



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LARA RAPOSO BARDY

**EFEITO DO AUMENTO DO NITROGÊNIO NO SOLO EM
MUDAS DE ESPÉCIES ARBÓREAS DA MATA ATLÂNTICA**

Londrina
2020

LARA RAPOSO BARDY

**EFEITO DO AUMENTO DO NITROGÊNIO NO SOLO EM
MUDAS DE ESPÉCIES ARBÓREAS DA MATA ATLÂNTICA**

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

Orientador: Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira

Londrina-PR
2020

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

BARDY, LARA RAPOSO.

EFEITO DO AUMENTO DO NITROGÊNIO NO SOLO EM MUDAS DE ESPÉCIES ARBÓREAS DA MATA ATLÂNTICA / LARA RAPOSO BARDY. - Londrina, 2020.
44 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. BIOMONITORAMENTO - Tese. 2. FERTILIZANTES NITROGENADOS - Tese. 3. DEPOSIÇÃO DE NITROGÊNIO - Tese. 4. METABOLISMO DE NITROGÊNIO - Tese. I. OLIVEIRA, HALLEY CAIXETA DE. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDU 574

LARA RAPOSO BARDY

EFEITO DO AUMENTO DO NITROGÊNIO NO SOLO EM MUDAS DE ESPÉCIES ARBÓREAS DA MATA ATLÂNTICA

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

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Edmilson Bianchini
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

Londrina, 13 de julho de 2020.

DEDICATÓRIA

A todos aqueles que me encorajaram e que foram suporte para mim durante o desafio da pós-graduação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Eterno pela bondade e amor que me perseguem todos os dias da minha vida e por ter me permitido chegar até aqui.

Agradeço ao meu querido marido André, por todo apoio nessa caminhada, ajuda em desmontagens, paciência e amor demonstrado todos os dias!

Agradeço aos meus pais, que apesar dos meus medos e dificuldades, me incentivaram esse tempo todo. Muito obrigada por nunca me deixarem faltar nada, principalmente, amor e respeito.

Agradeço as minhas irmãs e cunhados pelas orações durante esse período e pela amizade sempre oferecida.

Agradeço aos meus lindos sobrinhos: Júlia, Arthur, Bernardo, Benjamin e João, os amores da minha vida. Nos dias mais difíceis eu olhava no mural e via vocês, que paz que sentia! Obrigada pelo amor doce e sem reservas.

Aos amigos Karina, Tatiane, Mariana, Angélica, Giovanna, Bruno, Rafael, Diego, Anderson e demais colegas do Laboratório de Ecofisiologia Vegetal por toda paciência, suporte e colaboração durante essa pesquisa. Obrigada!

Agradeço também aos meus amigos da vida Sirlene, Maria Elena, Mateus, Carolina, Daniel, Fernanda, Louis, Ivy, Clybas, Brunna, que sempre torceram por mim, oraram e me fizeram ter dias mais leves em meio ao tempo difícil do mestrado.

Agradeço ao querido professor, Halley, que apesar de toda a minha limitação, sempre me incentivou e me ensinou a ser melhor. Obrigada!

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

Agradeço aos membros da pré-banca, Prof. José Antonio Pimenta e Prof. José Marcelo Domingues Torezan e aos membros da banca de defesa, Prof. Edmilson Bianchini e Prof. Artur Berbel Lírio Rondina, pelas contribuições ao trabalho. Também agradeço ao Prof. Artur pelo apoio nas medidas de N total.

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

Agradeço também ao CNPq e à Fundação Araucária pelo apoio financeiro a este projeto, que faz parte do Programa Pesquisas Ecológicas de Longa Duração – Sítio Mata Atlântica do Norte do Paraná (PELD – MANP, Processo 441540/2016-3).

BARDY, Lara Raposo. **Efeito do aumento do nitrogênio no solo em mudas de espécies arbóreas da Mata Atlântica**. 2020. 44 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

O nitrogênio (N) é o nutriente obtido do solo que as plantas necessitam em maiores quantidades, pois participa da composição de diversas biomoléculas. Porém, com o aporte de fertilizantes nas produções agrícolas, pode haver fornecimento excessivo de N e seu conseqüente acúmulo no solo de fragmentos florestais adjacentes. Enquanto algumas espécies arbóreas podem ter seu crescimento estimulado pelo aumento de N no solo, outras podem ser pouco favorecidas ou mesmo ter seu crescimento reduzido, afetando negativamente as interações interespecíficas e a biodiversidade florestal. Apesar disso, o impacto do excesso de N em espécies das florestas tropicais do Brasil não é bem conhecido. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do aumento do N no solo em quatro espécies arbóreas da Mata Atlântica com diferentes graus de tolerância à sombra: *Croton floribundus* Spreng. (intolerante à sombra), *Astronium graveolens* Jacq. (intolerante à sombra), *Guarea kunthiana* A.Juss. (tolerante à sombra) e *Aspidosperma polyneuron* Müll.Arg. (tolerante à sombra), crescidas em casa de vegetação. As mudas das quatro espécies foram submetidas a três tratamentos: referência (sem adição de nutrientes), N (adição de sulfato de amônio) e C (adição de N e todos os outros macro e os micronutrientes), após os quais foram avaliados parâmetros biométricos, fisiológicos e do metabolismo do N. Foi possível observar relação entre o grau de tolerância à sombra e as respostas aos tratamentos. As mudas de *C. floribundus* apresentaram aumento no crescimento com a adição de N, principalmente quando ele foi adicionado em conjunto com outros nutrientes. Apenas o tratamento C levou ao aumento da taxa fotossintética em mudas dessa espécie, e o acúmulo de nitrato nas folhas e na seiva do xilema ocorreu apenas no tratamento N. Em *A. graveolens*, houve diminuição na transpiração em resposta a ambos os tratamentos. Todavia, a eficiência no uso da água aumentou apenas no tratamento C, que resultou também no aumento da área foliar e massa seca da folha. Em relação aos parâmetros metabólicos, *A. graveolens* foi pouco responsiva nos dois tratamentos. Já em *G. kunthiana*, os tratamentos levaram a uma inibição da fotossíntese líquida e aumento do N total na folha, mas apenas em N houve diminuição na massa seca do caule e acúmulo de nitrato nas folhas e seiva do xilema. *Aspidosperma polyneuron* não apresentou nenhuma mudança no crescimento, mas houve grande acúmulo de compostos nitrogenados nas folhas, como nitrato e N total, para os dois tratamentos. As análises dos dados indicam que espécies de menor tolerância à sombra apresentam mais mudanças no crescimento e fisiologia em resposta ao N em excesso no solo, enquanto espécies de maior tolerância à sombra apresentaram principalmente mudanças metabólicas, pelo acúmulo de compostos nitrogenados em seus tecidos.

Palavras-chave: biomonitoramento; fertilizantes nitrogenados; Floresta Estacional Semidecidual; deposição de nitrogênio; metabolismo de nitrogênio.

BARDY, Lara Raposo. **Effect of increased soil nitrogen on seedlings of tree species from the Atlantic Forest.** 2020. 44 p. Dissertation (Masters' degree in Biological Sciences) - State University of Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

Nitrogen (N) is obtained soil nutrient that plants need in larger amounts, as part of the composition of various biomolecules. However, with the supply of fertilizer on agricultural production, there may be excessive supply of nitrogen and its consequent accumulation in the soil adjacent forest fragments. While some tree species can have their growth stimulated by the increase of N in the soil, others can be slightly favored or have reduced growth, negatively affecting interspecific interactions and forest biodiversity. Nevertheless, the impact of excess N in species of tropical forests of Brazil is not well known. The objective of this study was to evaluate the effect of increasing N soil in four Atlantic forest tree species with different degrees of shade tolerance *Croton floribundus* Spreng. (Shade intolerant), *Astronium graveolens* Jacq. (Shade intolerant), *Guarea kunthiana* A.Juss. (Shade tolerant) and *Aspidosperma polyneuron* Müll.Arg. (Shade tolerant) grown in a greenhouse. The seedlings of the four species were subjected to three treatments: reference (without addition of nutrients), N (adding ammonium sulfate) and C (addition of N and all other macro and micronutrients), after which they were evaluated biometrics, physiological metabolism, and N. It was possible to observe the relationship between the degree of shade tolerance and responses to treatment. C. The seedlings showed *C. floribundus* increase in growth with the addition of N, especially when it was added together with other nutrients. Only treatment C led to increased photosynthesis rate in plants of this species, and the accumulation of nitrate in the leaves and in the xylem sap was observed only in treatment N. In *A. graveolens*, there was a decrease in sweating in response to both treatments. However, the use efficiency of the water treatment increased only C, which also resulted in increased leaf area and dry weight of the sheet. Regarding metabolic parameters, *A. graveolens* was unresponsive in both treatments. Already in *G. kunthiana*, treatments led to inhibition of net photosynthesis and increased total nitrogen in the sheet but only N there was a decrease in dry weight of stems and nitrate accumulation in leaves and xylem sap. *Aspidosperma polyneuron* showed no change in growth but there was a large accumulation of nitrogenous compounds in the leaves, and total N as nitrate, for both treatments. Analyzes of the data indicate that smaller species shade tolerance have more changes in growth and physiology in response to N in excess in the soil, while most species shade tolerance mainly showed metabolic changes, the accumulation of nitrogenous compounds in their tissues.

