NO sobre a morfologia de raiz	50
3	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

ANEXOS	62
ANEXO 1 Fotografias de <i>C. canjerana</i> sob NH_4^+ (A) e NO_3^- (B), <i>C. pachystachya</i> sob NH_4^+ (C) e NO_3^- (D), <i>C. floribundus</i> sob NH_4^+ (E) e NO_3^- (F), <i>S. mauritianum</i> sob NH_4^+ (G) e NO_3^- (H), <i>G. kunthiana</i> sob NH_4^+ (I) e NO_3^- (J), <i>C. estrellensis</i> sob NH_4^+ (K) e NO_3^- (L), <i>P. parviflora</i> sob NH_4^+ (M) e NO_3^- (N), <i>S. terebinthifolius</i> sob NH_4^+ (O) e NO_3^- (P), <i>T. micrantha</i> sob NH_4^+ (Q) e NO_3^- (R). As barras pretas correspondem a 5 cm em todas as figuras.	62
ANEXO 2 Fotografias de <i>C. estrellensis</i> sob NH_4^+ (Controle) (A), 10 μM GSNO (B), 100 μM GSNO (C) e <i>C. pachystachya</i> sob NH_4^+ (Controle) (D), 10 μM GSNO (E) e 100 μM GSNO (F). As barras pretas correspondem a 5 cm em todas as figuras.....	67
ANEXO 3 Fotografias de <i>C. estrellensis</i> sob NO_3^- (Controle) (A), PTIO 1 μM (B) e <i>C. pachystachya</i> NO_3^- (Controle) (C) e 1 μM PTIO (D). As barras pretas correspondem a 5 cm em todas as figuras.....	69

1 1 INTRODUÇÃO GERAL

2 O avanço econômico e populacional tem causado severa degradação de
3 ambientes florestais, dando-se na maioria dos casos pelo desmatamento (NGWIRA;
4 WATANABE, 2019). Naturalmente, eventos esporádicos podem levar a queda de
5 determinadas espécies vegetais, possibilitando a substituição por outras espécies e isso é
6 conhecido como sucessão ecológica (CLEMENTS, 1916). O desmatamento por outro lado
7 consiste em uma prática antropogênica e sua grande incidência tem levantado a atenção
8 acerca da necessidade de estratégias para reduzir os casos ou amenizar os efeitos causados por
9 tal ato (CHAKRAVARTY *et al.*, 2012). Mesmo apresentando grande riqueza em
10 biodiversidade animal e vegetal, os índices de desmatamento e modificações em ambientes
11 naturais florestais são extremamente expressivos no Brasil (CHAKRAVARTY *et al.*, 2012;
12 LE; SMITH; HERBOHN, 2014).

13 Devido à grande intervenção humana em ambientes florestais, tem crescido
14 também a prática do reflorestamento com o objetivo de mitigar os impactos causados pela
15 degradação ambiental, como perda de biodiversidade animal e vegetal, assim como impedir o
16 avanço dos danos ambientais para efeitos em grande escala, como alterações climáticas
17 (GIAM, 2017; BASTIN *et al.*, 2019). O uso de espécies arbóreas nativas do Brasil em
18 reflorestamentos nacionais é importante por tratar-se de espécies adaptadas às condições
19 edafoclimáticas brasileiras, conseqüentemente o seu uso torna o ambiente degradado mais
20 próximo do original (CHECHINA; HAMANN, 2015). Dessa forma, justificam-se estudos
21 com mudas de árvores neotropicais para melhor entendimento de sua ecofisiologia, visando
22 aumentar a taxa de sucesso de programas de reflorestamento (CALDEIRA *et al.*, 2012;
23 MORAIS *et al.*, 2012). O transplante de mudas ao ambiente definitivo pode causar severo
24 estresse e prejudicar o crescimento do vegetal; dessa forma, conhecendo-se o ambiente e
25 produzindo mudas melhores aclimatadas, pode-se elevar a taxa de sucesso dessa atividade
26 (DAVIS; JACOBS, 2005). Apesar de sua extrema importância para a aclimação ao
27 ambiente, não é dada devida atenção aos sistemas radiciais em mudas no transplante, devido à
28 dificuldade de se analisar tais estruturas.

29 Dentre os fatores ambientais que afetam a ecofisiologia vegetal, encontra-se
30 a flutuações nas concentrações de determinada forma de nitrogênio (N) disponível no solo.
31 Devido às diferentes estratégias evolutivas adotadas, os vegetais apresentam alterações tanto
32 na morfologia quanto no metabolismo, quando expostos a diferentes fontes inorgânicas de N,
33 das quais as mais importantes são nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+) (ANDREWS; RAVEN;

1 LEA, 2013). Em estudos com espécies modelo, como *Arabidopsis thaliana* e *Medicago*
2 *truncatula*, observou-se que o NO_3^- induz o aumento do comprimento de raízes laterais,
3 enquanto o NH_4^+ leva a uma maior incidência de raízes laterais, de menor comprimento
4 (LIMA *et al.*, 2010; ESTEBAN *et al.*, 2016a). Também foi observado que o aumento na
5 concentração de N, como NO_3^- ou NH_4^+ , pode levar a menores comprimentos nos pelos
6 absorventes e maior densidade dessas estruturas em *A. thaliana* (VATTER *et al.*, 2015; ZHU
7 *et al.*, 2016).

8 Todavia, estudos com espécies arbóreas neotropicais indicam que a
9 utilização das diferentes fontes inorgânicas de N pelas plantas pode variar conforme as suas
10 características ecológicas (OLIVEIRA *et al.*, 2017; DEBIASI *et al.*, 2019). Espécies arbóreas
11 pioneiras (intolerantes à sombra) apresentam preferência por NO_3^- e conseqüentemente
12 possuem seu desenvolvimento prejudicado quando cultivadas com NH_4^+ . Por outro lado,
13 espécies não-pioneiras (tolerantes à sombra) são mais plásticas em relação ao uso de N, sendo
14 que em algumas espécies desse grupo não se observa diferença acentuada no crescimento
15 conforme a fonte de N (OLIVEIRA *et al.*, 2017; DEBIASI *et al.*, 2019). Nesses trabalhos,
16 observou-se diferença na morfologia das raízes em resposta ao NO_3^- e NH_4^+ , porém não foram
17 realizadas análises quantitativas além da massa seca total da raiz.

18 Além do NO_3^- e NH_4^+ , o óxido nítrico (NO) pode induzir alterações na
19 morfologia das raízes (LIRA-RUAN; MENDIVIL; DUBROVSKY, 2013). O NO é um
20 radical livre gasoso, sendo uma espécie reativa de N (ERN) que participa como uma molécula
21 sinalizadora em vários processos do crescimento e desenvolvimento vegetal e na resposta a
22 estresses (SAHAY; GUPTA, 2017; DEL CASTELLO *et al.*, 2019). O NO pode estimular o
23 alongamento de raízes seminais bem como a formação de raízes adventícias (SUN *et al.*,
24 2018). Igualmente, Manoli *et al.* (2014), fornecendo NO_3^- como fonte de nitrogênio,
25 observaram os mesmos efeitos nesses parâmetros, relacionando-os às rotas sinalizadoras do
26 NO. Sabe-se que a síntese do NO ocorre principalmente a partir de L- arginina e nitrito (NO_2^-),
27 sendo esse último resultante da redução do NO_3^- pela enzima nitrato redutase (NR) (ASTIER;
28 GROSS; DURNER, 2018). Desse modo, plantas submetidas a NO_3^- como fonte de N
29 produzem maiores níveis de NO que as cultivadas em NH_4^+ (OLIVEIRA; FRESCHI; SODEK,
30 2013).

31 Apesar da alta relevância da fonte de N e do NO na morfologia da raiz, a
32 literatura ainda é escassa a respeito de espécies arbóreas neotropicais, com a maior parte dos
33 estudos utilizando plantas modelo ou nativas de países com clima temperado, as quais não
34 refletem a realidade das espécies nativas do Brasil. Desse modo, estudos com espécies

1 arbóreas neotropicais são necessários para o melhor entendimento da sua ecofisiologia e das
2 suas respostas às diferentes fontes inorgânicas de N e ao NO.

3 O presente estudo teve como objetivo geral analisar os efeitos de NO_3^- e
4 NH_4^+ , assim como do NO, sobre a morfologia de raízes de espécies arbóreas neotropicais
5 pioneiras e não-pioneiras. Como objetivos específicos, verificou-se se a resposta das raízes à
6 fonte de N varia conforme o grupo sucessional e avaliaram-se os efeitos causados pelo NO na
7 morfologia das raízes de plantas cultivadas com NH_4^+ , bem como o envolvimento dessa
8 molécula nas respostas induzidas pelo NO_3^- .

9

2 DESENVOLVIMENTO

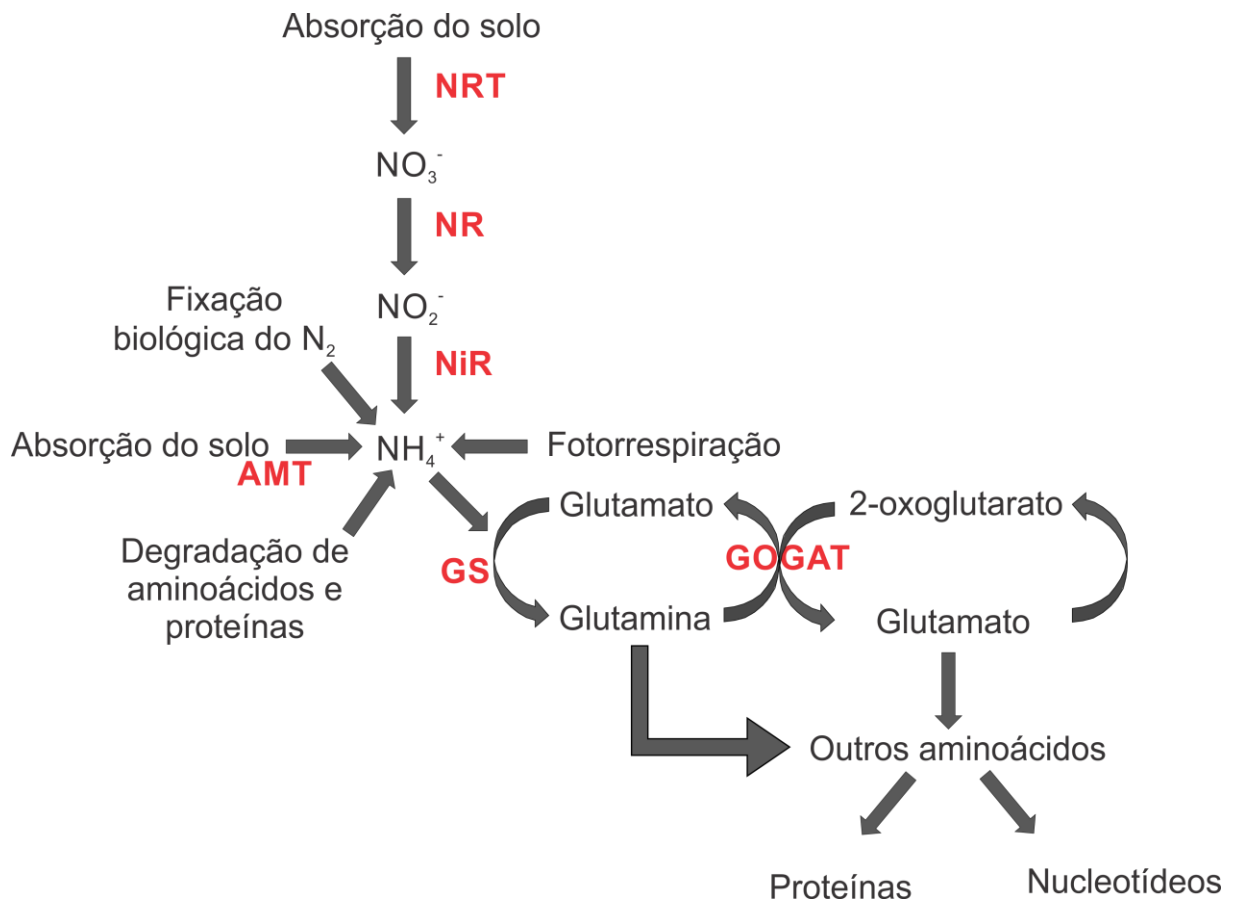
2.1 UTILIZAÇÃO DO N PELAS PLANTAS

O N é um composto extremamente importante para os vegetais, sendo necessário para a síntese de proteínas, nucleotídeos, adenosina trifosfato (ATP), clorofilas e hormônios (KRAISER *et al.*, 2011; SMITH, 2017). Sua presença no solo é dada em diferentes formas, tais como NO_3^- , NH_4^+ e compostos orgânicos nitrogenados. As plantas respondem diferentemente em relação ao seu crescimento e morfologia com base nas diferentes concentrações das fontes de N às quais estão expostas (NA *et al.*, 2014).

O NO_3^- é normalmente a forma de N mais abundante em solos bem aerados, (SMITH, 2017). Porém, em solos de florestas em estágios avançados da sucessão ecológica, a concentração de NH_4^+ pode ser alta devido a alterações no pH, temperatura e níveis de oxigênio (BRITTO; KRONZUCKER, 2002).

O NH_4^+ proveniente do solo é transportado por AMTs (transportadores de amônio) e assimilado diretamente nas raízes pela via da glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT) (Fig. 1). A GS catalisa a conversão do NH_4^+ e glutamato à glutamina, utilizando ATP. Em seguida, a GOGAT utiliza nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) ou ferredoxina (Fd) para converter glutamina e 2-oxoglutarato em duas moléculas de glutamato. Além disso, esse cátion ainda pode ser obtido através da fixação biológica do N_2 por microrganismos simbiotes ou do solo, pela mineralização do N contido na matéria orgânica (HIREL *et al.*, 2011).

- 1 **Fig. 1** – Esquema de assimilação de nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+) em células vegetais.
 2 Abreviações: AMT, transportador de NH_4^+ ; GOGAT, glutamato sintase; GS, glutamina
 3 sintetase; NiR, nitrito redutase; NR, nitrato redutase; NRT, transportador de NO_3^- . Adaptado
 4 de Lu *et al.* (2016).



7 Já a assimilação do NO_3^- nas plantas envolve a sua redução a NH_4^+ , seguida
 8 pela assimilação via GS/GOGAT (Fig. 1). O NO_3^- é transportado por NRTs (transportadores
 9 de nitrato) e, em seguida, a enzima nitrato redutase (NR) converte o NO_3^- a nitrito (NO_2^-), o
 10 qual é reduzido a NH_4^+ pela nitrito redutase (NiR) (LILLO, 2008).

11 Quando acumulado em grande quantidade, o NH_4^+ pode causar toxicidade a
 12 muitas espécies vegetais, fazendo-se necessária a rápida assimilação desse composto
 13 (MARINO; MORAN, 2019). Com a absorção do NH_4^+ no solo, há liberação de H^+ causando
 14 aumento na acidificação do substrato, sendo esse um dos motivos associados à toxicidade do
 15 NH_4^+ (HELALI *et al.*, 2010; BITTSÁNSZKY *et al.*, 2015; TIAN; NIU, 2015). Além disso, o
 16 acúmulo de NH_4^+ pode elevar os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células
 17 vegetais, causando estresse oxidativo e danos a biomoléculas (HUANG *et al.*, 2013). A
 18 toxicidade do NH_4^+ pode estar relacionada também ao fato de esse cátion inibir a absorção de

1 potássio (K^+), magnésio (Mg^{2+}) e cálcio (Ca^{2+}) pelas raízes, causando deficiências nutricionais
2 (SZCZERBA, 2008). Observaram-se menores níveis de auxina quando plantas com
3 preferência por NO_3^- são tratadas com NH_4^+ , influenciando parâmetros como o comprimento
4 das raízes (ESTEBAN *et al.*, 2016b). Ainda, Li *et al.* (2013) observaram que o cultivo com
5 NH_4^+ estimulou maior produção de etileno em *A. thaliana*, levando a maior produção de
6 raízes laterais.