Keywords: biomonitoring; nitrogen fertilizer; forest Semideciduous; nitrogen deposition; nitrogen metabolism.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Esquema da absorção, assimilação e translocação de N em plantas. aa= aminoácidos; C= citosol; NO_3^- = nitrato; NH_4^+ = amônio; NR= enzima nitrato redutase; NiR= enzima nitrito redutase; GS= enzima glutamina sintetase; GOGAT= enzima glutamina-2-oxoglutarato aminotransferase; GS citosólica não está representada no esquema simplificado. Adaptado de Hawkesford et al (2012)16
- Figura 2** – Fotossíntese líquida (A), transpiração (B), eficiência no uso da água (C), condutância estomática (D) e concentração intracelular de CO_2 (E) nas mudas de *Croton floribundus* (Cf), *Astronium graveolens* (Ag), *Guarea kunthiana* (Gk) e *Aspidosperma polyneuron* (Ap) tratadas com água (referência: R), apenas com adição de nitrogênio (N) e com solução nutritiva completa (C). As barras na porção superior das colunas representam o erro padrão (n=10). Letras iguais em uma mesma espécie indicam valores que não diferem conforme ANOVA seguida de teste de Fisher ($p < 0,05$)24
- Figura 3** – Respostas metabólicas de mudas de *Croton floribundus* (Cf) à adição de nitrogênio (N) e de solução nutritiva completa (C), em relação às mudas regadas apenas com água (referência: R). **Ns**: conteúdo de nitrato na seiva do xilema; **Nf**: conteúdo de nitrato na folha; **As**: conteúdo de amônio na seiva do xilema; **Af**: conteúdo de amônio na folha; **aas**: conteúdo de aminoácidos livres totais na seiva do xilema; **aaf**: conteúdo de aminoácidos livres totais na folha; **Pf**: conteúdo de proteínas solúveis totais na folha; **NRf**: atividade da enzima nitrato redutase na folha; **N total**: conteúdo de N total folha. Áreas acima e abaixo de 0 indicam, respectivamente, aumento e diminuição em relação à referência. Asteriscos indicam diferença significativa entre o tratamento e a referência de acordo com ANOVA seguida de teste de Fisher ($p < 0,05$).26

Figura 4 – Respostas metabólicas de mudas de *Astronium graveolens* (*Ag*) à adição de nitrogênio (N) e de solução nutritiva completa (C), em relação às mudas regadas apenas com água (referência: R). **Ns**: conteúdo de nitrato na seiva do xilema; **Nf**: conteúdo de nitrato na folha; **As**: conteúdo de amônio na seiva do xilema; **Af**: conteúdo de amônio na folha; **aas**: conteúdo de aminoácidos livres totais na seiva do xilema; **aaf**: conteúdo de aminoácidos livres totais na folha; **Pf**: conteúdo de proteínas solúveis totais na folha; **NRf**: atividade da enzima nitrato redutase na folha; **N total**: conteúdo de N total folha. Áreas acima e abaixo de 0 indicam, respectivamente, aumento e diminuição em relação à referência. Asteriscos indicam diferença significativa entre o tratamento e a referência de acordo com ANOVA seguida de teste de Fisher ($p < 0,05$).27

Figura 5 – Respostas metabólicas de mudas de *Guarea kunthiana* (*Gk*) à adição de nitrogênio (N) e de solução nutritiva completa (C), em relação às mudas regadas apenas com água (referência: R). **Ns**: conteúdo de nitrato na seiva do xilema; **Nf**: conteúdo de nitrato na folha; **As**: conteúdo de amônio na seiva do xilema; **Af**: conteúdo de amônio na folha; **aas**: conteúdo de aminoácidos livres totais na seiva do xilema; **aaf**: conteúdo de aminoácidos livres totais na folha; **Pf**: conteúdo de proteínas solúveis totais na folha; **NRf**: atividade da enzima nitrato redutase na folha; **N total**: conteúdo de N total folha. Áreas acima e abaixo de 0 indicam, respectivamente, aumento e diminuição em relação à referência. Asteriscos indicam diferença significativa entre o tratamento e a referência de acordo com ANOVA seguida de teste de Fisher ($p < 0,05$).28

Figura 6 – Respostas metabólicas de mudas de *Aspidosperma polyneuron* (*Ap*) à adição de nitrogênio (N) e de solução nutritiva completa (C), em relação às mudas regadas apenas com água (referência: R). **Ns**: conteúdo de nitrato na seiva do xilema; **Nf**: conteúdo de nitrato na folha; **As**: conteúdo de amônio na seiva do xilema; **Af**: conteúdo de amônio na folha; **aas**: conteúdo de aminoácidos

livres totais na seiva do xilema; **aaf**: conteúdo de aminoácidos livres totais na folha; **Pf**: conteúdo de proteínas solúveis totais na folha; **NRf**: atividade da enzima nitrato redutase na folha; **N total**: conteúdo de N total folha. Áreas acima e abaixo de 0 indicam, respectivamente, aumento e diminuição em relação à referência. Asteriscos indicam diferença significativa entre o tratamento e a referência de acordo com ANOVA seguida de teste de Fisher ($p < 0,05$).29

Figura 7 – Análise de componentes principais baseada nas respostas dos parâmetros biométricos e fisiológicos de *Croton floribundus* (Cf), *Astronium graveolens* (Ag), *Guarea kunthiana* (Gk) e *Aspidosperma polyneuron* (Ap) aos tratamentos apenas com nitrogênio (N) e com solução nutritiva completa (C), em relação à referência sem adição de nutrientes. A, fotossíntese líquida; AF, área foliar; AFE, área foliar específica ; C_i, concentração intercelular de CO₂; CPA, comprimento da parte aérea; E, transpiração; EUA, eficiência no uso da água; g_s, condutância estomática; MSC, massa seca do caule; MSF, massa seca da folha; MSR, massa seca da raiz; RRPA, razão raiz/parte aérea. Eixo 1- 41,5%; Eixo 2- 34,6%.....31

Figura 8 - Análise de componentes principais baseada nas respostas dos parâmetros metabólicos de *Croton floribundus* (Cf), *Astronium graveolens* (Ag), *Guarea kunthiana* (Gk) e *Aspidosperma polyneuron* (Ap), aos tratamentos apenas com nitrogênio (+N) e com solução nutritiva completa (+C), em relação à referência sem adição de nutrientes. Af, amônio na folha; As, amônio na seiva do xilema; aaf, aminoácidos totais na folha; aas, aminoácidos totais na seiva do xilema; Nf, nitrato na folha; NRf, atividade da enzima nitrato redutase; Ns, nitrato na seiva do xilema; N total, conteúdo de N total; Pf, proteínas solúveis totais na folha. Eixo 1- 38,3%; Eixo 2- 28,1%.....33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVO	20
3	HIPÓTESES	20
4	MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1	MATERIAL VEGETAL	21
4.2	TRATAMENTOS.....	21
4.3	ANÁLISES BIOMÉTRICAS	23
4.4	ANÁLISES FISIOLÓGICAS	23
4.5	ANÁLISES METABÓLICAS.....	24
4.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	25
5	RESULTADOS	26
5.1	PARÂMETROS BIOMÉTRICOS E FISIOLÓGICOS	26
5.2	ANÁLISES METABÓLICAS.....	25
5.3	ANÁLISES MULTIVARIADAS	29
6	DISCUSSÃO	34
7	CONCLUSÃO	37
8	REFERÊNCIAS	39
9	ANEXOS	44

1. INTRODUÇÃO

As espécies vegetais necessitam de vários nutrientes ao longo de seu ciclo de vida, tanto para seu crescimento e manutenção da estrutura, como para a reprodução (BLOOM, 2009). Esses nutrientes são considerados essenciais e, de acordo com suas concentrações relativas nos vegetais, são divididos em dois grandes grupos: macronutrientes e micronutrientes (KIRKBY; RÖMHELD, 2007). Também são classificados de acordo com sua função nos vegetais, como: função estrutural, constituinte de enzimas ou de ativador enzimático (FAQUIN, 2005).

Dentre os nutrientes obtidos do solo, aquele que as plantas necessitam em maior quantidade é o nitrogênio (N), constituindo biomoléculas essenciais como adenosina trifosfato (ATP), nicotinamida adenina dinucleotídeo (fosfato) (NAD(P)H), clorofilas, proteínas e ácidos nucleicos (BLOOM, 2009; KRAISER et al. 2011; KUSANO et al., 2011). O N é um nutriente limitante ao crescimento vegetal em vários ecossistemas, de forma que sua disponibilidade influencia o desempenho e a sobrevivência de espécies vegetais (BRITTO; KRONZUCKER, 2002).

Na atmosfera, o N está presente em sua forma gasosa (N_2), que não é aproveitada pelas plantas. Para tal, faz-se necessária uma transformação prévia para formas reativas, como NO_3^- (nitrato) ou NH_4^+ (amônio), o que pode acontecer por processos industriais ou naturais. A fixação industrial utiliza a energia da queima de combustíveis fósseis para a síntese de fertilizantes nitrogenados, os quais se constituem em uma forma de adicionar N reativo ao solo (ABER et al., 1989; CORDEIRO, 2004). Além disso, o uso de combustíveis fósseis está associado à liberação de óxidos de nitrogênio (NO_x) e amônia (NH_3) na atmosfera, os quais se precipitam junto à chuva e, assim, adicionam N reativo ao solo (GUARIEIRO; VASCONCELOS; SOLCI, 2011; LI et al., 2016). Já os processos naturais acontecem pela fixação atmosférica ou pela fixação biológica. Esta é a forma mais importante de fixar o N_2 , levando à formação de NH_3 pela ação de micro-organismos que são capazes de quebrar a tripla ligação entre os dois átomos de N, através do complexo enzimático da nitrogenase (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001; FAQUIN, 2005).

No solo, o N está disponível para as plantas principalmente nas formas inorgânicas NO_3^- e NH_4^+ (MILLER; CRAMER, 2004). O NO_3^- absorvido pelas raízes pode ser assimilado ali mesmo ou nas folhas, após ser translocado via seiva do

xilema (Figura 1). Em ambos os órgãos, altas concentrações de NO_3^- podem ser armazenadas nos vacúolos. O primeiro passo para a assimilação do NO_3^- consiste na sua redução a nitrito (NO_2^-) pela enzima citosólica nitrato redutase (NR), com a utilização de NAD(P)H. O NO_2^- é então convertido a NH_4^+ nos plastídios pela enzima nitrito redutase, em uma reação que demanda o poder redutor da ferredoxina ou do NADPH. Já o NH_4^+ resultante dessa ou de outras reações intracelulares, ou o NH_4^+ absorvido do meio externo pelas raízes, são assimilados em aminoácidos através da ação sequencial das enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamina-2-oxoglutarato aminotransferase (GOGAT), com a utilização de ATP e poder redutor (ferredoxina ou NADH) (KRAPP, 2015). O NH_4^+ é encontrado em níveis relativamente baixos na seiva do xilema, de forma que a maior parte do NH_4^+ absorvido pela raiz é assimilado nesse órgão a aminoácidos, os quais são translocados para a parte aérea (KITAJIMA, 1994). Comparado ao NO_3^- , as células vegetais acumulam pouco NH_4^+ devido à toxicidade associada a altas concentrações desse cátion (BRITTO et al., 2001).

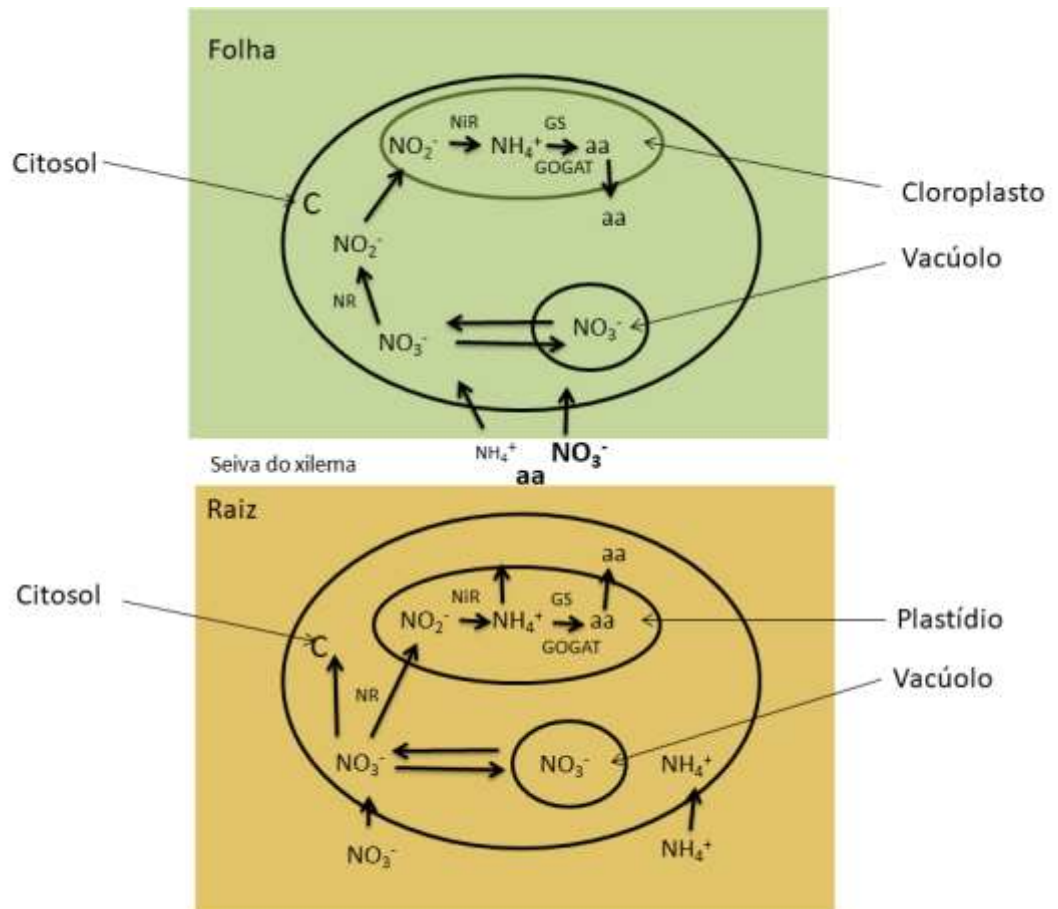


Figura 1. Esquema da absorção, assimilação e translocação de N em plantas. Aa = aminoácidos; C = Citosol; NO_3^- = nitrato; NO_2^- = nitrito; NH_4^+ = amônio; NR = enzima nitrato redutase; NiR = enzima nitrito redutase; GS = enzima glutamina sintetase; GOGAT = enzima glutamina-2-oxoglutarato aminotransferase. GS citosólica não está apresentada no esquema simplificado. Adaptado de Hawkesford et al. (2012).

Quando o suprimento de N pelo meio é insuficiente, os aminoácidos presentes nas folhas velhas são remobilizados via floema para folhas em desenvolvimento. Portanto, uma planta deficiente em N normalmente apresenta folhas superiores verde-claras e folhas inferiores amarelas ou castanhas tendo sua fotossíntese e seu crescimento prejudicados (TEWARI; KUMAR; SHARMA, 2007). Além de apresentar redução na quantidade de tecido paliçádico, na atividade de algumas enzimas do ciclo de N e C (carbono) e até redução na condutância estomática (KOSLOWSKI & PALLARDY, 1997; GUIDI et al., 1998; CRUZ et al., 2007). Porém, o excesso de N no solo também pode ser prejudicial às plantas. Em especial, o NH_4^+ pode ser tóxico para a planta ao dissipar os gradientes de prótons transmembranas e causar distúrbios no pH intracelular, na absorção iônica, no balanço de carbono e na homeostase hormonal (BRITTO et al., 2001), além de

causar estresse oxidativo e danos na estrutura dos cloroplastos e do aparelho de fotofosforilação, com efeito negativo na fotossíntese (BITTSÁNSZKY et al., 2015). Já a toxicidade por NH_3 é caracterizada pela restrição do crescimento, lesões nos caules, redução da área foliar e da biomassa total da planta (LIU; WANG; STEWART, 2013).

O excesso de N nos ecossistemas pode ser originado de resíduos urbanos (tanto domésticos, como industriais) e de adubos orgânicos e químicos (FAQUIN, 2005). Como resultado da crescente população humana e sua demanda por alimentos e energia, o N reativo mais do que duplicou na atmosfera ao longo do século passado (DÍAS-ÁLVAREZ; LINDIG-CISNEROS; DE LA BARRERA, 2018). Por exemplo, nas culturas agrícolas, o N reativo é aplicado em doses elevadas (cerca de 100 a 480 kg ha⁻¹, segundo Hungria; Campos e Mendes, 2001), e boa parte não é aproveitada pelas plantas cultivadas, sendo perdida pela volatilização, lixiviação e escoamento superficial (MATSON et al., 1999).

O aumento global de N reativo tem trazido preocupações em vários aspectos, como pela contaminação de águas subterrâneas e dos mananciais, pela elevação dos teores de NO_3^- nos alimentos (principalmente naqueles de consumo “in natura”, como as frutas e hortaliças) e pela perda de biodiversidade (MATSON et al., 1999; FAQUIN, 2005; BOBBINK et al., 2010; CLELAND e HARPOLE, 2010; ISBELL et al., 2013; KANAKIDOU et al., 2016). Em ecossistemas com N excedente, há uma alteração na composição de comunidades vegetais, uma vez que a deposição de N reativo altera as interações competitivas entre as espécies vegetais e entre as plantas e o solo. Esse efeito do excesso de N sobre as comunidades vegetais também pode estar relacionado à acidificação e mudanças na microbiota do solo e ao favorecimento de espécies invasoras, como gramíneas, levando assim à diminuição da riqueza do ecossistema (LU et al., 2012; ZHOU et al., 2013; MAO et al., 2017).

Dentre os ecossistemas terrestres mais afetados pela deposição de N reativo encontram-se as florestas. Todavia, a maior parte dos estudos sobre o efeito do excesso de N em espécies arbóreas se deu em florestas temperadas e subtropicais (LI et al., 2019). Dessa forma, ainda é escasso o conhecimento acerca das respostas de espécies nativas de florestas tropicais à deposição de N (LU et al., 2010; LI et al., 2019). Além disso, as florestas tropicais maduras são geralmente

menos limitadas em N que florestas de climas temperados ou subtropicais, o que deve resultar em respostas distintas à adição de N (LI et al., 2019).

Estudos de meta-análises indicam que o aumento do sequestro de carbono em resposta à adição de N (NH_4NO_3 na maioria das vezes) é bem menor em florestas tropicais (quando detectado) que em temperadas e subtropicais (SCHULTE-UEBBING; DE VRIES, 2018; LI et al., 2019). Coerente com essas observações, Jiang et al. (2018) mostraram que o N aumentou as taxas de crescimento relativo de árvores de pequeno porte em uma floresta tropical montana na China apenas quando aplicado junto com fósforo (P), sugerindo que o teor de P pode afetar o impacto da deposição de N nas plantas. Santiago et al. (2012) também demonstraram o efeito conjunto de N e P em estimular o crescimento de plântulas arbóreas em uma floresta tropical no Panamá. Por outro lado, Cárate-Tandalla, Leuschner e Homeier (2015) reportaram um aumento da taxa de mortalidade de plântulas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk. após a adição de N (mesmo acompanhado de P) em uma floresta tropical no Equador. Além disso, em experimentos realizados por Lu et al. (2010), a adição de elevadas concentrações de N ao solo em longo prazo levou a um decréscimo acentuado na riqueza, densidade e cobertura de espécies arbóreas em uma floresta tropical da China.

Em relação aos efeitos da adição de N no ecossistema sobre a fisiologia e metabolismo das plantas, os dados obtidos em florestas tropicais são contrastantes. Pasquini e Santiago (2012) observaram um efeito positivo da adição de N ao solo de uma floresta tropical submontana no Panamá sobre a fotossíntese e sobre o teor de N nas folhas de mudas de *Alseis blackiana* Hemsl. Já outros estudos observaram que a taxa fotossintética líquida de mudas de espécies arbóreas de florestas tropicais da China não se alterou ou mesmo foi reduzida após o tratamento com grandes quantidades de N (MAO et al., 2017, 2018). MAO et al. (2018) também reportaram um aumento do teor de N, de proteínas solúveis e aminoácidos livres nas folhas das três espécies arbóreas de sub-bosque avaliadas em resposta ao aumento de N no solo. Já no estudo anterior, houve grande variação nas respostas desses mesmos parâmetros bioquímicos à adição de N conforme a espécie em questão (MAO et al., 2017). Vários estudos têm indicado que as respostas metabólicas e fisiológicas ao aumento de N são muito dependentes de características ecológicas das espécies arbóreas, como demanda por nutrientes, tolerância à sombra, taxa de

crescimento e posição no dossel (MO; LI; GUNDERSEN, 2008; TRIPATHI; RAGHUBANSHI, 2014; GARGALLO-GARRIGA et al., 2017).

De fato, espécies arbóreas de grupos funcionais distintos apresentam diferentes estratégias de uso de N, o que pode representar uma importante resposta adaptativa ao ambiente em que vivem, contribuindo com a alta diversidade de plantas nas florestas tropicais (BRITTO; KRONZUCKER, 2002; AIDAR et al., 2003; KRONZUCKER et al., 2003). Estudos com mudas de espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica indicam que as intolerantes à sombra têm alta capacidade de assimilação de N na parte aérea, enquanto as tolerantes assimilam o N principalmente nas raízes. Além disso, as intolerantes à sombra apresentam crescimento acelerado, dependente de alta disponibilidade de N no solo, enquanto as tolerantes demandam menores quantidades desse nutriente (OLIVEIRA et al., 2017; DEBIASI et al., 2019).

No estudo de Oliveira et al. (2017), as mudas de espécies intolerantes à sombra apresentaram alta atividade da enzima NR nas folhas, na presença de NO_3^- , além de translocar muito NO_3^- na seiva do xilema. Por outro lado, as espécies tolerantes à sombra apresentaram baixa atividade NR foliar e translocaram principalmente aminoácidos na seiva do xilema, mesmo quando cultivadas com NO_3^- . Além disso, foram observadas variações nas estratégias de uso do N mesmo entre espécies de um mesmo grupo funcional (OLIVEIRA et al., 2017).