7 Ao contrário do NH_4^+ , o NO_3^- dificilmente induz sintomas de toxicidade nas
8 plantas. Ao ser absorvido pelas raízes, esse ânion pode ser estocado ou assimilado diretamente
9 nesse órgão ou transportado para a parte aérea, onde novamente pode ser estocado ou
10 assimilado. Os vacúolos das células da raiz e da parte aérea são os principais locais em que a
11 planta armazena o NO_3^- (HAWKESFORD *et al.*, 2012). A capacidade de armazenamento de
12 NO_3^- depende do genótipo da planta e das condições ambientais (DECHORGNAT *et al.*,
13 2010). Apesar de poder ser armazenado em altos níveis sem causar danos ao tecido vegetal, a
14 quantidade de energia necessária para assimilar o NO_3^- é bem mais alta que a necessária para
15 assimilar o NH_4^+ , o que pode limitar o crescimento de plantas que vivem em condições de
16 baixa luminosidade (ANDREWS; RAVEN; LEA, 2013).

17 2.2 EFEITOS DA FONTE DE N SOBRE A MORFOLOGIA DE RAÍZES

18 A disponibilidade de nutrientes para as plantas pode causar alterações na
19 morfologia de suas raízes (GRUBER *et al.*, 2013). Em estudos utilizando soja (*Glycine max*),
20 *Arabidopsis thaliana* e *Medicago truncatula*, observou-se que, em tratamentos com NO_3^- , há
21 maior estímulo para o alongamento das raízes laterais (LIMA *et al.*, 2010; OLIVEIRA;
22 FRESCHI; SODEK, 2013; ESTEBAN *et al.*, 2016a). Já sob nutrição com NH_4^+ , há maior
23 quantidade de raízes laterais, mas de menor comprimento, em relação ao tratamento sob NO_3^-
24 (LIMA *et al.*, 2010). Esteban *et al.* (2016a) observaram ainda que, sob altas doses de NH_4^+ , o
25 crescimento da raiz principal de *M. truncatula* é inibido. Portanto, a condição ideal para o
26 crescimento tanto em comprimento quanto em quantidade de raízes laterais seria na presença
27 simultânea de NH_4^+ e NO_3^- (LIMA *et al.*, 2010).

28 O NH_4^+ e o NO_3^- podem influenciar o crescimento e desenvolvimento das
29 raízes laterais. Nessas estruturas ainda pode se ter pelos absorventes, que consistem em
30 expansões das células comuns vegetais, maximizando a superfície efetiva de absorção de água
31 e nutrientes da planta (VATTER *et al.*, 2015). Em um estudo utilizando *A. thaliana*, Vatter *et*
32 *al.* (2015) observaram que, sob baixa concentração de NO_3^- , há baixa densidade dos pelos
33 absorventes, porém, aumento no comprimento dessas estruturas. Utilizando essa mesma

1 espécie, Zhu *et al.* (2016) observaram ainda que, quando submetida a tratamentos com altas
2 concentrações de NH_4^+ , os pelos absorventes apresentaram menor comprimento em relação ao
3 tratamento com NO_3^- .

4 2.3 EFEITOS DO NO SOBRE A MORFOLOGIA DAS RAÍZES

5 O NO consiste em um radical livre gasoso, sendo uma ERN que
6 desempenha importante papel sinalizador em processos fisiológicos como germinação,
7 floração, senescência e resposta a estresses (ASTIER; GROSS; DURNER, 2018). Pode atuar
8 controlando expressão de genes e modificando a atividade de proteínas por meio de
9 modificações pós-traducionais, como a S-nitrosação (ASTIER; GROSS; DURNER, 2018).

10 Estudos com espécies modelo e cultivadas, *A. thaliana*, arroz (*Oryza*
11 *sativa*), tomate (*Solanum lycopersicum*), *Lupinus albus* e milho (*Zea mays*), indicaram que o
12 NO atua positivamente na formação de raízes laterais e adventícias (CORREA-ARAGUNDE;
13 GRAZIANO; LAMATTINA, 2004; IVANCHENKO; MUDAY; DUBROVSKY, 2008;
14 KOLBERT; ORTEGA; ERDEI, 2010; CHEN; KAO, 2012; MENG *et al.*, 2012). Sabe-se
15 ainda que esse sinalizador gasoso tem participação ativa na organogênese das raízes
16 (PAGNUSSAT; LANTERI; LAMATTINA, 2003; PAGNUSSAT *et al.*, 2004).

17 Além disso, Lombardo e Lamattina (2012) observaram que o NO está
18 relacionado com a formação dos pelos absorventes em *A. thaliana*. Com a ausência de NO,
19 obtida pelo uso de mutantes ou sequestradores de NO, observou-se crescimento irregular dos
20 pelos, com comprimentos e densidade desiguais quando comparados com o tipo selvagem.
21 Moro *et al.* (2017) observaram que o NO está envolvido na cascata de sinalização que leva à
22 formação de pelos absorventes induzida pela auxina. Nesse mesmo estudo, observou-se que a
23 aplicação de auxina ou de um doador de NO restaurou a formação de pelos em mutantes
24 glabros.

25 O papel do NO na morfologia da raiz pode estar relacionado à auxina,
26 atuando *downstream* em relação a esse hormônio (PAGNUSSAT; LANTERI; LAMATTINA,
27 2003). A auxina age através do NO para ativar a proteína cinase ativada por mitógenos
28 (MAPK), levando à formação de raízes laterais (PAGNUSSAT *et al.*, 2004), assim como a S-
29 nitrosação do receptor TIR1 pode potencializar as ações sinalizadoras da auxina (TERRILE *et*
30 *al.*, 2012).

31 Em relação ao ápice das raízes, Yemets *et al.* (2011) observaram que o NO
32 influencia o arranjo do citoesqueleto de actina, levando a alterações na morfologia da raiz em
33 resposta a estímulos ambientais. O NO também pode alterar o desenvolvimento das raízes

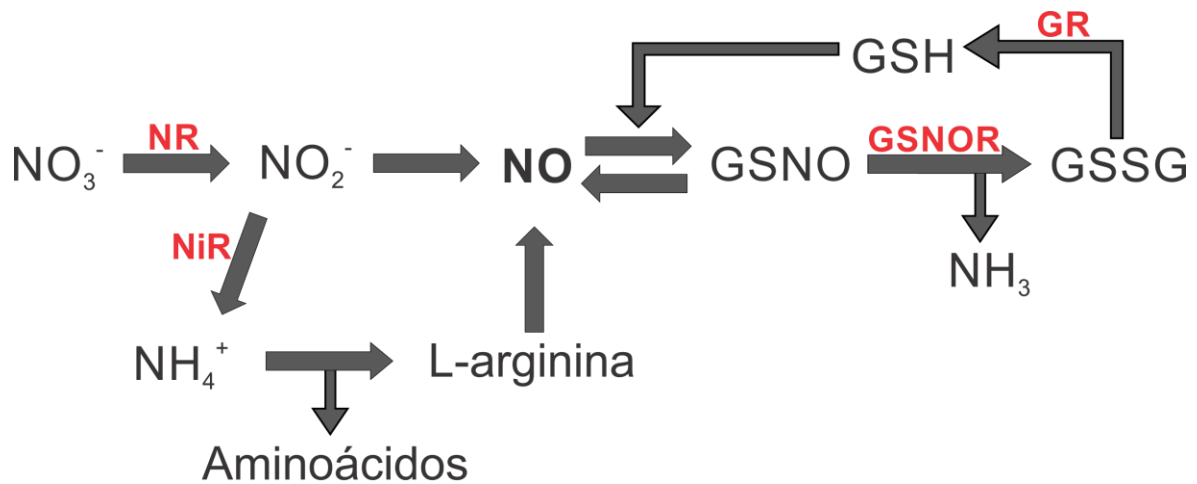
1 pela influência na síntese de celulose, como foi observado em tomate por Correa-Aragunde,
2 Graziano e Lamattina (2004). Por fazer parte da parede celular vegetal, a alteração na
3 produção da celulose pode modular a formação da raiz e pelos absorventes (LOMBARDO;
4 LAMATTINA, 2012). Por outro lado, Yuan e Huang (2016) observaram que o acúmulo de
5 NO ou de auxina em altas concentrações pode levar à inibição do alongamento das raízes.

6 A homeostase e a sinalização do NO nos vegetais pode também depender de
7 outras moléculas, como os S-nitrosotióis (RSNOs) (FANCY; BAHLMANN; LOAKE, 2017).
8 RSNOs são formados pela S-nitrosação de grupos tióis (RSH), como o presente na cisteína
9 (FRUNGILLO *et al.*, 2014). Dentre os RSNOs, a S-nitrosoglutathiona (GSNO), formada a
10 partir da S-nitrosação da glutathiona reduzida (GSH) (Fig. 2), é o mais abundante nos tecidos
11 vegetais, podendo funcionar como um importante reservatório de NO ou ter atividade
12 sinalizadora *per se* (FANCY; BAHLMANN; LOAKE, 2017). A degradação da GSNO a
13 glutathiona oxidada (GSSG) e amônia (NH₃) é catalisada pela enzima S-nitrosoglutathiona
14 redutase (GSNOR), a qual tem importante papel na regulação dos níveis intracelulares de NO
15 e na modulação da S-nitrosação de proteínas (FRUNGILLO *et al.*, 2014; JAHNOVÁ;
16 LUHOVÁ; PETŘIVALSKÝ, 2019).

17 Os mecanismos de síntese do NO em plantas são ainda uma questão de
18 debate (ASTIER; GROSS; DURNER, 2018). Além dos mecanismos relacionados à L-
19 arginina, o NO₂⁻ é considerado um dos principais substratos para a síntese de NO nas plantas e
20 se propõem várias vias de conversão desse ânion a NO. Estudos com diversas plantas
21 mostram o envolvimento da NR na síntese de NO (ASTIER; GROSS; DURNER, 2018) (Fig.
22 2). Além de catalisar a redução do NO₃⁻ a NO₂⁻, ensaios controlados indicaram que a NR
23 pode reduzir o NO₂⁻ a NO (ROCKEL *et al.*, 2002).

24

1 **Fig. 2** – Esquema simplificado da homeostase do óxido nítrico (NO). Abreviações: GR –
 2 glutatona redutase, GSH – glutatona reduzida, GSNO - S-nitrosoglutatona, GSNOR – S-
 3 nitrosoglutatona redutase, GSSG – glutatona oxidada, NiR – nitrito redutase, NH₃ – amônia,
 4 NH₄⁺ - amônio, NO₂⁻ - nitrito, NO₃⁻ - nitrato, NR – nitrato redutase. Adaptado de Salgado *et*
 5 *al.* (2013).



6

7 Fonte: Adaptado de Salgado *et al.* (2013).

8 PODE AINDA HAVER ELEVAÇÃO NA PRODUÇÃO DE NO SOB FATORES ESTRESSANTES
 9 como estresse hídrico (FRESCHI *et al.*, 2010) e temperaturas extremas (ZHAO *et al.*, 2009).
 10 Outras vias de redução do NO₂⁻ a NO incluem a cadeia de transporte de elétrons da
 11 mitocôndria (WULFF *et al.*, 2009) e a dismutação não enzimática em pH ácido (STÖHR;
 12 ULLRICH, 2002).

13 Oliveira, Freschi e Sodek (2013) observaram que a produção de NO por
 14 raízes de soja foi maior no cultivo com NO₃⁻ em relação ao cultivo com NH₄⁺. Igualmente,
 15 maiores níveis de NO foram observados por Alber, Sivanesan e Vanlerberghe (2017) em
 16 plantas de tabaco (*Nicotiniana tabacum*) cultivadas sob NO₃⁻ em comparação às cultivadas
 17 com NH₄⁺. Como citado previamente, o NH₄⁺ é convertido diretamente a glutamina, não
 18 disponibilizando NO₂⁻ como substrato para a síntese de NO como observado em plantas sob
 19 NO₃⁻. Sun *et al.* (2018) observaram que em plantas de arroz, os níveis de auxina e NO nas
 20 raízes laterais e na raiz principal foram maiores em cultivo sob NO₃⁻ em relação às plantas em
 21 cultivo sob NH₄⁺. Ainda, esses autores sugeriram que o NO influencia a morfologia das raízes
 22 de arroz por participar da regulação do transporte de auxina pelo NO₃⁻, levando em
 23 consideração a relação que o NO possui com o NO₃⁻ através da NR.

24 Wang *et al.* (2011) utilizaram uma macrófita (*Hydrilla verticillata*)

1 conhecida por não tolerar cultivo sob NH_4^+ e reportaram que a aplicação de NO levou a
2 menores níveis de indicadores de estresse oxidativo, assim com maiores quantidade de
3 clorofila nessa espécie. Nesse estudo, observou-se que o NO preveniu a formação de EROs e
4 induziu as respostas antioxidantes, auxiliando na tolerância contra os efeitos prejudiciais de
5 NH_4^+ .

6 2.4 EFEITOS DA FONTE DE N E DO NO EM MUDAS DE ESPÉCIES ARBÓREAS NATIVAS

7 A maior concentração da biodiversidade mundial está presente em florestas
8 tropicais, as quais sofrem com elevados índices de desmatamento, causando perda de
9 biodiversidade, intensificação das mudanças climáticas e desestabilização hídrica
10 (TRUMBORE; BRANDO; HARTMANN, 2015; GIAM, 2017; SARMENTO; FRANCA,
11 2018). Por esse motivo, vários estudos vêm sendo desenvolvidos para encontrar maneiras de
12 amenizar os impactos causados pelo desmatamento. Os programas de reflorestamento surgem
13 como estratégia mitigadora frequente, considerando a necessidade da restauração das áreas
14 degradadas (CHAKRAVARTY *et al.*, 2012).

15 Com o objetivo de aproximar o ambiente reflorestado do original,
16 frequentemente são utilizadas mudas de espécies arbóreas nativas, aumentando assim a
17 demanda por elas e justificando estudos ecofisiológicos para melhor compreensão das
18 estratégias evolutivas por elas adotadas (KELLER *et al.*, 2009; MORAIS *et al.*, 2012). A
19 utilização de mudas em estudos ecofisiológicos possibilita se observar características no
20 crescimento de espécies arbóreas, sendo importante devido às diferentes alterações
21 estimuladas por diferentes substratos na morfologia de raiz e/ou parte aérea nesses vegetais
22 (ANDREWS; RAVEN; LEA, 2013). Apesar disso, estudos com enfoque nos efeitos da fonte
23 de N e do NO em mudas de espécies arbóreas neotropicais são pouco frequentes.

24 Trabalhos recentes de nosso grupo de pesquisa demonstraram que mudas de
25 espécies arbóreas neotropicais pioneiras apresentam preferência por NO_3^- , sendo altamente
26 capazes de assimilá-lo nas folhas. Em contrapartida, elas têm o crescimento prejudicado na
27 presença de NH_4^+ como fonte de N. Já mudas de espécies não-pioneiras são mais tolerantes ao
28 NH_4^+ e podem apresentar variação na capacidade de uso do NO_3^- (OLIVEIRA *et al.*, 2017;
29 DEBIASI *et al.*, 2019). Assim, há grande importância na preferência por determinada fonte de
30 N em relação ao ambiente ao qual essas plantas estão adaptadas (AIDAR *et al.*, 2003).
31 Espécies pioneiras habitam áreas com maior concentração de NO_3^- devido a maior oxigenação,
32 menor acúmulo de matéria orgânica e maior temperatura do solo, fatores que estimulam
33 maiores níveis desse ânion. Por outro lado, espécies não-pioneiras geralmente habitam solos

1 com maior concentração de NH_4^+ devido a maior deposição de matéria orgânica, menor
2 temperatura e pH do solo. Além disso, a menor demanda de energia para a assimilação do
3 NH_4^+ em relação à do NO_3^- é relevante em ambientes sombreados (BRITTO; KRONZUCKER,
4 2013).