Utilizando NO_3^- e NH_4^+ enriquecidos em ^{15}N , Debiasi et al. (2019) ratificaram a maior capacidade de mudas de *Heliocarpus popayanensis* Kunth (espécie intolerante à sombra) em assimilar NO_3^- nas folhas em relação a *Eugenia brasiliensis* Lam. (espécie de sub-bosque altamente tolerante à sombra). Já as mudas de *Cariniana estrellensis* (uma espécie de dossel com moderada tolerância à sombra) apresentaram uma capacidade intermediária de assimilar NO_3^- nas folhas. Mudas de todas as espécies avaliadas nesse estudo assimilaram o NH_4^+ principalmente nas raízes, apresentando altos níveis de aminoácidos na seiva do xilema quando cultivadas com esse cátion (DEBIASI et al., 2019).

Diante da diversidade de estratégias de uso do N apresentada por espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica, é importante avaliar como as mudas de espécies com diferentes graus de tolerância à sombra responderiam ao excesso de N reativo no solo. Em um estudo avaliando o efeito da adição de N no dossel de uma floresta da China, Liu et al. (2018) verificaram que indivíduos de *Castanea henryi* (Kkan)

Rehder & E. H. Wilson (uma espécie arbórea de dossel) apresentaram maior conteúdo de N e de clorofilas nas folhas, mas houve diminuição na atividade da Rubisco, no conteúdo de proteínas e na eficiência fotossintética no uso de N. Por outro lado, as espécies arbóreas de sub-bosque aumentaram o conteúdo foliar de proteínas e a taxa fotossintética líquida em resposta à adição de N no dossel da floresta (LIU et al., 2018).

O conhecimento das respostas ao excesso de N é particularmente relevante para espécies arbóreas da Mata Atlântica, que apresenta hoje apenas 8% de sua cobertura original e é considerada um hot spot de biodiversidade com mais de 20 mil espécies vegetais, das quais 50% são endêmicas (ALMEIDA, 2016). Além de a proximidade com grandes centros urbanos favorecer a deposição atmosférica de N, na Mata Atlântica predominam fragmentos florestais rodeados por cultivos agrícolas, estando potencialmente expostos a grandes concentrações de N provenientes da aplicação adjacente de adubos (DURIGAN et al., 2007; RIBEIRO et al., 2009). Portanto, conhecer o efeito do aumento de N no solo em espécies arbóreas desse bioma é muito importante para prever modificações nas comunidades vegetais e propor estratégias para sua conservação. Além disso, a avaliação das respostas metabólicas pode permitir a sugestão de espécies bioindicadoras e de biomarcadores do aumento de N no solo em fragmentos florestais (DÍAS-ÁLVAREZ; LINDIG-CISNEROS; DE LA BARRERA, 2018).

2. OBJETIVO

Avaliar o efeito da elevada disponibilidade de N no solo (isoladamente ou em conjunto com outros nutrientes) sobre o crescimento, a fisiologia e o metabolismo do N em mudas de espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica com diferentes graus de tolerância à sombra cultivadas em casa de vegetação.

3. HIPÓTESES

- Espécies com maior grau de tolerância à sombra são menos favorecidas ou até mesmo prejudicadas pelo aumento de N no solo do que as intolerantes, apresentando acúmulo de compostos nitrogenados em seus órgãos.

- O efeito do N sobre as plantas é alterado quando adicionado em conjunto com outros nutrientes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Vegetal

Foram utilizadas mudas de quatro espécies arbóreas da Mata Atlântica, que apresentam diferentes graus de tolerância à sombra: *Croton floribundus* Spreng. (intolerante à sombra), *Astronium graveolens* Jacq. (intolerante à sombra), *Guarea kunthiana* A. Juss. (tolerante à sombra) e *Aspidosperma polyneuron* Müll.Arg. (tolerante à sombra).

Croton floribundus é conhecida popularmente como capixingui e pertence à família Euphorbiaceae. É uma planta semidecídua, que chega a 10 metros de altura, de ocorrência principal nas bordas das florestas, podendo aparecer em clareiras no interior. Ocorre em grande parte da região Sudeste, e no Paraná. *Astronium graveolens* é conhecida popularmente como guaritá e pertence à família Anacardiaceae. É uma espécie decídua, que chega a 25 metros de altura, presente em florestas secundárias e bem distribuídas no território brasileiro, assim como no Paraguai e Bolívia (LORENZI, 1992; NETO et al., 2018).

Guarea kunthiana, conhecida popularmente como figo-do-mato, é uma árvore típica do sub-bosque, da família Meliaceae, perenifólia, frequente nos remanescentes das florestas do norte do Paraná, bem como Costa Rica, Paraguai e Bolívia (SOUZA et al., 2002). *Aspidosperma polyneuron*, popularmente conhecida como peroba-rosa, pertence à família Apocynaceae. É uma árvore perenifólia, ocupa o sub-bosque quando jovem, mas é emergente quando adulta, com alturas de 20 a 30 metros, de ocorrência no interior de floresta madura, ao longo do Brasil, em estados como Bahia, Rondônia e Paraná (LORENZI, 2002).

4.2 Tratamentos

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Londrina. As sementes foram germinadas em areia e, quando as plântulas atingiram a altura de aproximadamente 10 cm, foram transferidas para sacos de mudas de 760 cm⁻³, contendo solo

chamado Rhodic Ferrasol (FAO, 1994) (pH 5,02; matéria orgânica, 31,54 g dm⁻³; N 1,2 g dm⁻³; P = 1,0 mg dm⁻³; K = 0,14 cmol_c dm⁻³; Ca = 2,8 cmol_c dm⁻³; Mg = 1,3 cmol_c dm⁻³). Após período de aclimação (cerca de 20 dias), as mudas foram submetidas aos tratamentos de adição de nutrientes ao solo. Para avaliar o efeito apenas do N (tratamento N), o solo foi tratado com solução de (NH₄)₂SO₄ 2 mM, que é um dos fertilizantes nitrogenados mais utilizados. Para avaliar o efeito do N em conjunto com os outros nutrientes (tratamento C), utilizou-se solução nutritiva de Hoagland completa contendo todos os macro e micronutrientes (Tabela 1). Para a referência, o solo foi mantido sem adição de nutrientes, realizando apenas a irrigação com água. Foram aplicados 50 mL das soluções uma vez na semana. Foram dez repetições de cada tratamento por espécie. As mudas foram mantidas por um período de 60 dias em casa de vegetação com sombrite (aproximadamente 92% de sombra), a fim de obter uma radiação fotossinteticamente ativa próxima à dos fragmentos florestais.

Tabela 1. Composição de sais da solução nutritiva de Hoagland completa e suas concentrações finais*.

Sal	Concentração
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 mM
KH ₂ PO ₄	1 mM
K ₂ SO ₄	2 mM
MgSO ₄ .7H ₂ O	2 mM
CaCl ₂ .2H ₂ O	2 mM
FeSO ₄ EDTA	100 µM
H ₃ BO ₃	92,5 µM
MnCl ₂ .4H ₂ O	18 µM
ZnCl ₂	1,5 µM
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,56 µM
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,662 µM

* Solução de Hoagland modificada por Oliveira et al. (2017).

4.3 Análises Biométricas

Foram avaliados os seguintes parâmetros biométricos das plantas: comprimento da parte aérea (cm); área foliar total (cm²), utilizando-se um integrador de área foliar LI-3000C (LI-COR Biosciences, Estados Unidos); e massa seca de folhas, caule e raízes. Foi calculada também a área foliar específica (AFE) e a razão raiz/parte aérea (RRPA) conforme as equações abaixo:

$$AFE = \frac{\text{Área foliar total}}{\text{Massa seca folha}}$$

$$RRPA = \frac{\text{Massa seca raiz}}{\text{Massa seca folha} + \text{Massa seca caule}}$$

Para a determinação da massa seca, as diferentes partes dos indivíduos foram separadas e acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa a 60°C por aproximadamente três dias até atingirem massa constante. As raízes, antes da secagem, foram lavadas em água corrente com o auxílio de peneiras evitando desestruturar a raiz e não perder material.

4.4 Análises Fisiológicas

Análises de fotossíntese líquida, condutância estomática, transpiração e concentração intercelular de CO₂ da folha mais jovem completamente expandida foram realizadas no período da manhã (8 às 10 a.m.), utilizando-se um analisador de gases por infravermelho (Irga) modelo LI-6400 XT (LI-COR Biosciences, Estados Unidos) conectado a uma câmara de 6 cm², ajustada para uma radiação fotossinteticamente ativa saturante (1500 μmol m⁻² s⁻¹) e fluxo de 400 mL min⁻¹. A eficiência no uso da água (EUA) foi calculada conforme a equação abaixo:

$$EUA = \frac{\text{Fotossíntese líquida}}{\text{Transpiração}}$$

4.5 Análises Metabólicas

Uma amostra de 0,2 g das duas folhas mais jovens completamente expandidas foi triturada em N₂ líquido e os compostos de baixo peso molecular (aminoácidos livres, NO₃⁻ e NH₄⁺) foram extraídos com 2 mL de solução de MCW (metanol:clorofórmio:água, 12:5:3, v:v:v) por 24 h (OLIVEIRA; SODEK, 2013). Após centrifugação a 1800 g por 30 min, foram adicionados 1 volume de clorofórmio e 1,5 volume de água a cada 4 volumes do sobrenadante obtido. A fase aquosa foi separada após 24 h e mantida a 37 °C por 15 h para concentração da amostra, antes de ser congelada.

A seiva do xilema foi extraída a partir de caules utilizando-se uma câmara de pressão do tipo Schölander.

Os níveis de NO₃⁻, NH₄⁺ e aminoácidos nas folhas e seiva do xilema foram determinados colorimetricamente utilizando o espectrofotômetro SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA). O NO₃⁻ foi determinado após sua redução a NO₂⁻ pela ação do catalisador cloreto de vanádio (VCl₃ 0,4% em HCl 0,5 M). O NO₂⁻ resultante foi detectado pelo reagente de Griess (sulfanilamida 1% em HCl 1,5 M seguida da adição de N-naftil-etilenodiamina 0,02%) e leitura da absorbância a 540 nm (MIRANDA, ESPEY, WINK; 2001).

O NH₄⁺ foi determinado pela reação de Berthelot com a adição sequencial dos reagentes 1 (fenol 1% e nitroprussiato de sódio 0,2 mM) e 2 (NaOH 125 mM, Na₂HPO₄ 150 mM e NaClO 0,12%). Após a reação de 35 min a 37 °C, o conteúdo de NH₄⁺ foi determinado pela leitura da absorbância a 625 nm (MCCULLOUGH, 1967).

O conteúdo de aminoácidos livres totais foi determinado utilizando tampão citrato 0,2 M (pH 5), ninhidrina 5% e KCN 0,01 M (os dois últimos diluídos em metilcelusolve). Os tubos foram mantidos fechados por 20 min a 100 °C. Ao final, foi adicionado etanol 60% e a quantificação realizada pela leitura da absorbância a 570 nm (YEMM; COCKING, 1955).

As proteínas solúveis totais nas folhas foram extraídas a partir do resíduo do MCW. Após lavagem do precipitado com água seguida de centrifugação, adicionou-se 1 mL de NaOH 0,1 M, o qual foi incubado por 24 horas para depois ser feita a dosagem de as proteínas utilizando o reagente Comassie Blue (BRADFORD, 1976),

A atividade da enzima nitrato redutase (NR) foi determinada *in vivo* conforme descrito por Stewart et al. (1986). Utilizaram-se amostras segmentadas de folha

(0,15 g), que foram incubadas em seringas contendo o tampão de reação (K_2HPO_4 0,05 M pH 7,5; propanol 1%; KNO_3 0,05 M), mantidas sob vácuo no escuro. Após 40 minutos, uma alíquota do meio foi coletada para a dosagem do NO_2^- formado a partir do substrato NO_3^- , utilizando-se o reagente de Griess.

O conteúdo de N total foi obtido a partir da digestão sulfúrica de 0,1 g de folhas secas em 1,5 mL de ácido sulfúrico P.A., na presença de catalisador (0,05 g de $K_2SO_4 + CuSO_4$ 10:1, m/m), a 350 °C. Após a digestão, o material foi diluído em água destilada (1/2000). Em seguida, foi aplicado o método verde de salicilato (WILLIS, MONTGOMEY, ALLEN, 1996), adicionando, a 1 mL do material diluído, 1 mL do reagente A (ácido cítrico 50 g L⁻¹, citrato de sódio 50 g L⁻¹ e NaOH 25 g L⁻¹), 1 mL do reagente B (nitroprussiato de sódio 1,0 g L⁻¹) e 1 mL do reagente C (NaClO 0,15%). Após 1 h, foi realizada leitura a 697 nm em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific).

4.6 Análise Estatística

Os tratamentos foram dispostos em delineamento experimental inteiramente casualizado. Em cada tratamento, quatro réplicas biológicas foram utilizadas para as análises metabólicas, enquanto as dez réplicas foram utilizadas para as análises biométricas e fisiológicas. Depois de testadas a normalidade (Shapiro-Wilk) e a homogeneidade das variâncias (Bartlett), os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e, quando significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Fisher ao nível de 5% de significância com o software Statistica12. Quando não atendidos os pressupostos, os dados foram transformados em \log_{10} ou raiz quadrada.

Também foram realizadas análises de componentes principais (ACP) para se comparar as respostas das espécies à adição de nutrientes. Para cada variável, calcularam-se as razões entre a média do tratamento N e a referência (N/R) e entre a média do tratamento C e a referência (C/R) dentro de uma mesma espécie. As razões foram transformadas em \log_{10} para dar o mesmo peso para os efeitos positivos e negativos dos tratamentos. Esses dados foram utilizados para construir uma ACP com as variáveis biométricas e fisiológicas e outra com variáveis metabólicas, com o uso do software PAST3 (HAMMER; HARPER; RYAN; 2001).

5 RESULTADOS

5.1 Parâmetros Biométricos e Fisiológicos

Os tratamentos N e C induziram um aumento da massa seca do caule e da folha, da área foliar e da área foliar específica das mudas de *C. floribundus* em relação à referência, ao passo que a razão raiz/parte aérea foi reduzida pelos mesmos tratamentos (Tabela 2). Todavia, os efeitos do tratamento C nesses parâmetros foram mais pronunciados que os induzidos por N.

Nas mudas de *A. graveolens*, a adição de N levou a uma redução da massa seca do caule e do comprimento da parte aérea em relação à referência. Por outro lado, houve aumento da massa seca do caule, massa seca da folha, comprimento da parte aérea e área foliar, bem como diminuição da razão raiz/parte aérea, quando submetidas ao tratamento C (Tabela 2).

Nas mudas de *G. kunthiana*, o único parâmetro biométrico afetado foi a massa seca do caule, apresentando diminuição nos indivíduos tratados com N (Tabela 2). Em *A. polyneuron*, os dois tratamentos não afetaram nenhum dos parâmetros morfológicos avaliados (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros biométricos de mudas de *Croton floribundus* (Cf), *Astronium graveolens* (Ag), *Guarea kunthiana* (Gk) e *Aspidosperma polyneuron* (Ap) suplementadas no solo com apenas nitrogênio (N) ou solução nutritiva completa (C). As plantas referência (R) receberam apenas água.

Espécies	Cf			Ag			Gk			Ap		
	R	N	C	R	N	C	R	N	C	R	N	C
MSR (g) ¹	0,306 ± 0,025 ^a	0,329 ± 0,020 ^a	0,345 ± 0,029 ^a	0,045 ± 0,004 ^a	0,042 ± 0,005 ^a	0,052 ± 0,006 ^a	0,393 ± 0,030 ^a	0,343 ± 0,028 ^a	0,372 ± 0,026 ^a	0,120 ± 0,009 ^a	0,156 ± 0,011 ^a	0,141 ± 0,008 ^a
MSC (g)	0,258 ± 0,019 ^b	0,343 ± 0,021 ^b	0,548 ± 0,043 ^a	0,033 ± 0,003 ^a	0,024 ± 0,002 ^a	0,088 ± 0,032 ^a	0,260 ± 0,017 ^a	0,223 ± 0,011 ^b	0,258 ± 0,018 ^a	0,092 ± 0,008 ^a	0,076 ± 0,007 ^a	0,076 ± 0,004 ^a
MSF (g)	0,361 ± 0,039 ^c	0,492 ± 0,036 ^b	0,601 ± 0,036 ^a	0,027 ± 0,003 ^b	0,028 ± 0,002 ^b	0,102 ± 0,013 ^a	0,300 ± 0,033 ^a	0,241 ± 0,033 ^a	0,300 ± 0,046 ^a	0,056 ± 0,015 ^a	0,054 ± 0,008 ^a	0,072 ± 0,014 ^a
RRPA (g g⁻¹)	0,504 ± 0,019 ^a	0,405 ± 0,030 ^b	0,302 ± 0,018 ^c	0,945 ± 0,239 ^a	0,894 ± 0,129 ^a	0,324 ± 0,043 ^b	0,748 ± 0,084 ^a	0,769 ± 0,070 ^a	0,731 ± 0,095 ^a	0,778 ± 0,090 ^a	0,957 ± 0,104 ^a	0,907 ± 0,984 ^a
CPA (cm)	16,32 ± 0,674 ^b	18,3 ± 0,957 ^b	23,53 ± 1,123 ^a	9,717 ± 1,045 ^b	5,164 ± 0,377 ^c	12,52 ± 0,767 ^a	11,64 ± 0,483 ^a	11,76 ± 0,476 ^a	12,81 ± 0,426 ^a	9,68 ± 0,409 ^a	10,8 ± 0,423 ^a	10,96 ± 0,296 ^a
AF (cm²)	137,4 ± 15,71 ^c	193,4 ± 16,25 ^b	262,0 ± 13,42 ^a	7,576 ± 0,799 ^b	8,466 ± 0,668 ^b	33,24 ± 4,589 ^a	58,92 ± 6,317 ^a	48,84 ± 7,546 ^a	61,12 ± 10,73 ^a	25,97 ± 2,38 ^a	20,18 ± 2,13 ^a	26,41 ± 2,035 ^a
AFE (cm² g⁻¹)	378,4 ± 10,29 ^c	400,3 ± 7,889 ^b	446,3 ± 6,680 ^a	283,9 ± 15,51 ^a	281,1 ± 11,71 ^a	308,8 ± 10,34 ^a	195,3 ± 4,509 ^a	195,6 ± 6,093 ^a	194,3 ± 4,862 ^a	615,2 ± 283,9 ^a	407,9 ± 34,73 ^a	343,1 ± 55,66 ^a

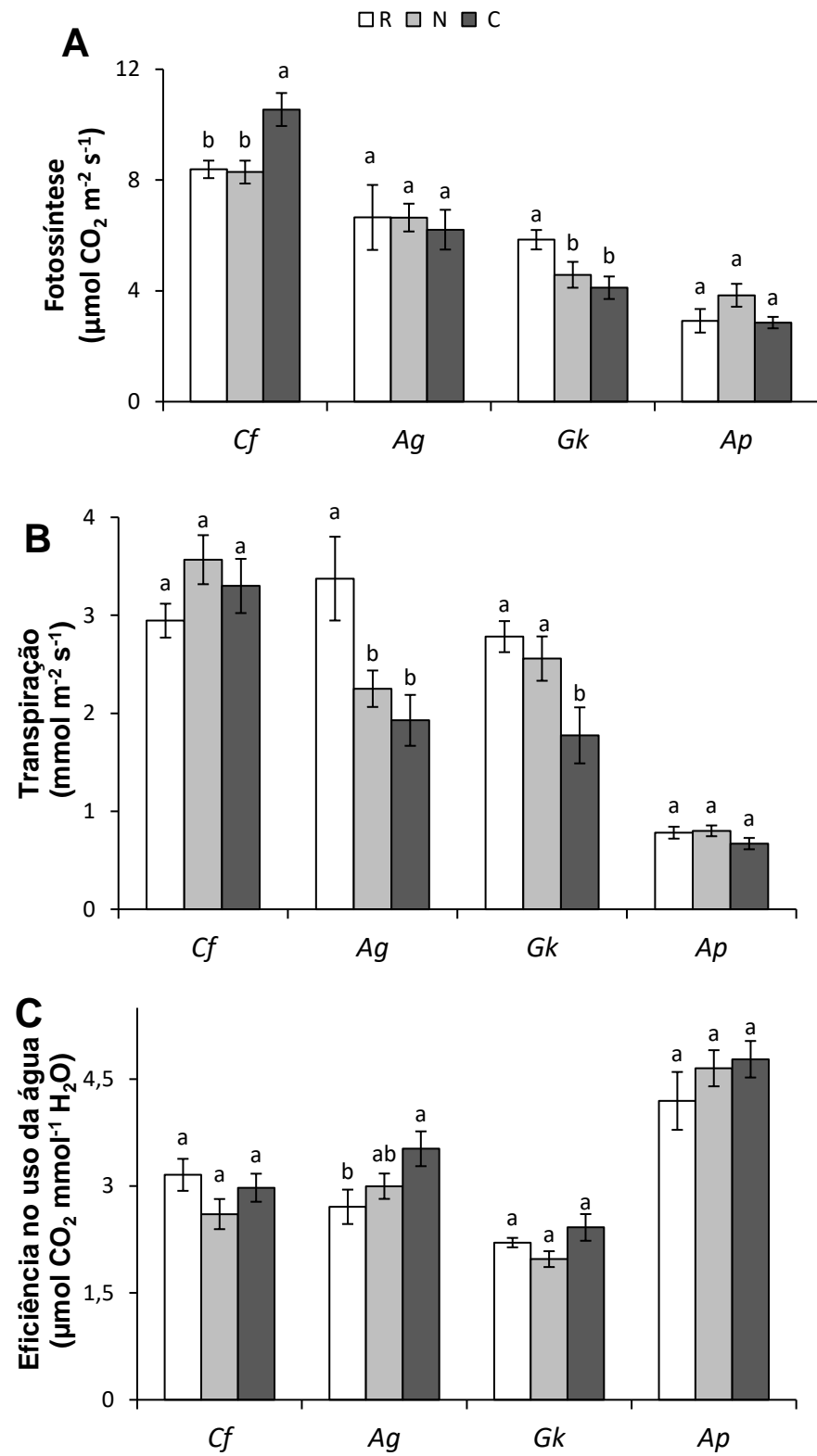
¹ MSR, massa seca da raiz; MSC, massa seca do caule; MSF, massa seca da folha; RRPA, razão raiz/parte aérea; CPA, comprimento da parte aérea; AF, área foliar; AFE, área foliar específica.