5 Debiasi *et al.* (2019) observaram características similares a espécies
6 pioneiras em *Cariniana estrellensis*, como maior atividade foliar da NR e altos níveis de NO_3^-
7 na seiva do xilema, mesmo se tratando de uma espécie não-pioneira. Do mesmo modo,
8 *Guarea kunthiana*, também pertencente a esse mesmo grupo sucessional, apresentou níveis
9 similares ou até inferiores na atividade da NR nas folhas em comparação às raízes, além do
10 grande acúmulo de NO_3^- nas raízes. Assim, foi proposto nesse trabalho que as respostas das
11 mudas à fonte de N não são determinadas apenas pelo grupo sucessional, mas também pelas
12 características ecológicas particulares de cada espécie. *Cariniana estrellensis* é uma espécie
13 não-pioneira, mas que atinge o dossel. Com isso, a energia requerida para translocação e
14 assimilação do NO_3^- é facilmente obtida devido sua exposição ao sol, comportamento similar
15 ao observado em espécies pioneiras (AIDAR *et al.*, 2003). Por outro lado, *G. kunthiana* é
16 uma espécie de sub-bosque com menor exposição ao sol. Consequentemente, nessas espécies
17 é mais vantajosa a assimilação do NO_3^- diretamente nas raízes, pois a translocação demanda
18 grande gasto energético (AIDAR *et al.*, 2003).

19 Apesar desses estudos, ainda não foi avaliado como diferentes espécies
20 arbóreas neotropicais alteram a morfologia da raiz em resposta à fonte de N e nem o
21 envolvimento do NO nessa resposta.

22

23 2.5 HIPÓTESE

24

25 As fontes de N e o NO afetam a morfologia das raízes de mudas de espécies
26 arbóreas neotropicais, conforme o grupo sucessional.

27

28

1 2.6 MATERIAL E MÉTODOS

2 2.6.1 Material Vegetal

3 Foram utilizadas dez espécies arbóreas nativas da Floresta Estacional Semidecidual, pioneiras e não-pioneiras (Tabela 1).

4 **Tabela 1** – Características das espécies pioneiras e não-pioneiras estudadas

Nome científico	Família	Nome popular	Grupo Sucessional	Altura	Temperatura Média durante o cultivo (°C)	Umidade relativa do ar média durante o cultivo (%)	Utilização	Importância
<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul	Urticaceae	Embaúba-do-brejo	Pioneira	4 - 8 m	19,7	65,7	Reflorestamento	Atrativa para fauna, oferece alimento para diversas espécies
<i>Croton floribundus</i> Spreng.	Euphorbiaceae	Capixinguí	Pioneira	6 - 10 m	19,6	63,9	Reflorestamento	Pioneira altamente tolerante a alterações climáticas. Muito importante para reflorestamento por também ser melífera
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Anacardiaceae	Aroeira-vermelha	Pioneira	5 - 10 m	20,9	67,7	Culinária e medicina	Importante para a fauna nativa do Brasil assim como para uso medicinal
<i>Solanum mauritianum</i> Scop.	Solanaceae	Fumo-bravo	Pioneira	3 - 6 m	25,2	65,3	Reflorestamento	Importante para a fauna nativa do Brasil
<i>Trema micrantha</i> (L.) Blume	Cannabaceae	Pau-pólvara	Pioneira	12 - 15 m	24,6	77,3	Lenha, carvão, esculturas	Espécie de crescimento rápida sendo muito utilizada

								em sistemas agroflorestais
<i>Cabralea canjerana</i> (Vell.) Mart.	Meliaceae	Canjerana	Não- pioneira (Heliófila)	20 - 25 m	25,2	65,3	Estrutura de móveis, cabos de vassoura	Importante para a fauna brasileira
<i>Campomanesia xanthocarpa</i> (Mart.) O. Berg	Myrtaceae	Gabirola	Não- pioneira (Umbrófila)	8 - 10 m	23,5	69,6	Cabo de ferramentas, instrumentos musicais	Importante para a fauna nativa do Brasil
<i>Cariniana estrellensis</i> (Raddi) Kuntze	Lecythidaceae	Jequitibá- branco	Não- pioneira (Heliófila)	15 - 35 m	23,7	62,8	Estrutura de móveis, cabos de ferramentas	Espécie ameaçada de extinção e importante para a fauna nativa do Brasil
<i>Guarea kunthiana</i> A.Juss	Meliaceae	Figo-do- mato	Não- pioneira (Umbrófila)	15 - 20 m	22,0	76,5	Estrutura de móveis, cabos de ferramentas	Importante para a fauna nativa do Brasil
<i>Poecilanthe parviflora</i> Benth.	Fabaceae	Coração- de-negro	Não- pioneira (Umbrófila)	3 - 4 m	20,7	84,1	Estrutura de móveis	Importante para a fauna nativa do Brasil

1 Fonte: Lorenzi, 2008; Carvalho, 2014

2 As sementes foram cedidas pelo Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas (LABRE) da Universidade
3 Estadual de Londrina (UEL). Todas as espécies escolhidas possuem grande importância para o reflorestamento no Bioma Mata Atlântica.

1 2.6.2 Método de Cultivo e Tratamentos

2 A realização do experimento se deu em uma casa de vegetação revestida de
3 tela sombrite (retenção de 55% da radiação solar) na Universidade Estadual de Londrina
4 (23°19'29''S e 51°11'51''O), sem controle de temperatura (Tabela 1).

5 As sementes foram semeadas em bandejas plásticas contendo areia e
6 mantidas na casa de vegetação, com irrigação a cada dois dias. Após a expansão completa do
7 primeiro eofilo, as plântulas foram transplantadas para a hidroponia. A duração média das
8 experimentações foi de 35 dias. As plantas foram cultivadas em diferentes períodos, evitando-
9 se o cultivo durante o inverno.

10 2.6.2.1 Efeitos da fonte de N sobre a morfologia de raiz

11 As dez espécies arbóreas neotropicais foram submetidas a cultivo
12 hidropônico em vasos de 500 mL sob aeração constante, utilizando solução nutritiva com
13 NO_3^- ou NH_4^+ (2 mM) como fonte inorgânica de N (DEBIASI *et al.*, 2019) (Tabela 2). A
14 solução foi renovada uma ou duas vezes por semana e o pH mantido entre 5 e 5,5 com o uso
15 de KOH.

16 **Tabela 2** – Composição da solução nutritiva com nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+) e
17 concentrações finais dos sais.

Sal	NO_3^-	NH_4^+
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	-	1 mM
KNO_3	2 mM	-
KCl	-	2 mM
KH_2PO_4	0,5 mM	0,5 mM
K_2SO_4	1 mM	1 mM
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 mM	1 mM
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 mM	1 mM
$\text{FeSO}_4 \cdot \text{EDTA}$	100 μM	100 μM
H_3BO_3	46,25 μM	46,25 μM
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	9 μM	9 μM
ZnCl_2	0,75 μM	0,75 μM
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,28 μM	0,28 μM
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,331 μM	0,331 μM

18 **Fonte:** Adaptado de Debiiasi *et al.* (2019)

19

1 2.6.2.2 Efeitos da fonte de NO sobre a morfologia de raiz

2 Após a obtenção dos dados do primeiro experimento e testes prévios, foi escolhida
3 uma espécie de cada grupo sucessional (*C. pachystachya* e *C. estrellensis*) para avaliação do
4 efeito do NO sobre as raízes. Para tal fim, utilizou-se uma solução nutritiva de NH_4^+ com a
5 mesma composição encontrada no item 2.6.2.1. Adicionou-se o doador de NO S-
6 nitrosoglutaciona (GSNO) nas concentrações de 10 μM e 100 μM , utilizando como controle a
7 solução nutritiva de NH_4^+ sem adição de GSNO. Do mesmo modo, plantas foram cultivadas
8 em solução nutritiva de NO_3^- (mesma composição encontrada no item 2.6.2.1) e adicionou-se
9 o sequestrador de NO 2-fenil-4,4,5,5, -tetrametilimidazolina-1-oxi-3-óxido (PTIO), a 1 μM ,
10 utilizando como controle a solução nutritiva de NO_3^- sem adição de PTIO. Para esses ensaios,
11 foram utilizados vasos de 190 mL. As soluções foram renovadas de duas a três vezes por
12 semana (incluindo as soluções com GSNO e PTIO, sendo que essas moléculas também foram
13 renovadas) e o pH mantido entre 5 e 5,5 com o uso de KOH.

14 2.6.3 Análises Bioquímicas

15 Uma porção de ápices radiciais (40 mg) incluídos no item 2.6.2.2 foi
16 coletada para a imediata dosagem da emissão de NO, utilizando-se a sonda fluorescente 4,5-
17 diaminofluoresceína (DAF-2). As amostras foram incubadas por 1 h em solução de DAF-2
18 (50 μM) diluída em tampão fosfato (0,1 M; pH 7,2). Após remoção das raízes, a fluorescência
19 da solução (excitação 495 nm, emissão 515 nm) foi medida em um espectrofluorímetro
20 (PERKIN ELMER 1420 VICTOR 3) (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

21 Da mesma forma, os níveis de S-nitrosotióis (RSNOs) dessas espécies
22 foram determinados em extratos aquosos conforme o método proposto por Silveira *et al.*
23 (2016). O material coletado referente ao ápice das raízes (50 mg) foi homogeneizado em 1
24 mL de tampão fosfato (0.1M, pH 7.4) em presença de N-étilmaleimida (NEM) e, em seguida,
25 submetido a um processador ultrassônico. Alíquotas desse extrato foram adicionadas a uma
26 solução de cobre (II) (Cu^{2+}) (0.1M) e o NO liberado foi quantificado utilizando o
27 equipamento WPI TBR4100/1025 acoplado a um sensor ISO-NOP 2 mm.

28 Também foram quantificados os níveis de malondialdeído (MDA) e
29 peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em raízes como marcadores de estresse oxidativo nas espécies
30 utilizadas no item 2.6.2.2. Para isso, 50 mg da porção apical das raízes foram coletados e
31 pulverizados com 1,4 mL de ácido tricloroacético (TCA 0,2%) diluído em metanol. Após
32 centrifugação a 13.700 x g, a 4°C por 5 min, o sobrenadante foi utilizado para a dosagem de
33 H_2O_2 pela reação com iodeto de potássio em tampão fosfato (ALEXIEVA *et al.*, 2001). O

1 MDA também foi determinado no sobrenadante pelo método TBARS (substâncias reativas ao
2 ácido tiobarbitúrico), conforme descrito por Camejo, Wallin e Enojärvi (1998).

3 2.6.4 Análise dos Parâmetros Morfológicos

4 Foram analisadas as massas secas de raiz e parte aérea, comprimento total
5 das raízes, comprimento da raiz principal, comprimento médio e número de raízes laterais,
6 diâmetro das raízes finas, incidência e comprimento dos pelos absorventes de todas as
7 espécies.

8 Para obtenção de tais dados, as mudas foram seccionadas na região do
9 coleto e utilizou-se uma régua milimetrada para medir o comprimento da raiz principal.

10 Foi coletada uma porção de 100 mg de raízes finas de cada muda. Em
11 seguida, utilizando uma lupa estereoscópica binocular, determinou-se a quantidade de pontas
12 presentes para estimar o número de raízes laterais. Além disso, utilizou-se o método de
13 interseção com linhas em placa de Petri para a obtenção do comprimento total das raízes, o
14 qual foi utilizado para o cálculo do comprimento médio das raízes laterais (TENNANT, 1975;
15 REMANS *et al.*, 2012).

16 As raízes foram então fixadas em FAA (formaldeído:ácidoacético:álcool
17 etílico 70%, 5:5:90, v:v:v) para análises de pelos absorventes. O material vegetal foi
18 posicionado em uma lâmina com uma série de intersecções e observado em microscópios Carl
19 Zeiss EL e Einsatze Zeiss Primo Star acoplados a uma câmera AxioCamERc 5s, ambos na
20 objetiva de 10x, para análise de incidência e comprimento de pelos absorventes e diâmetro
21 das raízes finas, sendo analisadas 100 intersecções e 100 pelos absorventes por amostra
22 (ZANGARO *et al.*, 2005).

23 Após a realização de todas as análises, as raízes e a parte aérea dos vegetais
24 foram secas em uma estufa a 60°C para a obtenção da massa seca da parte aérea e raiz.

25 2.6.5 Análises Estatísticas

26 O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado. Até 12
27 repetições foram utilizadas para as análises morfológicas, enquanto quatro repetições foram
28 utilizadas para as análises bioquímicas. Em todos os casos, foi testada a normalidade da
29 distribuição dos dados e a homogeneidade de variâncias e, quando necessário, os dados foram
30 transformados por box-cox. Os dados de incidência dos pelos absorventes foram
31 transformados em arco seno da raiz quadrada de $x/100$ para as análises estatísticas. Para
32 verificar os efeitos dos tratamentos em cada espécie, todos os dados foram submetidos à

1 análise de variância (ANOVA) de um fator. Quando necessário, as médias nos tratamentos
2 utilizando GSNO (item 2.6.2.2) foram comparadas pelo teste de Fisher ($p < 0,05$).

3 Para os dados do experimento 1, foi realizada ainda uma análise de
4 componentes principais (ACP) para a avaliar o agrupamento das espécies em relação aos
5 tratamentos com NO_3^- e NH_4^+ , bem como uma análise de variância multivariada
6 permutacional (PERMANOVA) para verificar se o efeito da fonte de N foi significativo em
7 cada espécie. Os dados foram transformados em (x-média)/desvio padrão antes da construção
8 da ACP.

9 O software usado para as análises estatísticas foi o Paleontological Statistics
10 3rd Edition (PAST 3).

11 2.7 RESULTADOS

12 2.7.1 Efeito da fonte de N sobre a morfologia de raízes

13 Todas as espécies pioneiras utilizadas neste estudo apresentaram massas
14 secas de parte aérea e raiz notavelmente maiores (em média 3,5 e 3,1 vezes, respectivamente)
15 quando submetidas a NO_3^- em comparação às cultivadas com NH_4^+ (Tabela 3). Resultados
16 similares foram observados nas espécies não-pioneiras *C. canjerana*, *C. xanthocarpa* e *G.*
17 *kunthiana*, mas a diferença da massa seca da parte aérea e raiz entre os tratamentos foi menos
18 acentuada (em média 1,5 e 1,7 vezes maior com NO_3^- , respectivamente) (Tabela 4). As mudas
19 de *P. parviflora* apresentaram diferença na massa seca da parte aérea (1,5 vezes maior com
20 NO_3^- em relação ao NH_4^+), mas não na raiz. Ainda, não se observou diferença entre as fontes
21 de N quanto à massa seca da raiz e parte aérea em *C. estrellensis*.

22 Os valores de comprimento total das raízes na presença de NO_3^- em todas as
23 espécies pioneiras utilizadas nesse estudo foram pelo menos o dobro do que quando
24 submetidas ao NH_4^+ . Nas espécies não-pioneiras, apenas *C. canjerana* e *P. parviflora*
25 apresentaram diferenças significativas nesse parâmetro, ambas possuindo maiores valores sob
26 cultivo com NO_3^- . O efeito da fonte de N sobre o comprimento total das raízes foi mais
27 acentuado em *C. canjerana* (três vezes maior com NO_3^-) que em *P. parviflora* (1,3 vez maior
28 com NO_3^-).