² Os valores representam médias ± erro padrão (n=10). Letras iguais em uma mesma espécie indicam valores que não se diferem conforme ANOVA seguida de teste de Fisher (p<0,05).

O tratamento N levou apenas a um aumento da concentração intercelular de CO₂ em relação à referência em folhas de *C. floribundus* (Figura 2) Já o tratamento C teve um efeito positivo na fotossíntese líquida dessa mesma espécie.

Mudas de *A. graveolens* tratadas com N apresentaram somente menor transpiração e condutância estomática que as da referência. O tratamento C reduziu a transpiração, a condutância estomática e a concentração intercelular de CO₂ em folhas de *A. graveolens*, sem afetar a fotossíntese líquida, o que levou a um aumento da eficiência no uso da água.

O tratamento C também teve um efeito negativo na transpiração e na condutância estomática de *G. kunthiana*, acompanhado de uma redução da fotossíntese líquida. Já o tratamento N resultou apenas em uma queda da fotossíntese líquida. O único efeito de ambos os tratamentos nas trocas gasosas de folhas de *A. polyneuron* foi uma diminuição da concentração intercelular de CO₂ em relação à referência (Figura 2).



(CONTINUA)

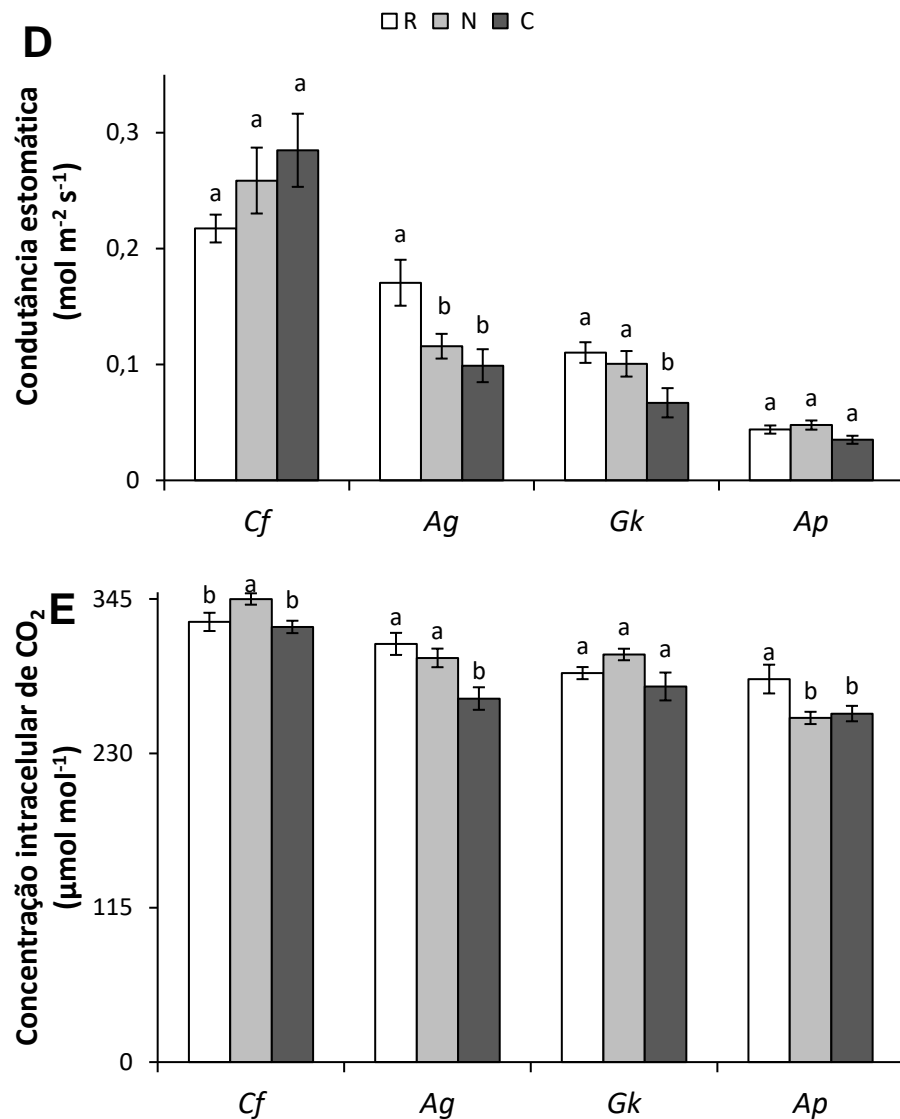


Figura 2. Fotossíntese líquida (A), transpiração (B), eficiência no uso da água (C), condutância estomática (D) e concentração intercelular de CO_2 (E) nas mudas de *Croton floribundus* (*Cf*), *Astronium graveolens* (*Ag*), *Guarea kunthiana* (*Gk*) e *Aspidosperma polyneuron* (*Ap*) tratadas com água (Referência: R), apenas com adição de nitrogênio (N) e com solução nutritiva completa (C). As barras na porção superior das colunas representam o erro padrão ($n = 10$). Letras iguais em uma mesma espécie indicam valores que não diferem conforme ANOVA seguida de teste de Fisher ($p < 0,05$).

5.2 Análises Metabólicas

As respostas metabólicas à adição de nutrientes são apresentadas abaixo através de gráficos de radar construídos a partir das razões N/R e C/R

transformadas em \log_{10} (Figuras 3, 4, 5 e 6). As médias e erros padrão referentes aos parâmetros metabólicos podem ser verificados no Anexo 1.

O conteúdo de NO_3^- nas folhas e na seiva do xilema aumentou em mudas de *C. floribundus* tratadas com N (Figura 3). Por outro lado, ao avaliar a seiva do xilema de mudas tratadas com C, houve diminuição no conteúdo de NO_3^- . O tratamento com a solução completa também reduziu os níveis de aminoácidos e proteínas nas folhas de *C. floribundus*. Os demais parâmetros metabólicos dessa espécie não foram afetados significativamente por nenhum dos tratamentos.

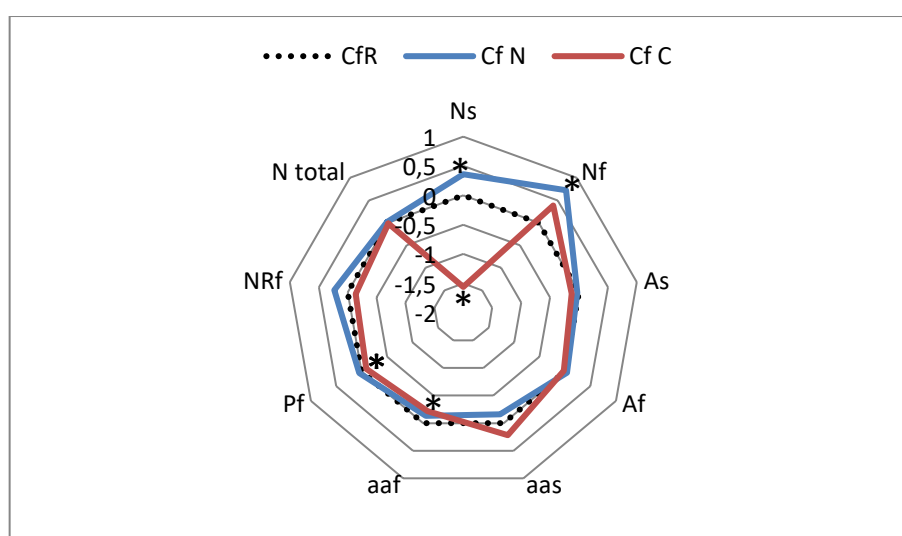


Figura 3. Respostas metabólicas de mudas de *Croton floribundus* (Cf) à adição de nitrogênio (N) e de solução nutritiva completa (C), em relação às mudas regadas apenas com água (referência: R). **Ns**: conteúdo de nitrito na seiva do xilema; **Nf**: conteúdo de nitrito na folha; **As**: conteúdo de amônio na seiva do xilema; **Af**: conteúdo de amônio na folha; **aas**: conteúdo de aminoácidos livres totais na seiva do xilema; **aaf**: conteúdo de aminoácidos livres totais na folha; **Pf**: conteúdo de proteínas solúveis totais na folha; **NRf**: atividade da enzima nitrato redutase na folha; **N total**: conteúdo de N total folha. Áreas acima e abaixo de 0 indicam, respectivamente, aumento e diminuição em relação à referência. Asteriscos indicam diferença significativa entre o tratamento e a referência de acordo com ANOVA seguida de teste de Fisher ($p < 0,05$).