29 Apenas *C. floribundus* e *C. estrellensis* não apresentaram efeitos da fonte de
30 N sobre o comprimento da raiz principal. Para as demais espécies, o cultivo sob NO_3^- resultou
31 em maiores comprimentos da raiz principal em relação ao cultivo com NH_4^+ , efeito que foi
32 bem mais evidente nas pioneiras (Anexo 1). Já o comprimento médio das raízes laterais foi

1 alterado pela fonte de N em *C. floribundus*, *C. pachystachya*, *T. micrantha*, *C. estrellensis* e *C.*
 2 *xanthocarpa*, sendo que apenas na primeira espécie se observaram valores maiores no cultivo
 3 com NH_4^+ , contrastando com as demais, em que os maiores valores foram observados no
 4 cultivo com NO_3^- . Semelhantemente, o número de raízes laterais foi menor sob cultivo com
 5 NO_3^- apenas em *C. estrellensis*, sendo três vezes menor em comparação ao valor das mudas
 6 cultivadas com NH_4^+ . Já as espécies *C. floribundus*, *S. terebinthifolius*, *S. mauritianum*, *C.*
 7 *canjerana* e *P. parviflora* apresentaram maior quantidade de raízes laterais quando
 8 submetidas ao NO_3^- . *Cecropia pachystachya*, *T. micrantha*, *C. xanthocarpa* e *G. kunthiana*
 9 não apresentaram alteração significativa nesse parâmetro.

10 Somente *C. estrellensis* apresentou menor diâmetro das raízes finas sob
 11 cultivo em NO_3^- , resultado contrastante com *C. pachystachya*, *T. micrantha* e *C. canjerana*,
 12 em que o NO_3^- induziu o aumento desse parâmetro. As demais espécies utilizadas não
 13 apresentaram diferença significativa nesse parâmetro.

14 Considerando as espécies pioneiras utilizadas nesse estudo, só se observou
 15 efeito da fonte de N na incidência de pelos absorventes em *C. pachystachya*, com valores
 16 maiores sob cultivo com NO_3^- . Do mesmo modo, *C. canjerana* foi a única espécie não-
 17 pioneira que apresentou maior incidência de pelos na presença de NO_3^- . Em contraste, em *C.*
 18 *estrellensis* e *P. parviflora*, a incidência de pelos foi menor sob NO_3^- em comparação ao
 19 cultivo com NH_4^+ , enquanto esse parâmetro não foi afetado pela fonte de N em *C.*
 20 *xanthocarpa* e *G. kunthiana*.

21 Apenas *G. kunthiana* e *S. mauritianum* não apresentaram diferenças
 22 significativas no comprimento dos pelos absorventes. *Schinus terebinthifolius*, *C.*
 23 *xanthocarpa* e *P. parviflora* apresentaram menores valores nesse parâmetro quando
 24 submetidas ao NO_3^- , sendo que a primeira e a última tiveram valores cerca de dez vezes
 25 menores em comparação ao cultivo com NH_4^+ . Já as demais espécies, tanto pioneiras quanto
 26 não-pioneiras, tiveram maiores comprimentos do pelo no cultivo com NO_3^- em comparação
 27 ao cultivo com NH_4^+ .

28 Após a análise univariada dos dados, foi realizada uma ACP para verificar o
 29 agrupamento das espécies utilizadas no Experimento 1, sob cultivo com NO_3^- e NH_4^+ (Fig. 3).
 30 Além disso, os dados foram submetidos a uma PERMANOVA para verificar se o efeito da
 31 fonte de N sobre os dados morfológicos foi significativo para cada espécie utilizada (Tabela
 32 5). A massa seca da parte aérea, o comprimento médio das raízes laterais e o comprimento
 33 dos pelos absorventes foram excluídos dessas análises por apresentarem valores muito baixos
 34 de *loading* na ACP, contribuindo pouco para a explicação da variância.

1 Os eixos x (CP1) e y (CP2) explicaram 56,3% e 25,4% respectivamente da
2 variância, demonstrando uma maior importância do eixo x na explicação dos dados. Os
3 vetores das variáveis comprimento da raiz principal, comprimento total de raiz, incidência de
4 pelos absorventes, massa seca da raiz e número de raízes laterais se localizaram na parte
5 positiva do eixo x. As espécies pioneiras cultivadas sob NO_3^- se relacionaram positivamente
6 com essas variáveis, indicando um bom desempenho sob esse cultivo. Já as espécies desse
7 mesmo grupo quando submetidas ao NH_4^+ se relacionaram negativamente em relação a essas
8 variáveis ao longo do eixo x.

9 No grupo das não-pioneiras, observou-se grande variação nas respostas das
10 espécies. *Cabralea canjerana* apresentou relação positiva com o diâmetro das raízes finas no
11 eixo y, principalmente no cultivo sob NH_4^+ . Nessa espécie, também houve uma clara
12 separação entre os tratamentos com NO_3^- e NH_4^+ ao longo do eixo x, estando o NO_3^- mais
13 relacionado positivamente com as variáveis de crescimento. Em *P. parviflora* e *C. estrellensis*,
14 se observou separação entre os tratamentos apenas no eixo y. Já *G. kunthiana* e *C.*
15 *xanthocarpa* apresentaram pouca separação entre as fontes de N em ambos os eixos.

16 A PERMANOVA indicou um efeito significativo das fontes de N sobre a
17 morfologia das raízes de todas as espécies pioneiras. Entre as não-pioneiras, a diferença entre
18 os tratamentos foi significativa apenas em *C. canjerana* e *C. estrellensis*.

1 **Tabela 3** – Parâmetros morfológicos de mudas de espécies pioneiras - *Cf* (*Croton floribundus*), *Cp* (*Cecropia pachystachya*), *Sm* (*Solanum*
 2 *mauritanum*), *St* (*Schinus terebinthifolius*) e *Tm* (*Trema micrantha*) - submetidas ao cultivo hidropônico com nitrato (NO₃⁻) ou amônio (NH₄⁺),
 3 assim como uma razão entre as médias dos cultivos de NO₃⁻ e NH₄⁺. Os valores correspondem a média ± erros-padrão. Asteriscos indicam
 4 diferenças significativas entre os tratamentos, para cada espécie, pelo teste F (ANOVA; *p* < 0,05). O número dentro dos parênteses corresponde
 5 ao n de cada tratamento em cada espécie.

Parâmetros	Fonte de N	<i>Cf</i> (5)	<i>Cp</i> (5)	<i>Sm</i> (7)	<i>St</i> (7)	<i>Tm</i> (7)
Massa seca da parte aérea (mg)	NO ₃ ⁻	620 ± 10,0	30,0 ± 1,50	200 ± 4,14	1670 ± 170	680 ± 70,0
	NH ₄ ⁺	180 ± 3,50 *	10,0 ± 0,105 *	30,0 ± 1,00 *	690 ± 90,0 *	310 ± 60,0 *
	NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺	3,44	3,00	6,67	2,42	2,19
Massa seca da raiz (mg)	NO ₃ ⁻	240 ± 10,0	10,2 ± 1,55	40,2 ± 10,3	250 ± 30,0	160 ± 30,0
	NH ₄ ⁺	60,0 ± 10,1 *	5,30 ± 1,25 *	10,1 ± 1,10 *	110 ± 10,0 *	50,1 ± 10,0 *
	NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺	4,00	1,92	3,98	2,27	3,19
Comprimento total da raiz (m)	NO ₃ ⁻	15,8 ± 1,92	34,2 ± 6,62	9,72 ± 3,40	41,9 ± 4,41	1,60 ± 0,203
	NH ₄ ⁺	3,50 ± 0,300 *	15,0 ± 1,91 *	0,921 ± 0,605 *	10,2 ± 1,10 *	0,705 ± 0,200 *
	NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺	4,51	2,28	10,5	4,11	2,27
Comprimento da raiz principal (cm)	NO ₃ ⁻	26,1 ± 5,31	28,7 ± 2,11	19,6 ± 3,25	40,7 ± 6,10	6,32 ± 0,655
	NH ₄ ⁺	13,6 ± 2,66	4,12 ± 0,425 *	10,8 ± 1,60 *	14,2 ± 0,702 *	4,55 ± 0,500 *
	NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺	1,92	6,97	1,81	2,87	1,39
Comprimento médio das raízes laterais (cm)	NO ₃ ⁻	3,91 ± 0,305	4,40 ± 0,510	1,32 ± 0,101	3,40 ± 0,350	4,20 ± 0,510
	NH ₄ ⁺	5,40 ± 0,501 *	2,72 ± 0,202 *	1,05 ± 0,255	2,80 ± 0,150	1,70 ± 0,330 *
	NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺	0,724	1,62	1,26	1,21	2,47
Número de raízes laterais	NO ₃ ⁻	407 ± 38,0	776 ± 119	668 ± 191	1306 ± 213	40,0 ± 10,7
	NH ₄ ⁺	64,0 ± 3,05 *	589 ± 119	105 ± 30,0 *	364 ± 37,0 *	33,9 ± 4,75
	NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺	6,36	1,32	6,36	3,59	1,18
Diâmetro das raízes finas (µm)	NO ₃ ⁻	500 ± 20,0	200 ± 20,0	300 ± 100	200 ± 20,0	200 ± 30,0
	NH ₄ ⁺	600 ± 10,0 *	300 ± 30,0 *	300 ± 10,0	200 ± 100	300 ± 50,0 *
	NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺	0,833	0,667	1,00	1,00	0,667
Incidência de pelos absorventes (%)	NO ₃ ⁻	56,5 ± 9,95	56,5 ± 1,95	56,5 ± 1,95	64,4 ± 1,95	47,9 ± 1,02
	NH ₄ ⁺	64,4 ± 0,922	47,9 ± 1,95 *	56,5 ± 1,95	56,5 ± 1,95	47,9 ± 0,925

	NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺	0,877	1,18	1,00	1,14	1,00
Comprimento do pelo absorvente (µm)	NO ₃ ⁻	234 ± 17,5	61,5 ± 0,335	125 ± 15,0	36,1 ± 1,80	63,0 ± 1,70
	NH ₄ ⁺	86,0 ± 12,3 *	51,1 ± 0,100 *	159 ± 19,0	249 ± 15,4 *	52,0 ± 1,30*
	NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺	2,72	1,2	0,786	0,147	1,21

1 **Fonte:** O próprio autor

2 **Tabela 4** – Parâmetros morfológicos de mudas de espécies não-pioneiras - *Cc* (*Cabralea canjerana*), *Ce* (*Cariniana estrellensis*), *Cx*
3 (*Campomanesia xanthocarpa*), *Gk* (*Guarea kunthiana*), *Pp* (*Poecilanthe parviflora*) - submetidas ao cultivo hidropônico com nitrato (NO₃⁻) ou
4 amônio (NH₄⁺), assim como uma razão entre as médias dos cultivos de NO₃⁻ e NH₄⁺. Os valores correspondem a média ± erros-padrão.
5 Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos, para cada espécie, pelo teste F (ANOVA; *p* < 0,05). O número dentro dos
6 parênteses corresponde ao n de cada tratamento em cada espécie.

Parâmetros	Fonte de N	<i>Cc</i> (8)	<i>Ce</i> (5)	<i>Cx</i> (7)	<i>Gk</i> (6)	<i>Pp</i> (4)
Massa seca da parte aérea (mg)	NO ₃ ⁻	400 ± 40,0	320 ± 40,0	200 ± 20,0	400 ± 10,0	800 ± 180
	NH ₄ ⁺	240 ± 20,0 *	310 ± 40,5	120 ± 10,0 *	340 ± 10,0 *	540 ± 140 *
	NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺	1,66	1,03	1,66	1,17	1,48
Massa seca da raiz (mg)	NO ₃ ⁻	75,2 ± 10,0	100 ± 30,5	20,5 ± 1,50	60,1 ± 1,05	280 ± 70,5
	NH ₄ ⁺	50,5 ± 10,0 *	100 ± 10,5	10,0 ± 5,20 *	40,2 ± 3,02 *	230 ± 60,2
	NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺	1,49	1,00	2,05	1,49	1,22
Comprimento total da raiz (m)	NO ₃ ⁻	1,55 ± 0,200	5,65 ± 1,50	5,15 ± 0,700	2,12 ± 0,450	9,85 ± 2,10
	NH ₄ ⁺	0,55 ± 0,800 *	5,00 ± 0,800	4,55 ± 0,600	1,90 ± 0,450	7,44 ± 2,30 *
	NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺	2,82	1,13	1,13	1,12	1,32
Comprimento da raiz principal (cm)	NO ₃ ⁻	13,9 ± 0,725	29,2 ± 1,50	12,4 ± 0,602	11,7 ± 0,650	35,7 ± 2,30
	NH ₄ ⁺	6,30 ± 0,950 *	25,7 ± 1,40	7,72 ± 1,00 *	9,6 ± 0,700 *	24,8 ± 2,05 *
	NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺	2,21	1,14	1,61	1,22	1,44
Comprimento médio das raízes laterais (cm)	NO ₃ ⁻	2,15 ± 0,305	1,32 ± 0,105	2,74 ± 0,205	3,35 ± 0,950	0,950 ± 0,150
	NH ₄ ⁺	1,60 ± 0,450	0,502 ± 0,105 *	1,85 ± 0,080 *	1,93 ± 0,250	1,01 ± 0,035
	NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺	1,34	2,63	1,48	1,74	0,941
Número de raízes laterais	NO ₃ ⁻	69,5 ± 12,2	396 ± 79,0	208 ± 43,0	70,9 ± 19,9	1029 ± 291
	NH ₄ ⁺	38,9 ± 6,60 *	969 ± 199 *	242 ± 32,0	87,4 ± 17,6	687 ± 194 *
	NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺	1,79	0,410	0,860	0,811	1,49

Diâmetro das raízes finas (μm)	NO_3^-	$600 \pm 10,0$	$400 \pm 20,0$	200 ± 100	$400 \pm 10,0$	$400 \pm 10,5$
	NH_4^+	$800 \pm 10,0 *$	$300 \pm 20,0 *$	$200 \pm 10,0$	$400 \pm 10,5$	$500 \pm 20,4$
	$\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$	0,750	1,33	1,00	1,00	0,800
Incidência de pelos absorventes (%)	NO_3^-	$38,9 \pm 0,942$	$47,9 \pm 0,911$	$56,5 \pm 4,90$	$38,9 \pm 1,90$	$47,9 \pm 0,902$
	NH_4^+	$19,9 \pm 1,91 *$	$56,5 \pm 0,910 *$	$56,5 \pm 1,90$	$38,9 \pm 2,90$	$64,4 \pm 1,90 *$
	$\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$	1,95	0,85	1,00	1,00	0,744
Comprimento do pelo absorvente (μm)	NO_3^-	$89,2 \pm 3,95$	$748 \pm 54,0$	$116 \pm 3,25$	$84,3 \pm 1,55$	$66,5 \pm 1,90$
	NH_4^+	$23,5 \pm 0,325 *$	$242 \pm 31,0 *$	$144 \pm 5,50 *$	$82,1 \pm 1,50$	$585,2 \pm 38,7 *$
	$\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$	3,79	3,09	0,806	1,00	0,114

1 **Fonte:** O próprio autor

2

- 1 **Tabela 5** – Valores de p e F da PERMANOVA de um fator comparando os parâmetros morfológicos das mudas sob cultivo com nitrato ou
 2 amônio para cada uma das espécies: *Cf* (*Croton floribundus*), *Cp* (*Cecropia pachystachya*), *Sm* (*Solanum mauritianum*), *St* (*Schinus*
 3 *terebinthifolius*), *Tm* (*Trema micrantha*) – pioneiras, e *Cc* (*Cabrlea canjerana*), *Ce* (*Cariniana estrellensis*), *Cx* (*Campomanesia xanthocarpa*),
 4 *Gk* (*Guarea kunthiana*) e *Pp* (*Poecilanthe parviflora*). O asterisco indica efeito significativo da fonte de nitrogênio ($p < 0,05$).

Grupo	Espécie	p	F
Pioneiras	<i>Cf</i>	0,0072*	13,03
	<i>Cp</i>	0,0075*	12,48
	<i>Sm</i>	0,0044*	6,097
	<i>St</i>	0,0013*	32,04
	<i>Tm</i>	0,0416*	4,045
Não-Pioneiras	<i>Cc</i>	0,0001*	51,18
	<i>Ce</i>	0,0158*	4,124
	<i>Cx</i>	0,2205	1,512
	<i>Gk</i>	0,1218	2,261
	<i>Pp</i>	0,2883	1,672

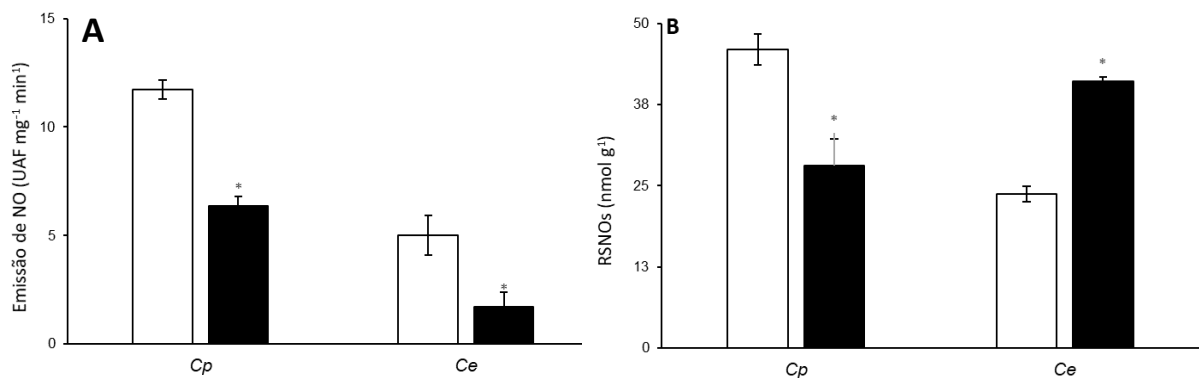
- 5 **Fonte:** O próprio autor

2.7.2 Efeito da Fonte de N Sobre os Níveis de NO, RSNOs e Marcadores de Estresse Oxidativo

Para avaliar o efeito da fonte de N sobre a produção de NO pelas raízes, foram escolhidas uma espécie pioneira (*C. pachystachya*) e uma espécie não-pioneira (*C. estrellensis*) baseado no teste de PERMANOVA, utilizando espécies que apresentaram diferença significativa e com características distintas (em relação à morfologia no cultivo sob NO_3^- ou NH_4^+). Em ambas as espécies, a emissão de NO pelas raízes foi maior em mudas cultivadas com NO_3^- em comparação às cultivadas com NH_4^+ (Gráfico 1A). Também foram quantificados os níveis radiciais de RSNOs (Gráfico 1B), que são compostos derivados do NO a partir de reações de S-nitrosação. Coerente com a emissão de NO, observaram-se em *C. pachystachya* maiores níveis de RSNOs nas mudas cultivadas com NO_3^- . Por outro lado, em raízes de *C. estrellensis*, os níveis de RSNOs foram menores sob NO_3^- em comparação às mudas cultivadas com NH_4^+ .

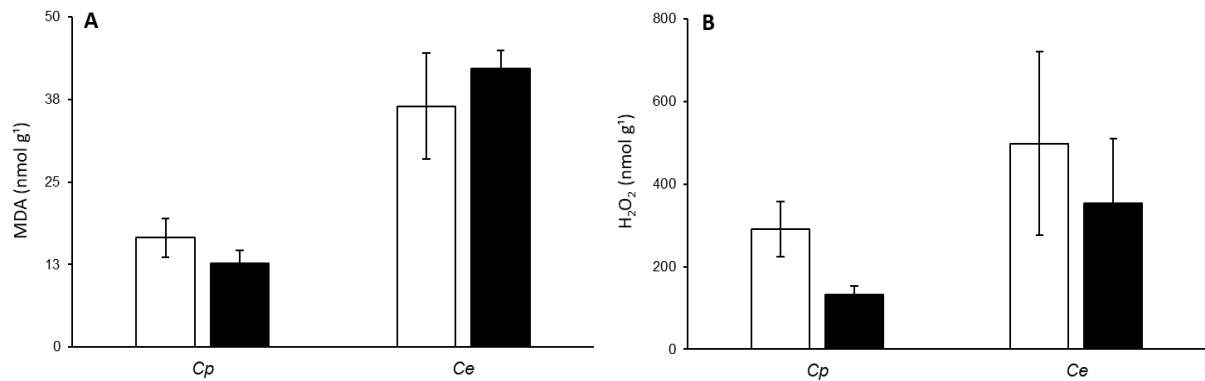
Quantificaram-se ainda os níveis de MDA (Gráfico 2A) e H_2O_2 (Gráfico 2B). Porém, nenhuma diferença significativa nesses parâmetros foi encontrada entre os tratamentos em ambas as espécies.

Gráfico 1 – Emissão de NO (A) e quantidade de S-nitrosotiois (RSNOs) (B) em raízes de mudas de *Cp* (*Cecropia pachystachya*) e *Ce* (*Cariniana estrellensis*) cultivadas em NO_3^- (barras brancas) ou NH_4^+ (barras pretas). Os dados correspondem às médias \pm erros-padrão ($n = 4$). Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos, para cada espécie, pelo teste F (ANOVA; $p < 0,05$)



Fonte: O próprio autor

Gráfico 2 – Níveis de malondialdeído (MDA) (A) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (B) em raízes de mudas de *Cp* (*Cecropia pachystachya*) e *Ce* (*Cariniana estrellensis*) cultivadas em NO₃⁻ (barras brancas) ou NH₄⁺ (barras pretas). Os dados correspondem a média ± erro-padrão (n = 4). Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos, para cada espécie, pelo teste F (ANOVA; p < 0,05).



Fonte: O próprio autor

2.7.3 Efeito do Tratamento com Doador de NO Sobre a Morfologia das Raízes de Plantas Cultivadas com NH₄⁺

Uma vez que raízes de plantas cultivadas com NH₄⁺ apresentaram menor emissão de NO, verificou-se se o tratamento com doador de NO (GSNO) resultaria em alterações nos parâmetros morfológicos das raízes de forma a se aproximarem das plantas cultivadas com NO₃⁻ (Tabela 6).

A aplicação do doador de NO na menor concentração (10 μM) aumentou a massa seca da raiz e da parte aérea na espécie pioneira em comparação ao controle, sendo que esse efeito não foi induzido pela maior concentração (100 μM). Em *C. estrellensis*, nenhuma alteração da massa seca da raiz e da parte aérea foi observada nas duas concentrações de GSNO em comparação ao controle.

Em ambas as espécies, não se observaram alterações no comprimento da raiz principal e no comprimento médio das raízes laterais induzidas pelo tratamento com GSNO em comparação ao controle (Anexo 2). Por outro lado, o tratamento com 10 μM de GSNO levou ao aumento do comprimento total das raízes de *C. estrellensis* em relação ao controle, mas não afetou esse parâmetro em *C. pachystachya*. Quando GSNO foi aplicada a 100 μM, o comprimento total das raízes e o número de raízes laterais da espécie pioneira foram afetados negativamente, enquanto não houve efeitos sobre esses parâmetros em *C. estrellensis*.

A aplicação de 10 μM do doador de NO não afetou o diâmetro das raízes finas em *C. pachystachya*, ao passo que o mesmo tratamento levou a um aumento desse

1 parâmetro em *C. estrellensis*. Além disso, a aplicação de 100 μ M do doador de NO reduziu o
2 diâmetro das raízes finas em ambas as espécies em comparação ao grupo controle.

3 Em *C. pachystachya*, a aplicação do doador de NO não alterou a incidência
4 de pelos absorventes em comparação ao controle, mas induziu um aumento do comprimento
5 dessas estruturas, mais acentuado na maior concentração de GSNO. Em contrapartida, em *C.*
6 *estrellensis*, tanto a incidência quanto o comprimento de pelos absorventes foram reduzidos
7 pelo tratamento com 100 μ M de GSNO, ao passo que a menor concentração do doador de NO
8 afetou negativamente apenas o comprimento, em intensidade menor que o tratamento com
9 100 μ M.

- 1 **Tabela 6** – Parâmetros morfológicos de mudas de *Cp* (*Cecropia pachystachya*) e *Ce* (*Cariniana estrellensis*) cultivadas com NH_4^+ como fonte de
 2 nitrogênio e suplementadas com S-nitrosoglutationa (GSNO) nas concentrações de 10 e 100 μM . O tratamento controle não recebeu a adição de
 3 GSNO. Os valores correspondem às médias \pm erros-padrão (n = 8). Para cada parâmetro, letras iguais indicam valores que não se diferenciam
 4 dentro da espécie de acordo com ANOVA seguida de teste de Fisher (p <0,05).

Parâmetros	Tratamento	<i>Cp</i>	<i>Ce</i>
Massa seca da parte aérea (mg)	Controle	39,2 \pm 10,0 b	150 \pm 30,0 a
	10 μM GSNO	61,5 \pm 6,05 a	160 \pm 20,0 a
	100 μM GSNO	55,3 \pm 3,23 ab	170 \pm 20,0 a
Massa seca da raiz (mg)	Controle	20,5 \pm 3,00 b	70,0 \pm 15,0 a
	10 μM GSNO	40,2 \pm 4,50 a	60,0 \pm 8,20 a
	100 μM GSNO	30,3 \pm 5,20 ab	50,0 \pm 6,30 a
Comprimento total das raízes (m)	Controle	3,45 \pm 0,205 a	1,25 \pm 0,230 b
	10 μM GSNO	3,72 \pm 0,320 a	1,90 \pm 0,200 a
	100 μM GSNO	1,10 \pm 0,202 b	1,63 \pm 0,125 ab
Comprimento da raiz principal (cm)	Controle	13,6 \pm 2,03 a	15,8 \pm 2,23 a
	10 μM GSNO	14,4 \pm 1,90 a	15,2 \pm 2,35 a
	100 μM GSNO	10,6 \pm 0,925 a	10,7 \pm 1,90 a
Comprimento médio das raízes laterais (cm)	Controle	0,705 \pm 0,020 a	0,680 \pm 0,120 a
	10 μM GSNO	0,676 \pm 0,035 a	0,767 \pm 0,065 a
	100 μM GSNO	0,770 \pm 0,072 a	0,710 \pm 0,055 a
Número de raízes laterais	Controle	493 \pm 35,0 a	186 \pm 34,5 a
	10 μM GSNO	602 \pm 51,0 a	250 \pm 40,5 a
	100 μM GSNO	154 \pm 24,0 b	218 \pm 14,0 a
Diâmetro das raízes finas (μm)	Controle	500 \pm 20,0 a	600 \pm 20,2 b
	10 μM GSNO	400 \pm 40,0 ab	700 \pm 60,0 a
	100 μM GSNO	300 \pm 40,0 b	500 \pm 20,5 c
Incidência de pelos absorventes (%)	Controle	61,0 \pm 1,92 a	56,5 \pm 0,950 a
	10 μM GSNO	61,0 \pm 1,92 a	56,5 \pm 0,950 a
	100 μM GSNO	62,0 \pm 1,92 a	38,9 \pm 0,900 b
Comprimento do pelo absorvente (μm)	Controle	88,3 \pm 2,88 c	94,7 \pm 4,23 a

10 μ M GSNO	112,8 \pm 5,64 b	79,0 \pm 5,75 b
100 μ M GSNO	144,0 \pm 8,71 a	67,1 \pm 3,50 c

1 **Fonte:** O próprio autor

1 2.7.4 Efeito do Tratamento com Sequestrador de NO Sobre a Morfologia de Raízes de
2 Plantas Cultivadas com NO_3^-

3 Uma vez que plantas cultivadas com NO_3^- apresentaram maior emissão de
4 NO, verificou-se se o tratamento com sequestrador de NO (PTIO) resultaria em alterações nos
5 parâmetros morfológicos das raízes de forma a eles se aproximarem aos das plantas cultivadas
6 com NH_4^+ (Tabela 7).

7 A aplicação do sequestrador de NO provocou maior massa seca da parte
8 aérea em *C. pachystachya*, além de levar à maior incidência de pelos e maior diâmetro das
9 raízes finas nessa mesma espécie em comparação ao grupo controle (Anexo 3). Todavia, o
10 tratamento com PTIO resultou em uma redução do comprimento dos pelos absorventes de *C.*
11 *pachystachya*. Os demais parâmetros analisados não foram alterados pela presença do PTIO
12 em comparação ao grupo controle nessa espécie.

13 Em *C. estrellensis*, o sequestrador de NO levou a uma diminuição da massa
14 seca da parte aérea e do comprimento total das raízes.

- 1 **Tabela 7** – Parâmetros morfológicos de mudas de *Cp* (*Cecropia pachystachya*) e *Ce* (*Cariniana estrellensis*) cultivadas com NO_3^- e tratadas com
 2 o sequestrador de NO PTIO na concentração de 1 μM . O tratamento controle não recebeu a adição de PTIO. Os valores correspondem às médias
 3 \pm erros-padrão (n = 6). Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos, para cada espécie, pelo teste F (ANOVA; $p < 0,05$).

Parâmetros	Tratamento	<i>Cp</i>	<i>Ce</i>
Massa seca da parte aérea (mg)	Controle	200 \pm 20,0	340 \pm 50,0
	PTIO	400 \pm 60,0 *	170 \pm 20,0 *
Massa seca da raiz (mg)	Controle	140 \pm 30,0	200 \pm 30,0
	PTIO	110 \pm 10,5	200 \pm 60,0
Comprimento total das raízes (m)	Controle	6,60 \pm 1,90	4,02 \pm 0,700
	PTIO	9,02 \pm 0,640	1,94 \pm 0,505 *
Comprimento da raiz principal (cm)	Controle	21,8 \pm 2,85	16,0 \pm 0,921
	PTIO	20,0 \pm 0,502	19,2 \pm 2,10
Comprimento médio das raízes laterais (cm)	Controle	1,44 \pm 0,450	1,72 \pm 0,355
	PTIO	1,35 \pm 0,250	1,25 \pm 0,250
Número de raízes laterais	Controle	461 \pm 70,0	180 \pm 27,0
	PTIO	711 \pm 99,4	151 \pm 25,0
Diâmetro das raízes finas (μm)	Controle	400 \pm 10,2	600 \pm 20,0
	PTIO	500 \pm 30,1 *	500 \pm 50,0
Incidência de pelos absorventes (%)	Controle	19,9 \pm 0,902	19,9 \pm 1,92
	PTIO	29,6 \pm 0,900 *	29,6 \pm 2,93
Comprimento do pelo absorvente (μm)	Controle	107 \pm 4,12	57,5 \pm 9,20
	PTIO	87,0 \pm 2,01 *	80,0 \pm 7,90

- 4 **Fonte:** O próprio autor

1 2.8 DISCUSSÃO

2 2.8.1 Efeitos da fonte de N sobre a morfologia da raiz

3 É bem estabelecido na literatura que espécies pioneiras apresentam preferência
4 por NO_3^- , apresentando melhor desempenho quando suplementadas com esse íon (AIDAR *et*
5 *al.*, 2003; BRITTO; KRONZUCKER, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2017; DEBIASI *et al.*, 2019).
6 No presente estudo, observaram-se massas secas de parte aérea e raiz e comprimento total das
7 raízes maiores em mudas de todas as espécies pioneiras cultivadas com NO_3^- , ratificando a
8 preferência por esse íon. A alta plasticidade em relação a utilização de ambas as fontes de N
9 em espécies não-pioneiras se dá tanto em espécies de dossel como espécies de sub-bosque
10 (DEBIASI *et al.*, 2019). Ainda, determinadas espécies desse grupo apresentam melhor
11 desempenho na utilização do NH_4^+ (BOUDSOCQ *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2017;
12 DEBIASI *et al.*, 2019), o que foi confirmado no presente estudo. A assimilação desse
13 composto requer menor gasto energético que NO_3^- , de forma que em ambientes onde a
14 energia luminosa é um recurso limitante, a assimilação de NH_4^+ pode ser evolutivamente
15 vantajosa (BARKER; PILBEAM, 2015). Dessa forma, a utilização de NH_4^+ em espécies não-
16 pioneiras pode ser um mecanismo adaptativo associado à ocupação de ambientes sombreados,
17 como o sub-bosque de florestas tropicais (OLIVEIRA *et al.*, 2017; DEBIASI *et al.*, 2019).