Em mudas de *A. graveolens*, o tratamento N levou apenas a um aumento do conteúdo de proteínas nas folhas e de NH_4^+ na seiva do xilema (Figura 4). Já o tratamento C afetou a maioria dos parâmetros analisados nas folhas, de forma que os níveis de aminoácidos, proteínas e N total e a atividade NR aumentaram e os níveis de NH_4^+ diminuíram. Também houve uma tendência de diminuição do

conteúdo foliar de NO_3^- . Já na seiva do xilema, o único efeito significativo do tratamento C foi a redução do conteúdo de aminoácidos.

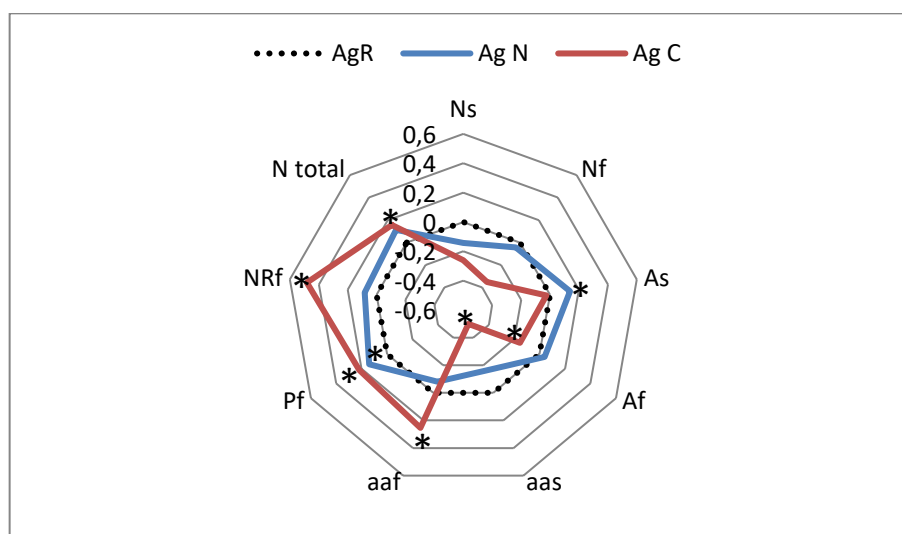


Figura 4. Respostas metabólicas de mudas de *Astronium graveolens* (Ag) à adição de nitrogênio (N) e de solução nutritiva completa (C), em relação às mudas regadas apenas com água (referência: R). **Ns**: conteúdo de nitrato na seiva do xilema; **Nf**: conteúdo de nitrato na folha; **As**: conteúdo de amônio na seiva do xilema; **Af**: conteúdo de amônio na folha; **aas**: conteúdo de aminoácidos livres totais na seiva do xilema; **aaf**: conteúdo de aminoácidos livres totais na folha; **Pf**: conteúdo de proteínas solúveis totais na folha; **NRf**: atividade da enzima nitrato redutase na folha; **N total**: conteúdo de N total folha. Áreas acima e abaixo de 0 indicam, respectivamente, aumento e diminuição em relação à referência. Asteriscos indicam diferença significativa entre o tratamento e a referência de acordo com ANOVA seguida de teste de Fisher ($p < 0,05$).

O tratamento com N aumentou os níveis de NO_3^- , aminoácidos e N total nas folhas de *G. kunthiana*, enquanto os níveis de NH_4^+ na seiva do xilema foram reduzidos pelo mesmo tratamento (Figura 5). O tratamento C aumentou o conteúdo de N total e de proteínas nas folhas dessa espécie, ao passo que o conteúdo de NO_3^- foi reduzido. Esse tratamento também reduziu os níveis de aminoácidos e NH_4^+ na seiva do xilema. A atividade NR e o conteúdo de NH_4^+ nas folhas de *G. kunthiana* não foram afetados por nenhum dos tratamentos.

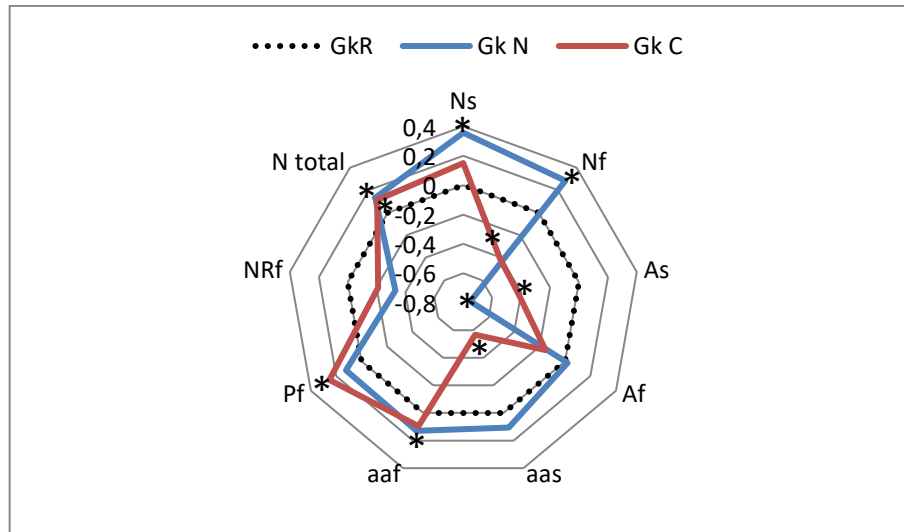


Figura 5. Respostas metabólicas de mudas de *Guarea kunthiana* (Gk) à adição de nitrogênio (N) e de solução nutritiva completa (C), em relação às mudas regadas apenas com água (referência: R). **Ns**: conteúdo de nitrato na seiva do xilema; **Nf**: conteúdo de nitrato na folha; **As**: conteúdo de amônio na seiva do xilema; **Af**: conteúdo de amônio na folha; **aas**: conteúdo de aminoácidos livres totais na seiva do xilema; **aaf**: conteúdo de aminoácidos livres totais na folha; **Pf**: conteúdo de proteínas solúveis totais na folha; **NRf**: atividade da enzima nitrato redutase na folha; **N total**: conteúdo de N total folha. Áreas acima e abaixo de 0 indicam, respectivamente, aumento e diminuição em relação à referência. Asteriscos indicam diferença significativa entre o tratamento e a referência de acordo com ANOVA seguida de teste de Fisher ($p < 0,05$).

Ambos os tratamentos resultaram em um aumento do conteúdo de NO_3^- , aminoácidos, proteínas e N total nas folhas de *A. polyneuron* (Figura 6). Apenas o tratamento com N levou à diminuição dos níveis de NH_4^+ na folha, bem como ao aumento da atividade NR foliar e do conteúdo de aminoácidos na seiva do xilema. Já os níveis de NO_3^- e NH_4^+ na seiva do xilema não foram afetados significativamente em *A. polyneuron*.

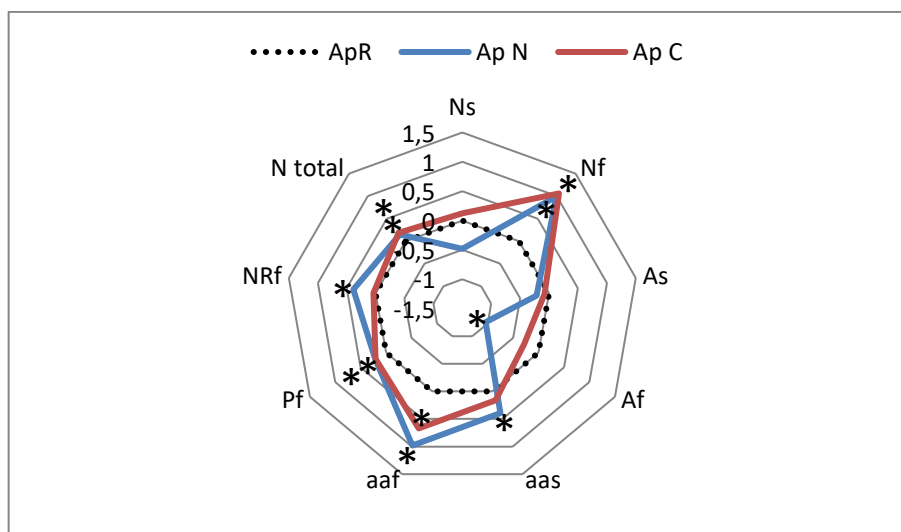


Figura 6. Respostas metabólicas de mudas de *Aspidosperma polyneuron* (*Ap*) à adição de nitrogênio (N) e de solução nutritiva completa (C), em relação às mudas regadas apenas com água (referência: R). **Ns:** conteúdo de nitrato na seiva do xilema; **Nf:** conteúdo de nitrato na folha; **As:** conteúdo de amônio na seiva do xilema; **Af:** conteúdo de amônio na folha; **aas:** conteúdo de aminoácidos livres totais na seiva do xilema; **aaf:** conteúdo de aminoácidos livres totais na folha; **Pf:** conteúdo de proteínas solúveis totais na folha; **NRf:** atividade da enzima nitrato redutase na folha; **N total:** conteúdo de N total folha. Áreas acima e abaixo de 0 indicam, respectivamente, aumento e diminuição em relação à referência. Asteriscos indicam diferença significativa entre o tratamento e a referência de acordo com ANOVA seguida de teste de Fisher ($p < 0,05$).

5.3 Análises Multivariadas

A ACP baseada nos dados biométricos e fisiológicos (Figura 7) explicou cerca de 76% da variância dos dados nos dois primeiros componentes principais (CP1 = 41,5%; CP2= 34,6%). A maior parte das variáveis (transpiração, condutância estomática, fotossíntese líquida, massa seca folha, massa seca do caule, massa seca da raiz, comprimento parte aérea, área foliar e área foliar específica) se encontrou na parte positiva do componente 1. A resposta de *C. floribundus* ao tratamento N e, principalmente, a resposta dessa espécie ao tratamento C se relacionaram positivamente com essas variáveis e negativamente com a razão raiz/parte aérea (localizada na porção negativa do componente 1). Esses resultados indicam que *C. floribundus* foi a espécie cujo crescimento e fisiologia responderam mais positivamente aos tratamentos realizados.

A resposta de *A. graveolens* ao tratamento C apresentou relação positiva com a área foliar, a massa seca da folha e a eficiência no uso da água, além de relação negativa com a razão raiz/parte aérea. Já a resposta de *A. graveolens* ao tratamento N, bem como as respostas de *G. kunthiana* aos tratamentos N e C, se relacionaram negativamente com a maior parte dos parâmetros biométricos e fisiológicos, indicando a indução de efeitos deletérios. *Aspidosperma polyneuron* foi a espécie cujo crescimento e fisiologia foram menos responsivos aos dois tratamentos, estando localizada muito próximo à intersecção dos eixos.