18 Interessantemente, observou-se que a espécie não-pioneira *C. canjerana*
19 apresentou maior preferência ao NO_3^- . Essa espécie possui capacidade relativamente alta de
20 ocupar ambientes de sol pleno, apresentando algumas características ecofisiológicas
21 semelhantes ao de espécies pioneiras, justificando assim seu comportamento em função das
22 diferentes fontes de N (SOUSA-SILVA *et al.*, 1999; ZIMMERMANN *et al.*, 2019).

23 Não se pode relacionar o desempenho inferior de *C. canjerana* e das espécies
24 pioneiras no cultivo sob NH_4^+ a uma condição de deficiência de N, já que espécies de ambos
25 os grupos sucessionais apresentam elevada capacidade de assimilação desse cátion, com
26 elevada produção de aminoácidos (DEBIASI *et al.*, 2019). Todavia, o cultivo sob NH_4^+ pode
27 aumentar a acidificação do meio externo e causar interferência negativa na absorção de outros
28 cátions, elevação na produção de etileno, indução de estresse oxidativo, clorose foliar e
29 redução das taxas de crescimento, prejudicando assim o desenvolvimento de algumas espécies
30 vegetais (GARNICA *et al.*, 2009; BRITTO; KRONZUCKER, 2013; BITTSÁNSZKY *et al.*,
31 2015; MARINO; MORAN, 2019). No presente estudo, não foi possível associar o cultivo
32 com NH_4^+ à indução de estresse oxidativo na espécie em que isso foi avaliado (*C.*
33 *pachystachya*). Além disso, houve controle do pH da solução nutritiva, prevenindo os efeitos

1 da acidificação induzida pelo NH_4^+ . Apesar da clara redução de crescimento, os sintomas de
2 toxicidade do NH_4^+ (como clorose foliar) foram pouco expressivos na maioria das espécies
3 pioneiras e em *C. canjerana*.

4 Liu e von Wirén (2017) propuseram que o NH_4^+ promove maior ramificação
5 das raízes em espécies vegetais, como cevada (*Hordeum vulgare*) e *A. thaliana*, resultado que
6 foi observado no presente estudo apenas para *C. estrellensis*. Pelo contrário, em todas as
7 espécies pioneiras, bem como em *C. canjerana* e *P. parviflora*, o cultivo com NO_3^- foi o que
8 elevou o número de raízes laterais. Além disso, é conhecido que níveis baixos a moderados de
9 NO_3^- podem induzir a iniciação de raízes laterais (SUN; YU; HU, 2017), o que pode ter
10 ocorrido em espécies que apresentam elevada demanda por essa fonte de N, como é o caso
11 das pioneiras (OLIVEIRA *et al.*, 2017; DEBIASI *et al.*, 2019). O NO_3^- também é capaz de
12 induzir o alongamento das raízes laterais (SUN; YU; HU, 2017), o que está de acordo com o
13 maior comprimento médio das raízes laterais de mudas de *C. pachystachya*, *T. micranta*, *C.*
14 *estrellensis* e *C. xanthocarpa* cultivadas com NO_3^- em relação ao cultivo sob NH_4^+ .

15 Em grande parte das espécies avaliadas, foram observados maiores
16 comprimentos da raiz principal quando cultivadas com NO_3^- . Um resultado semelhante foi
17 observado por Liu *et al.* (2013) utilizando *A. thaliana*, o qual foi associado à repressão da
18 proliferação das células no meristema apical das raízes no cultivo com NH_4^+ . No presente
19 estudo, observaram-se diferenças acentuadas entre os tratamentos para esse parâmetro
20 principalmente nas espécies pioneiras, o que pode estar associado à maior preferência por
21 NO_3^- , além do efeito repressor do NH_4^+ descrito por Liu *et al.* (2013).

22 É interessante ainda ressaltar que, enquanto o NH_4^+ inibe o alongamento da
23 raiz principal, o NO_3^- pode estimular esse processo (NAULIN *et al.*, 2019). Dado que o NO_3^-
24 pode ser facilmente lixiviado e atingir camadas mais profundas do solo (WANG *et al.*, 2015),
25 pode-se especular a relação desse investimento com a absorção dessa molécula. Por outro
26 lado, o NH_4^+ tende a permanecer mais retido nas camadas mais superiores do solo (MIAN;
27 RIAZ; CRESSER, 2009), especula-se então que a inibição do alongamento da raiz principal e
28 a formação de raízes laterais poderia favorecer sua absorção.

29 Além de exercer grande influência na morfologia das raízes de maior
30 diâmetro, as diferentes fontes de N afetaram as raízes finas e os pelos absorventes das
31 espécies avaliadas. Observou-se que espécies com preferência por NO_3^- apresentaram
32 menores diâmetros das raízes finas nesse cultivo, o que maximizaria a absorção desse
33 composto, pois o diâmetro da raiz é contrariamente relacionado à taxa de absorção (WU;

1 PAGÈS; WU, 2016). Isso foi claramente observado em *C. canjerana*, *C. floribundus*, *C.*
2 *pachystachya* e *T. micrantha*.

3 Analogamente, uma relação entre a demanda por NO_3^- e o investimento em
4 pelos absorventes em resposta à fonte de N também foi observada. Em *C. pachystachya* e *C.*
5 *canjerana*, observou-se maior incidência de pelos absorventes sob NO_3^- em comparação ao
6 cultivo com NH_4^+ , ao passo que valores menores no cultivo com NO_3^- foram observados em
7 *C. estrellensis* e *P. parviflora*. As demais espécies não alteraram a incidência de pelos
8 absorventes em resposta às diferentes fontes de N, o que pode estar relacionado ao proposto
9 por Vatter *et al.* (2015), que sugeriram a importância da concentração e não apenas da fonte
10 de N na regulação da formação de pelos. No presente estudo, foi utilizada a mesma
11 concentração das fontes de N nas soluções nutritivas.

12 Utilizando espécies herbáceas como tomate (*Solanum lycopersicum*),
13 espinafre (*Spinacea oleracea*) e colza (*Brassica napus*), Foehse e Jungk (1983) observaram
14 que a densidade e o comprimento dos pelos estão negativamente relacionados com a
15 concentração da fonte de N; porém, não se observaram alterações em relação ao NH_4^+ nesse
16 estudo. Zhu *et al.* (2016) observaram que o fornecimento de NH_4^+ em pequenas concentrações
17 pode estimular maiores comprimentos nos pelos absorventes de *A. thaliana*. Vatter *et al.*
18 (2015) observaram resultados semelhantes utilizando NO_3^- e NH_4^+ nessa mesma espécie.
19 Além disso, diferentes genótipos de *A. thaliana* apresentaram respostas distintas do
20 crescimento dos pelos absorventes em resposta às fontes de N. Com isso, possivelmente as
21 diferentes fontes de N podem modular diferentemente o alongamento do pelo de acordo com
22 a espécie.

23 Similar ao observado por Vatter *et al.* (2015) observou-se grande variação
24 nas respostas do alongamento dos pelos absorventes das diferentes espécies às fontes de N
25 considerando que a mesma dose para ambas as fontes de N foi adotada. Ainda, não se
26 observou relação com o grupo sucessional ou preferência por determinada fonte de N em
27 relação às respostas desse parâmetro. Enquanto *C. floribundus*, *C. pachystachya*, *T.*
28 *micrantha*, *C. canjerana* e *C. estrellensis* tiveram maior alongamento dos pelos estimulado
29 por NO_3^- , *S. terebinthifolius*, *C. xanthocarpa* e *P. parviflora* tiveram resultados contrários,
30 com menores valores nesse mesmo parâmetro no cultivo com NO_3^- . Além disso, *S.*
31 *mauritanum* e *G. kunthiana* não apresentaram diferenças entre os tratamentos.

32 Dessa forma, as alterações na morfologia da raiz de espécies arbóreas
33 neotropicais em resposta ao NO_3^- e NH_4^+ não são determinadas apenas pelo grupo sucessional,

1 dependendo também das características de cada espécie. Essa constatação está de acordo com
2 estudos prévios de nosso grupo, que demonstraram a importância das características
3 ecológicas específicas de cada espécie, além do grupo sucessional, no desenvolvimento das
4 estratégias de uso do N por espécies arbóreas neotropicais (OLIVEIRA *et al.*, 2017; DEBIASI
5 *et al.*, 2019).

6 A utilização de determinada fonte de N (de acordo com a preferência de
7 uma espécie) pode modular características desejáveis nas mudas com o ambiente para o qual
8 elas serão transplantadas, maximizando o seu desempenho e aumentando as taxas de sucesso
9 do reflorestamento. Ainda, espécies arbóreas nativas possuem diferentes mecanismos de
10 resposta em relação às diferentes fontes de N as quais são submetidas. As respostas
11 apresentadas pelas plantas nesse estudo não foram completamente similares às observadas na
12 literatura. Com isso, contribuímos para demonstrar que as espécies arbóreas nativas não
13 seguem o mesmo padrão observado nas espécies cultivadas. Sendo assim, mais estudos
14 utilizando espécies arbóreas nativas do Brasil são importantes para melhor elucidação desses
15 mecanismos e melhor conhecimento da ecofisiologia dessas espécies.

16 2.8.2 Efeitos do NO sobre a morfologia da raiz

17 Após obtidos os dados do primeiro experimento, utilizamos *C.*
18 *pachystachya* (pioneira) e *C. estrellensis* (não-pioneira) para analisar os efeitos do NO na
19 morfologia de raiz. Em ambas as espécies, a emissão de NO pelas raízes foi maior nas plantas
20 cultivadas com NO_3^- em comparação às sob NH_4^+ , o que também tem sido reportado para
21 diferentes espécies vegetais (OLIVEIRA; FRESCHI; SODEK, 2013; ALBER; SIVANESAN;
22 VANLERBERGHE, 2017). Plantas cultivadas em NO_3^- apresentam maior produção de NO_2^- ,
23 principal substrato para a formação de NO nos tecidos vegetais (OLIVEIRA; FRESCHI;
24 SODEK, 2013).

25 Em raízes de *C. pachystachya*, a maior emissão de NO no cultivo sob NO_3^-
26 resultou em maiores níveis de RSNOs, que são ERNs com importante papel na sinalização e
27 na homeostase do NO (BRONIOWSKA; DIERS; HOGG, 2013). Por outro lado, em *C.*
28 *estrellensis*, menores níveis de RSNOs foram detectados em raízes de plantas cultivadas com
29 NO_3^- em comparação ao NH_4^+ , sugerindo alterações nas estratégias de manutenção da
30 homeostase do NO. Por exemplo, é possível que a maior formação de NO na presença de
31 NO_3^- tenha favorecido a expressão da enzima GSNOR nessa espécie, reduzindo os níveis de
32 RSNOs nessa condição (MALIK *et al.*, 2011; LETERRIER *et al.*, 2011). Com isso, pode-se

1 sugerir que RSNOs não são bons indicadores de biodisponibilidade de NO na espécie não-
2 pioneira.

3 O cultivo com NH_4^+ , em especial de espécies com preferência por NO_3^- ,
4 pode estimular sintomas de toxicidade (BRITTO; KRONZUCKER, 2013). No presente
5 estudo, observou-se que a espécie *C. pachystachya* apresenta elevada preferência por NO_3^- ,
6 apresentando maiores valores em diversos parâmetros sob esse cultivo em relação ao NH_4^+ . A
7 partir disso, observou-se que a aplicação da menor concentração de GSNO estimulou maiores
8 valores em massa seca da parte aérea e raiz em comparação ao controle. Coerente com esse
9 resultado, Wang *et al.* (2011) observaram que a aplicação de um doador de NO reverteu os
10 efeitos prejudiciais do NH_4^+ no crescimento da macrófita *Hydrilla verticillata*. Todavia, o
11 presente estudo consiste no primeiro a demonstrar esse efeito do NO em uma espécie arbórea
12 e mesmo em planta que vive no ambiente terrestre.

13 Apesar dos resultados benéficos na aplicação da menor concentração de
14 GSNO em *C. pachystachya*, esse efeito não foi observado sob cultivo com 100 μM desse
15 doador, já que a maioria dos parâmetros avaliados não se alterou em comparação ao controle
16 ou até mesmo foram prejudicados por esse tratamento. Esses resultados mostram a dualidade
17 dos efeitos do NO, ou seja, sob baixos níveis essa molécula atua como sinalizadora e
18 beneficia o vegetal; porém, altas concentrações desse composto podem provocar estresse
19 nitrosativo, prejudicando o crescimento e desenvolvimento do vegetal (CORPAS; BARROSO,
20 2013; SANTISREE; BHATNAGAR-MATHUR; SHARMA, 2015). Além disso, como no
21 presente estudo a solução nutritiva foi renovada frequentemente, pode-se afirmar que 100 μM
22 trata-se de uma alta concentração para essas plantas utilizadas.

23 O NO é conhecido por estimular a formação de raízes laterais (MUR *et al.*,
24 2013), o que não foi observado em *C. pachystachya*. Além disso, a não alteração do
25 comprimento da raiz principal, comprimento médio das raízes laterais e da incidência de pelos
26 absorventes sob aplicação de GSNO em comparação ao controle pode sugerir que o NO_3^-
27 estimula maiores valores nesses parâmetros por mecanismos não relacionados ao NO.
28 Possivelmente essas respostas são dadas devido à transportadores de NO_3^- regulados por NO
29 (LIU *et al.*, 2019).

30 *Cariniana estrellensis* se mostrou menos responsiva ao doador de NO em
31 relação a *C. pachystachya*, da mesma forma que se comportou ao cultivo com NO_3^- e NH_4^+ .
32 Nenhuma resposta em relação às massas secas de raiz e parte aérea, comprimento da raiz
33 principal e comprimento médio e número das raízes laterais foram observadas com a

1 aplicação de GSNO em relação ao controle nessa espécie. Com base nos resultados
2 observados nos dois experimentos, sugere-se que *C. estrellensis* possa ter mecanismos
3 compensatórios de regulação da homeostase do NO, o que disponibilizaria menores níveis de
4 RSNOs sob NO_3^- . Todavia, são necessários mais estudos para testar essa hipótese. Ainda
5 assim, a aplicação de 10 μM de GSNO estimulou o aumento do comprimento total das raízes,
6 resultado similar ao observado em arroz e *A. thaliana* (YUAN; HUANG, 2016; SUN *et al.*,
7 2018).

8 A suplementação do doador de NO levou a uma menor incidência de pelos
9 absorventes em *C. estrellensis*, similar ao observado no cultivo com NO_3^- nessa mesma
10 espécie. Do mesmo modo, a menor concentração de GSNO levou a maiores diâmetros nas
11 raízes finas nessa espécie, da mesma forma que o cultivo com NO_3^- . Com isso, sugere-se que
12 haja envolvimento do NO nessas respostas ao NO_3^- . Por outro lado, a resposta em relação ao
13 comprimento dos pelos foi destoante, sendo esse parâmetro menor com a aplicação de GSNO
14 e maior no cultivo com NO_3^- (contrário ao observado em *C. pachystachya*).

15 Para ratificar o envolvimento do NO nas respostas induzidas pelo cultivo
16 com NO_3^- , utilizou-se o tratamento com o sequestrador de NO PTIO. Porém, não foi possível
17 ver efeitos coerentes com uma possível redução dos níveis de NO para a maior parte dos
18 parâmetros analisados no presente estudo. De fato, o PTIO apresenta diversas limitações e,
19 como observado Kováčik *et al.* (2014), pode causar efeitos prejudiciais, como elevação na
20 concentração de EROs, gerando respostas não esperadas, como foi o caso do presente estudo.
21 Mesmo seu derivado menos tóxico, cPTIO, pode não refletir verdadeiramente os efeitos da
22 ausência de NO nos tecidos vegetais (PLANCHET *et al.* 2006). Ambos os sequestradores
23 geram derivados (PTI e cPTI) que podem gerar diversos efeitos colaterais nas plantas
24 (PLANCHET *et al.*, 2006; KOVÁČIK *et al.*, 2014). Desse modo, como no presente estudo
25 foram observados diversos resultados inconsistentes com a aplicação do sequestrador de NO,
26 pode-se sugerir que os efeitos observados não estão necessariamente relacionados com a
27 ausência do NO mas sim com efeitos colaterais da suplementação de PTIO.

28 Mesmo com os efeitos colaterais desse sequestrador, o efeito do PTIO no
29 diâmetro das raízes finas e no comprimento dos pelos absorventes foram contrários ao
30 observado com a aplicação de GSNO em *C. pachystachya*. Nesse caso, a retirada do NO em
31 plantas cultivadas com NO_3^- simulou resultados semelhantes aos observados com NH_4^+ .
32 Assim, pode-se propor o envolvimento do NO no controle do alongamento dos pelos
33 absorventes e da espessura de raízes finas pelo NO_3^- em *C. pachystachya*. Coerente com esse

- 1 resultado, Moro *et al.* (2017) observaram que a aplicação de GSNO pode estimular a
- 2 formação e o alongamento de pelos absorventes em *A. thaliana*, mesmo em mutantes glabros.
- 3
- 4

1 3 CONCLUSÃO

2 A partir dos resultados obtidos no presente estudo, a hipótese “As fontes de
3 N e o NO afetam a morfologia das raízes de mudas de espécies arbóreas neotropicais,
4 conforme o grupo sucessional.” deve ser parcialmente aceita. Observou-se que as espécies de
5 um mesmo grupo apresentaram algumas respostas similares às fontes de N, mas ao mesmo
6 tempo houve respostas espécie-específicas. Além disso, o cultivo com doadores e
7 sequestradores de NO mostrou resultados contrastantes entre as espécies utilizadas (uma
8 pioneira e uma não pioneira). Porém, como apenas duas espécies foram utilizadas, mais
9 estudos são necessários para verificar se as respostas observadas podem ser extrapoladas para
10 outras espécies do mesmo grupo sucessional. Além disso *C. pachystachya* mostrou
11 comportamentos mais similares aos recorrentes em outras espécies reportadas na literatura,
12 como *A. thaliana*. Por outro lado, *C. estrellensis* se mostrou altamente complexa, sendo
13 menos responsiva tanto aos tratamentos com NO_3^- e NH_4^+ , assim como os com GSNO e
14 PTIO, apresentando ainda diversas respostas inesperadas em relação aos tratamentos
15 utilizados. Por conseguinte, estudos avaliando as respostas de diferentes espécies às fontes de
16 N e o NO são essenciais para o entendimento da diversidade de mecanismos ecofisiológicos
17 desenvolvidos em florestas neotropicais e como eles são afetados pelas mudanças climáticas e
18 atividades antropogênicas.
19

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

- AIDAR, M. P. M. *et al.* Nitrogen use strategies of neotropical rainforest trees in threatened Atlantic Forest. **Plant, Cell & Environment**, v. 26, n. 3, p. 389-399, 2003.
- ALBER, N. A.; SIVANESAN, H.; VANLERBERGHE, G. C. The occurrence and control of nitric oxide generation by the plant mitochondrial electron transport chain. **Plant, Cell & Environment**, v. 40, n. 7, p. 1074-1085, 2017.
- ALEXIEVA, V. *et al.* The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 24, n. 12, p. 1337-1344, 2001.
- ANDREWS, M.; RAVEN, J. A.; LEA, P. J. Do plants need nitrate? The mechanisms by which nitrogen form affects plants. **Annals of Applied Biology**, v. 163, n. 2, p. 174-199, 2013.
- ASTIER, J.; GROSS, I.; DURNER, J. Nitric oxide production in plants: an update. **Journal of Experimental Botany**, v. 69, n. 14, p. 3401-3411, 2018.
- BARKER, A. V.; PILBEAM, D. J. **Handbook of Plant Nutrition**. CRC press, 2015.
- BASTIN, J. *et al.* The global tree restoration potential. **Science**, v. 365, n. 6448, p. 76-79, 2019.
- BITTSÁNSZKY, A. *et al.* Overcoming ammonium toxicity. **Plant Science**, v. 231, p. 184-190, 2015.
- BOUDSOCQ, S. *et al.* Plant preference for ammonium versus nitrate: a neglected determinant of ecosystem functioning? **The American Naturalist**, v. 180, n. 1, p. 60-69, 2012.
- BRITTO, D. T.; KRONZUCKER, H. J. NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. **Journal of Plant Physiology**, v. 159, n. 6, p. 567-584, 2002.
- BRITTO, D. T.; KRONZUCKER, H. J. Ecological significance and complexity of N-source preference in plants. **Annals of botany**, v. 112, n. 6, p. 957-963, 2013.
- BRONIOWSKA, K. A.; DIERS, A. R.; HOGG, N. S-nitrosoglutathione. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 5, p. 3173-3181, 2013.
- CALDEIRA, M. V. W. *et al.* Biossólido como substrato para produção de mudas de *Toona ciliata* var. *australis*. **Revista Árvore**, v. 36, n. 6, p. 1009-1017, 2012.
- CAMEJO, G.; WALLIN, B.; ENOJÄRVI, M. Analysis of oxidation and antioxidants using microtiter plates. In: **Free Radical and Antioxidant Protocols**. Humana Press, 1998. p. 377-387.
- CARVALHO, P. E. R. Espécies arbóreas brasileiras. Coleção Espécies Arbóreas Brasileiras, vol. 3. **Brasília, DF**, p. 2014.

- 1 CHAKRAVARTY, S. *et al.* Deforestation: causes, effects and control strategies. In: **Global**
2 **Perspectives on Sustainable Forest Management**. IntechOpen, 2012.
- 3 CHECHINA, M.; HAMANN, A. Choosing species for reforestation in diverse forest
4 communities: social preference versus ecological suitability. **Ecosphere**, v. 6, n. 11, p. 1-13,
5 2015.
- 6 CHEN, Y. H.; KAO, C. H. Calcium is involved in nitric oxide-and auxin-induced lateral root
7 formation in rice. **Protoplasma**, v. 249, n. 1, p. 187-195, 2012.
- 8 CLEMENTS, F.E. **Plant succession: an analysis of the development of vegetation**.
9 Carnegie Institution of Washington, 1916.
- 10 CORPAS, F. J.; BARROSO, J. B. Nitro-oxidative stress vs oxidative or nitrosative stress in
11 higher plants. **New Phytologist**, v.199, p.633-635, 2013.
- 12 CORREA-ARAGUNDE, N.; GRAZIANO, M.; LAMATTINA, L. Nitric oxide plays a central
13 role in determining lateral root development in tomato. **Planta**, v. 218, n. 6, p. 900-905, 2004.
- 14 DAVIS, A. S.; JACOBS, D. F. Quantifying root system quality of nursery seedlings and
15 relationship to outplanting performance. **New Forests**, v. 30, n. 2-3, p. 295-311, 2005.
- 16 DEBIASI, T. V. *et al.* Nitrogen metabolism of Neotropical tree seedlings with contrasting
17 ecological characteristics. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 41, n. 8, p. 131, 2019.
- 18 DECHORGNAT, J. *et al.* From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in
19 plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 4, p. 1349-1359, 2010.
- 20 DEL CASTELLO, F. *et al.* The era of nitric oxide in plant biology: Twenty years tying up
21 loose ends. **Nitric Oxide**, 2019.
- 22 ESTEBAN, R. *et al.* Both free indole-3-acetic acid and photosynthetic performance are
23 important players in the response of *Medicago truncatula* to urea and ammonium nutrition
24 under axenic conditions. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 140, 2016a.
- 25 ESTEBAN, R. *et al.* Mechanisms of ammonium toxicity and the quest for tolerance. **Plant**
26 **Science**, v. 248, p. 92-101, 2016b.
- 27 FOEHSE, D.; JUNGK, A. Influence of phosphate and nitrate supply on root hair formation of
28 rape, spinach and tomato plants. **Plant and Soil**, v. 74, n. 3, p. 359-368, 1983.
- 29 FRESCHI, L. *et al.* Nitric oxide mediates the hormonal control of Crassulacean acid
30 metabolism expression in young pineapple plants. **Plant Physiology**, v. 152, n. 4, p. 1971-
31 1985, 2010.
- 32 GARNICA, M. *et al.* Nitrate supply induces changes in polyamine content and ethylene
33 production in wheat plants grown with ammonium. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, n. 4,
34 p. 363-374, 2009.
- 35 GIAM, X. Global biodiversity loss from tropical deforestation. **Proceedings of the National**
36 **Academy of Sciences**, v. 114, n. 23, p. 5775-5777, 2017.

- 1 GRUBER, B. D. *et al.* Plasticity of the *Arabidopsis* root system under nutrient
2 deficiencies. **Plant Physiology**, v. 163, n. 1, p. 161-179, 2013.
- 3 HAWKESFORD, M. *et al.* Functions of macronutrients. In: **Marschner's Mineral Nutrition**
4 **of Higher Plants**. Academic Press, p. 135-189, 2012.
- 5 HELALI, S. M.'rah *et al.* Influence of nitrate—ammonium ratio on growth and nutrition of
6 *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Soil**, v. 336, n. 1-2, p. 65-74, 2010.
- 7 HIREL, B. *et al.* Improving nitrogen use efficiency in crops for sustainable
8 agriculture. **Sustainability**, v. 3, n. 9, p. 1452-1485, 2011.
- 9 HUANG, L. *et al.* Ammonium-induced oxidative stress on plant growth and antioxidative
10 response of duckweed (*Lemna minor* L.). **Ecological Engineering**, v. 58, p. 355-362, 2013.
- 11 IVANCHENKO, M. G.; MUDAY, G. K.; DUBROVSKY, J. G. Ethylene—auxin interactions
12 regulate lateral root initiation and emergence in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v.
13 55, n. 2, p. 335-347, 2008.
- 14 JAHNOVÁ, J.; LUHOVÁ, L.; PETŘIVALSKÝ, M. S-Nitrosoglutathione Reductase—The
15 Master Regulator of Protein S-Nitrosation in Plant NO Signaling. **Plants**, v. 8, n. 2, p. 48,
16 2019.
- 17 KELLER, L. *et al.* Sistema de blocos prensados para produção de mudas de três espécies
18 arbóreas nativas. **Revista Árvore**, v. 33, n. 2, p. 305-314, 2009.
- 19 KOLBERT, Z.; ORTEGA, L.; ERDEI, L. Involvement of nitrate reductase (NR) in osmotic
20 stress-induced NO generation of *Arabidopsis thaliana* L. roots. **Journal of Plant Physiology**,
21 v. 167, n. 1, p. 77-80, 2010.
- 22 KOVÁČIK, J., *et al.* Unexpected behavior of some nitric oxide modulators under cadmium
23 excess in plant tissue. **PLoS One**, v. 9, e91685, 2014.
- 24 KRAISER, T. *et al.* A holistic view of nitrogen acquisition in plants. **Journal of**
25 **Experimental Botany**, v. 62, n. 4, p. 1455-1466, 2011.
- 26 LE, H. D.; SMITH, C.; HERBOHN, J. What drives the success of reforestation projects in
27 tropical developing countries? The case of the Philippines. **Global Environmental Change**,
28 v. 24, p. 334-348, 2014.
- 29 LETERRIER, M. *et al.* Function of S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) in plant
30 development and under biotic/abiotic stress. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 6, p. 789-
31 793, 2011.
- 32 LI, G. *et al.* Ammonium-induced shoot ethylene production is associated with the inhibition
33 of lateral root formation in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 5, p.
34 1413-1425, 2013.
- 35 LILLO, C. Signalling cascades integrating light-enhanced nitrate metabolism. **Biochemical**
36 **Journal**, v. 415, n. 1, p. 11-19, 2008.

- 1 LIMA, J. E. *et al.* Ammonium triggers lateral root branching in *Arabidopsis* in an
2 AMMONIUM TRANSPORTER1; 3-dependent manner. **The Plant Cell**, v. 22, n. 11, p.
3 3621-3633, 2010.
- 4 LIRA-RUAN, V.; MENDIVIL, S. N.; DUBROVSKY, J. G. Heuristic aspect of the lateral
5 root initiation index: a case study of the role of nitric oxide in root branching. **Applications in**
6 **Plant Sciences**, v. 1, n. 10, p. 1300029, 2013.
- 7 LIU, B. *et al.* Nitrate regulation of lateral root and root hair development in plants. **Journal of**
8 **Experimental Botany**, 2019.
- 9 LIU, Y. *et al.* Ammonium inhibits primary root growth by reducing the length of meristem
10 and elongation zone and decreasing elemental expansion rate in the root apex in *Arabidopsis*
11 *thaliana*. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e61031, 2013.
- 12 LIU, Y.; VON WIRÉN, N. Ammonium as a signal for physiological and morphological
13 responses in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 10, p. 2581-2592, 2017.
- 14 LOMBARDO, M. C.; LAMATTINA, L. Nitric oxide is essential for vesicle formation and
15 trafficking in *Arabidopsis* root hair growth. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 13, p.
16 4875-4885, 2012.
- 17 LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas**
18 **Arbóreas do Brasil**. 2008.
- 19 LU, J. *et al.* Expression of a constitutively active nitrate reductase variant in tobacco reduces
20 tobacco-specific nitrosamine accumulation in cured leaves and cigarette smoke. **Plant**
21 **Biotechnology Journal**, v. 14, n. 7, p. 1500-1510, 2016.
- 22 MALIK, S. I. *et al.* GSNOR-mediated de-nitrosylation in the plant defence response. **Plant**
23 **Science**, v. 181, n. 5, p. 540-544, 2011.
- 24 MANOLI, A. *et al.* NO homeostasis is a key regulator of early nitrate perception and root
25 elongation in maize. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 1, p. 185-200, 2014.
- 26 MARINO, D.; MORAN, J. F. Can ammonium stress be positive for plant
27 performance?. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1103, 2019.
- 28 MENG, Z. B. *et al.* Nitric oxide is the shared signalling molecule in phosphorus-and iron-
29 deficiency-induced formation of cluster roots in white lupin (*Lupinus albus*). **Annals of**
30 **Botany**, v. 109, n. 6, p. 1055-1064, 2012.
- 31 MORAIS, W. W. C. *et al.* Influência da irrigação no crescimento de mudas de *Schinus*
32 *terebinthifolius*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 32, n. 69, p. 23, 2012.
- 33 MORO, C. F. *et al.* S-nitrosoglutathione promotes cell wall remodelling, alters the
34 transcriptional profile and induces root hair formation in the hairless root hair defective 6
35 (rhd6) mutant of *Arabidopsis thaliana*. **New Phytologist**, v. 213, n. 4, p. 1771-1786, 2017.
- 36 MUR, L. A. J, *et al.* Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of
37 knowledge. **AoB Plants**, v. 5, 2013.

- 1 NA, L. *et al.* Effect of nitrate/ammonium ratios on growth, root morphology and nutrient
2 elements uptake of watermelon (*Citrullus lanatus*) seedlings. **Journal of Plant Nutrition**, v.
3 37, n. 11, p. 1859-1872, 2014.
- 4 NGWIRA, S.; WATANABE, T. An Analysis of the Causes of Deforestation in Malawi: A
5 Case of Mwazisi. **Land**, v. 8, n. 3, p. 48, 2019.
- 6 OLIVEIRA, H. C.; FRESCHI, L.; SODEK, L. Nitrogen metabolism and translocation in
7 soybean plants subjected to root oxygen deficiency. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.
8 66, p. 141-149, 2013.
- 9 OLIVEIRA, H. C. *et al.* Amino acid recovery does not prevent susceptibility to *Pseudomonas*
10 *syringae* in nitrate reductase double-deficient *Arabidopsis thaliana* plants. **Plant Science**, v.
11 176, n. 1, p. 105-111, 2009.
- 12 OLIVEIRA, H. C. *et al.* Nitrogen use strategies of seedlings from neotropical tree species of
13 distinct successional groups. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 114, p. 119-127, 2017.
- 14 PAGNUSSAT, G. C.; LANTERI, M. L.; LAMATTINA, L. Nitric oxide and cyclic GMP are
15 messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. **Plant Physiology**,
16 v. 132, n. 3, p. 1241-1248, 2003.
- 17 PAGNUSSAT, G. C. *et al.* Nitric oxide mediates the indole acetic acid induction activation of
18 a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root development. **Plant**
19 **Physiology**, v. 135, n. 1, p. 279-286, 2004.
- 20 PLANCHET, E., *et al.* Nitric oxide (NO) as an intermediate in the cryptogein-induced
21 hypersensitive response—a critical re-evaluation. **Plant, Cell & Environment**, v. 29, p. 59-69,
22 2006.
- 23 REMANS, T. *et al.* Understanding the development of roots exposed to contaminants and the
24 potential of plant-associated bacteria for optimization of growth. **Annals of Botany**, v. 110, n.
25 2, p. 239-252, 2012.
- 26 ROCKEL, P. *et al.* Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in*
27 *vivo* and *in vitro*. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 366, p. 103-110, 2002.
- 28 SAHAY, S.; GUPTA, M. An update on nitric oxide and its benign role in plant responses
29 under metal stress. **Nitric Oxide**, v. 67, p. 39-52, 2017.
- 30 SALGADO, I. *et al.* Nitric oxide signaling and homeostasis in plants: a focus on nitrate
31 reductase and S-nitrosoglutathione reductase in stress-related responses. **Brazilian Journal of**
32 **Botany**, v. 36, n. 2, p. 89-98, 2013.
- 33 SANTISREE, P.; BHATNAGAR-MATHUR, P.; SHARMA, K. K. NO to drought-
34 multifunctional role of nitric oxide in plant drought: do we have all the answers?. **Plant**
35 **Science**, v. 239, p. 44-55, 2015.
- 36 SARMENTO, C. D.; FRANCA, M. G. C. Neotropical Forests from their Emergence to the
37 Future Scenario of Climatic Changes. **Vegetation**, p. 59, 2018.

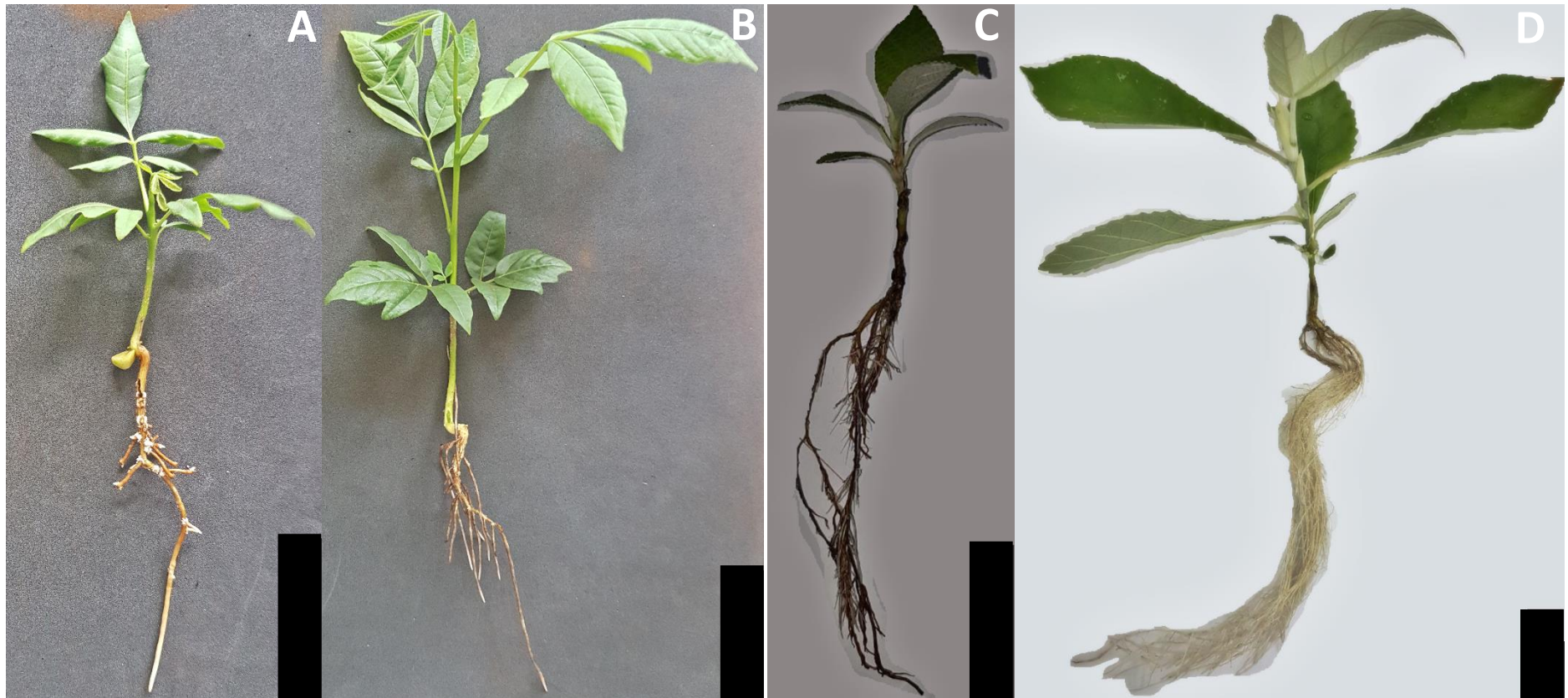
- 1 SILVEIRA, N. M. *et al.* Exogenous nitric oxide improves sugarcane growth and
2 photosynthesis under water deficit. **Planta**, v. 244, n. 1, p. 181-190, 2016.
- 3 SMITH, S. Transporte e alocação de solutos: Nutrição mineral. In: Taiz, L. *et al.* **Fisiologia e**
4 **Desenvolvimento vegetal**. Artmed, Porto Alegre. Pp. 119 – 143, 2017.
- 5 SOUSA-SILVA, J. C., *et al.* Desenvolvimento inicial de *Cabralea canjerana* Saldanha em
6 diferentes condições de luz. **Boletim do Herbário Ezechias Paulo Heringer**, v. 4, 1999.
- 7 STÖHR, C.; ULLRICH, W. R. Generation and possible roles of NO in plant roots and their
8 apoplastic space. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 379, p. 2293-2303, 2002.
- 9 SUN, C.; YU, J.; HU, D. Nitrate: a crucial signal during lateral roots development. **Frontiers**
10 **in Plant Science**, v. 8, p. 485, 2017.
- 11 SUN, H. *et al.* Nitric oxide affects rice root growth by regulating auxin transport under nitrate
12 supply. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 659, 2018.
- 13 SZCZERBA, M. W. *et al.* NH₄⁺-stimulated and-inhibited components of K⁺ transport in rice
14 (*Oryza sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 12, p. 3415-3423, 2008.
- 15 TENNANT, D. A test of a modified line intersect method of estimating root length. **The**
16 **Journal of Ecology**, v. 63, n. 3, p. 995-1001, 1975.
- 17 TERRILE, M. C. *et al.* Nitric oxide influences auxin signaling through S-nitrosylation of the
18 *Arabidopsis* TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 auxin receptor. **The Plant Journal**, v.
19 70, n. 3, p. 492-500, 2012.
- 20 TIAN, D.; NIU, S. A global analysis of soil acidification caused by nitrogen
21 addition. **Environmental Research Letters**, v. 10, n. 2, p. 024019, 2015.
- 22 TRUMBORE, S.; BRANDO, P.; HARTMANN, H. Forest health and global change. **Science**,
23 v. 349, n. 6250, p. 814-818, 2015.
- 24 VATTER, T. *et al.* Regulation of length and density of *Arabidopsis* root hairs by ammonium
25 and nitrate. **Journal of Plant Research**, v. 128, n. 5, p. 839-848, 2015.
- 26 WANG, C. *et al.* Nitric oxide supplementation alleviates ammonium toxicity in the
27 submerged macrophyte *Hydrilla verticillata* (Lf) Royle. **Ecotoxicology and Environmental**
28 **Safety**, v. 74, n. 1, p. 67-73, 2011.
- 29 WU, Q.; PAGÈS, L.; WU, J. Relationships between root diameter, root length and root
30 branching along lateral roots in adult, field-grown maize. **Annals of Botany**, v. 117, n. 3, p.
31 379-390, 2016.
- 32 WULFF, A. *et al.* Nitrite reduction and superoxide-dependent nitric oxide degradation by
33 *Arabidopsis* mitochondria: influence of external NAD (P) H dehydrogenases and alternative
34 oxidase in the control of nitric oxide levels. **Nitric Oxide**, v. 21, n. 2, p. 132-139, 2009.
- 35 YEMETS, A. I. *et al.* Nitric oxide signalling via cytoskeleton in plants. **Plant Science**, v. 181,
36 n. 5, p. 545-554, 2011.

- 1 YUAN, H.; HUANG, X. Inhibition of root meristem growth by cadmium involves nitric
2 oxide-mediated repression of auxin accumulation and signalling in *Arabidopsis*. **Plant, Cell
3 & Environment**, v. 39, n. 1, p. 120-135, 2016.
- 4 ZANGARO, W. *et al.* Relationships among arbuscular mycorrhizas, root morphology and
5 seedling growth of tropical native woody species in southern Brazil. **Journal of Tropical
6 Ecology**, v. 21, n. 5, p. 529-540, 2005.
- 7 ZHAO, M. *et al.* Nitric reductase-dependent nitric oxide production is involved in cold
8 acclimation and freezing tolerance in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 151, n. 2, p. 755-767,
9 2009.
- 10 ZHU, C. *et al.* An ethylene and ROS-dependent pathway is involved in low ammonium-
11 induced root hair elongation in *Arabidopsis* seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**,
12 v. 105, p. 37-44, 2016.
- 13 ZIMMERMANN, A. P. Lora, *et al.* Morphological and physiological plasticity of saplings of
14 *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. in different light conditions. **Revista Árvore**, v. 43, n. 1,
15 e430103, 2019.

ANEXOS

1
2
3
4
5
6
7

Anexo 1 – Fotografias de *C. canjerana* sob NH_4^+ (A) e NO_3^- (B), *C. pachystachya* sob NH_4^+ (C) e NO_3^- (D), *C. floribundus* sob NH_4^+ (E) e NO_3^- (F), *S. mauritanum* sob NH_4^+ (G) e NO_3^- (H), *G. kunthiana* sob NH_4^+ (I) e NO_3^- (J), *C. estrellensis* sob NH_4^+ (K) e NO_3^- (L), *P. parviflora* sob NH_4^+ (M) e NO_3^- (N), *S. terebinthifolius* sob NH_4^+ (O) e NO_3^- (P), *T. micrantha* sob NH_4^+ (Q) e NO_3^- (R). As barras pretas correspondem a 5 cm em todas as figuras.



1
2
3



1
2
3



1

2



1

2

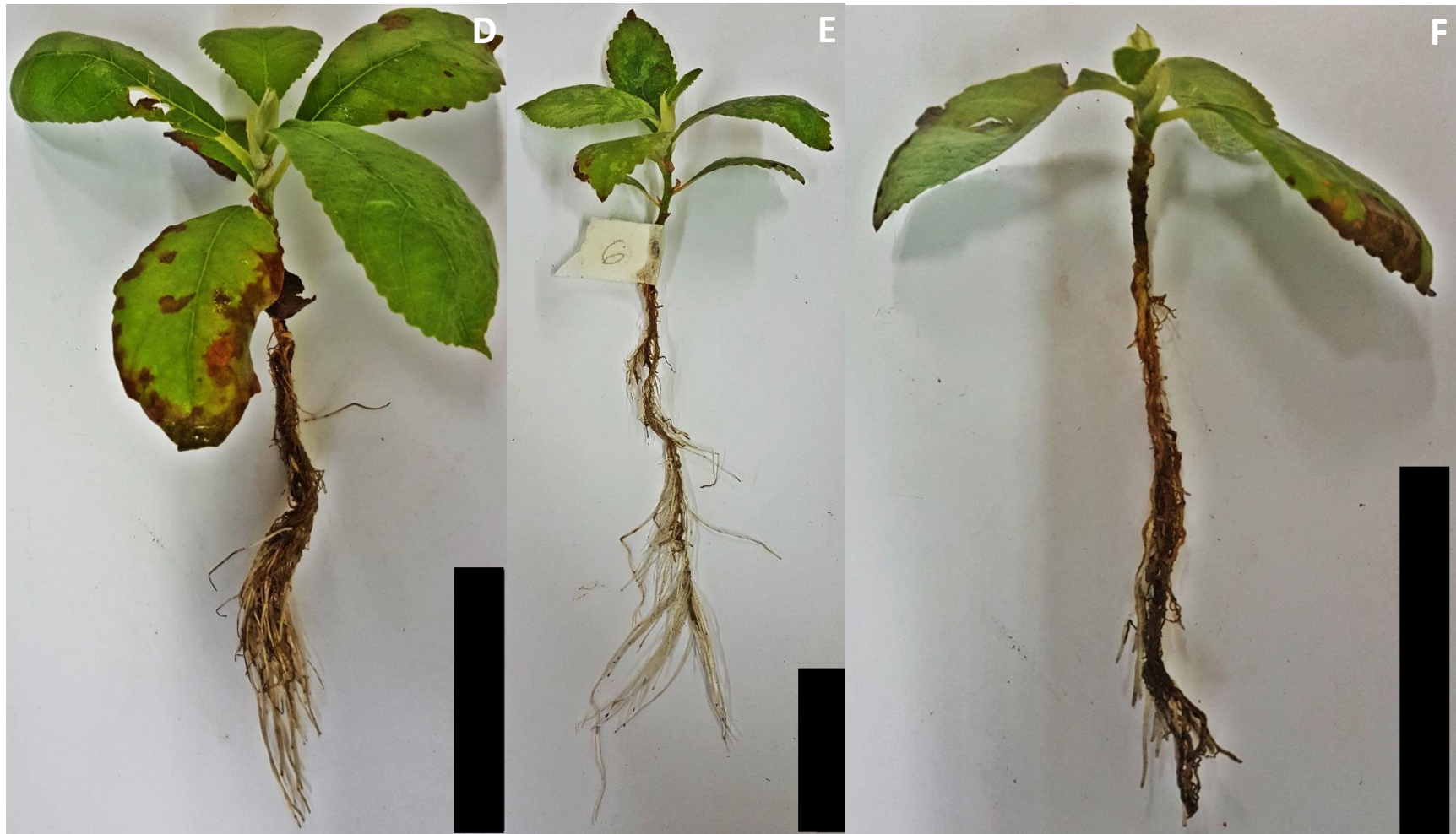


- 1 **Anexo 2** – Fotografias de *C. estrellensis* sob NH_4^+ (Controle) (A), 10 μM GSNO (B), 100 μM GSNO (C) e *C. pachystachya* sob NH_4^+ (Controle)
2 (D), 10 μM GSNO (E) e 100 μM GSNO (F). As barras pretas correspondem a 5 cm em todas as figuras.

3
4



1



- 1 ANEXO 3 – Fotografias de *C. estrellensis* sob NO_3^- (Controle) (A), PTIO 1 μM (B) e *C. pachystachya* NO_3^- (Controle) (C) e 1 μM PTIO (D).
2 As barras pretas correspondem a 5 cm em todas as figuras.