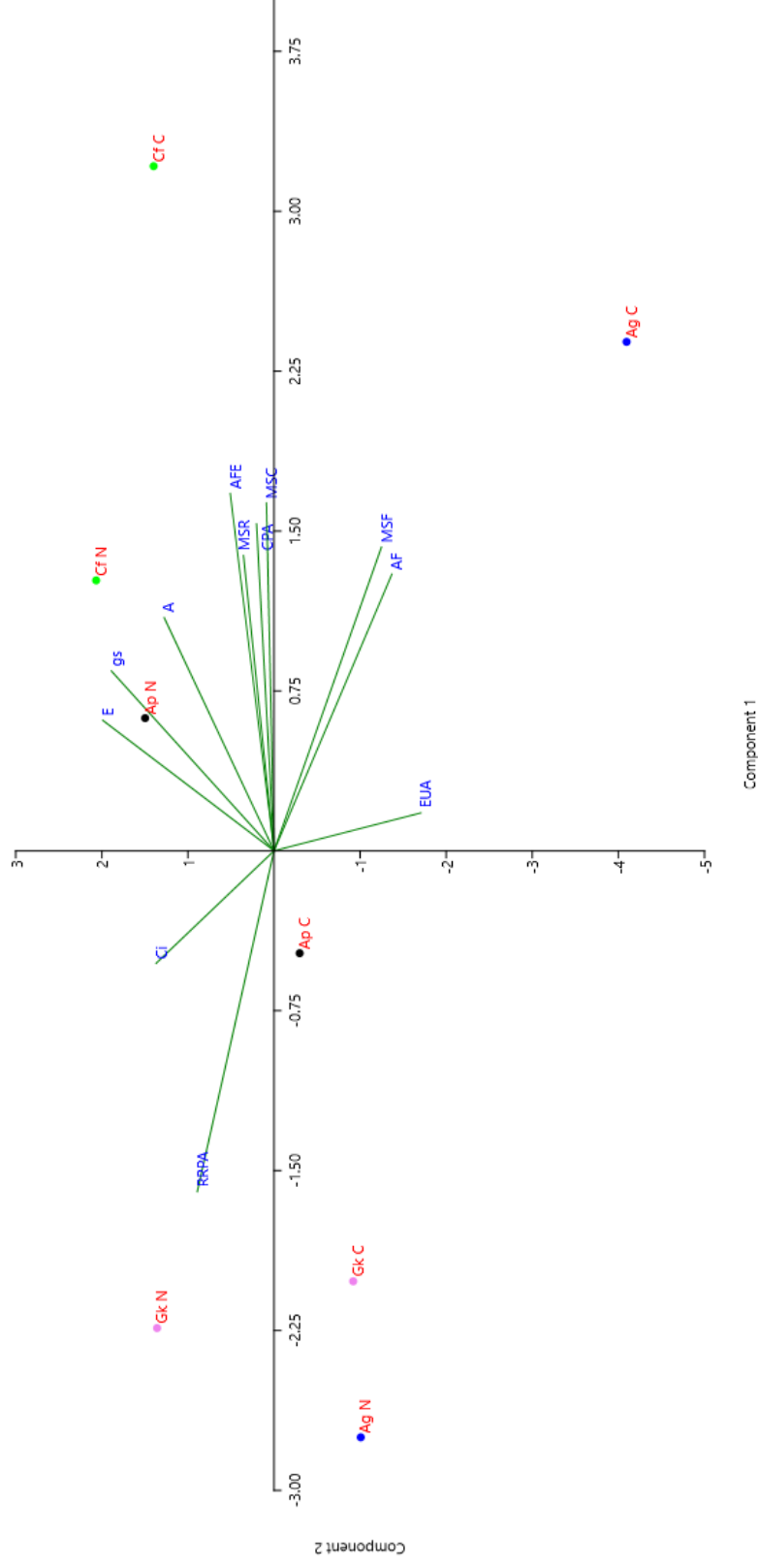


Figura 7. Análise de componentes principais baseada nas respostas dos parâmetros biométricos e fisiológicos de *Croton floribundus* (Cf), *Astronium graveolens* (Ag), *Guarea kunthiana* (Gk) e *Aspidosperma polyneuron* (Ap) aos tratamentos apenas com nitrogênio (N) e com solução nutritiva completa (C), em relação à referência sem adição de nutrientes. A, fotossíntese líquida; AF, área foliar; AFE, área foliar específica; Ci, concentração intercelular de CO₂; CPA, comprimento da parte aérea; EUA, eficiência no uso da água; gs, condutância estomática; MSC, massa seca do caule; MSF, massa seca da folha; MSR, massa seca da raiz; RRPA, razão raiz/parte aérea. Eixo 1 - 41,5%; Eixo 2 - 34,6%.

A ACP baseada nos dados metabólicos (Figura 8) explicou cerca de 66% da variância dos dados nos dois primeiros componentes principais (CP1 = 38,3%; CP2= 28,1%). Todas as variáveis (com exceção dos níveis de NH_4^+ na folha e na seiva do xilema) se encontraram na parte positiva do componente 1, se relacionando positivamente com as respostas de *A. polyneuron* a ambos os tratamentos. Ao avaliar o componente 2, nota-se uma relação mais importante da resposta ao tratamento C com o conteúdo de proteínas e N total nas folhas, e da resposta ao tratamento N com aminoácidos, NO_3^- e NR na folha e aminoácidos na seiva. Além disso, houve uma forte relação negativa das respostas de *A. polyneuron* com o conteúdo de NH_4^+ na folha. Dessa forma, *A. polyneuron* se destacou como a espécie mais responsiva metabolicamente aos tratamentos realizados.

As demais espécies foram pouco responsivas ao tratamento N, estando localizadas próximas à intersecção dos eixos. Considerando o tratamento C, houve uma forte relação negativa da resposta de *C. floribundus* com o conteúdo de NO_3^- na seiva do xilema e de proteínas e N total na folha. *Astronium graveolens* e *G. kunthiana* foram pouco responsivas mesmo ao tratamento C, sendo possível notar no componente 2 apenas uma relação positiva das respostas dessas espécies com o conteúdo de proteína e N total.

É importante destacar que o conteúdo de NH_4^+ na seiva do xilema foi a variável que apresentou menor contribuição para a ACP, seguida da atividade NR foliar, o que indica que essas variáveis são pouco responsivas aos tratamentos testados.

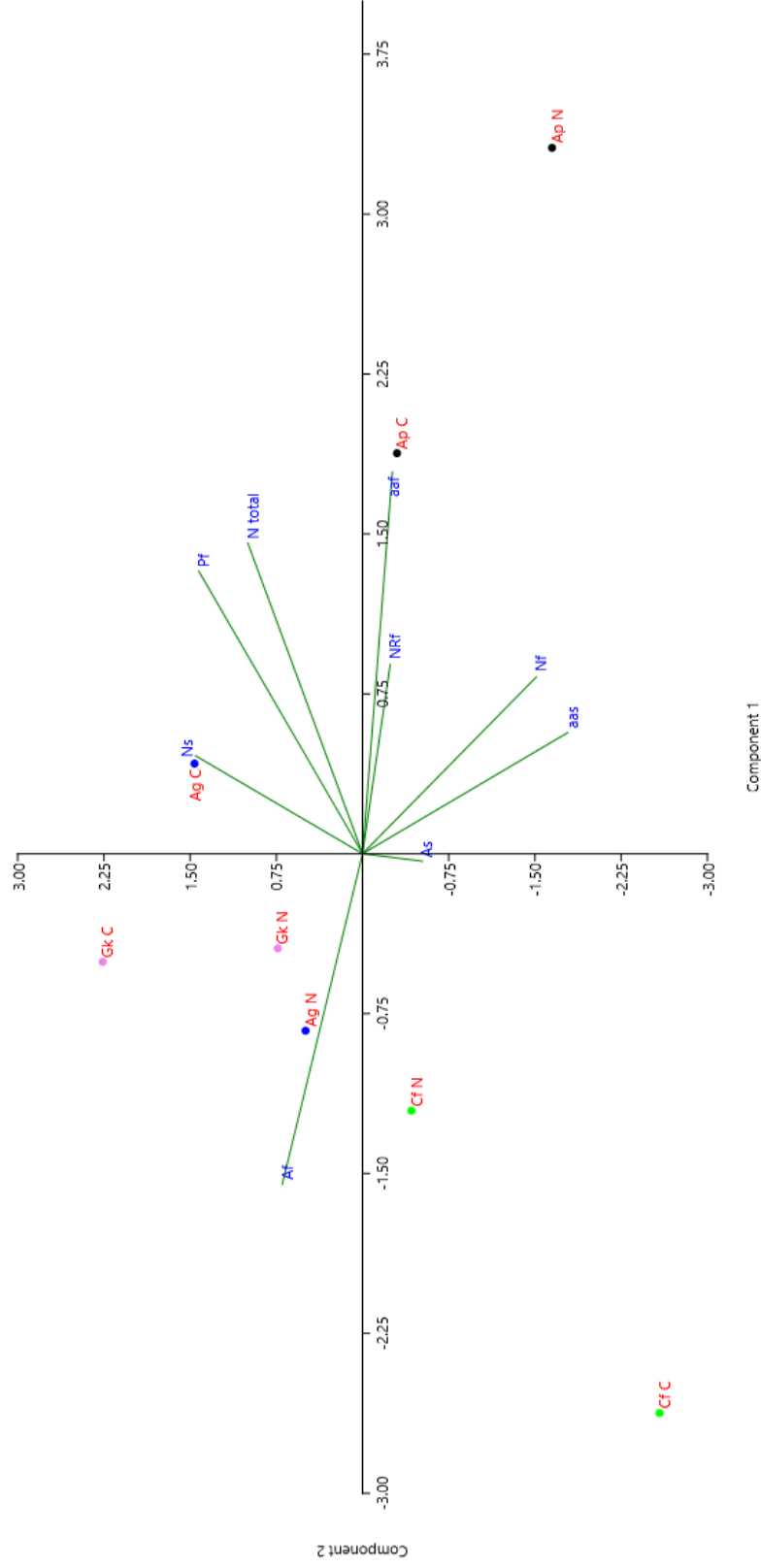


Figura 8. Análise de componentes principais baseada nas respostas dos parâmetros metabólicos de *Croton floribundus* (Cf), *Astronium graveolens* (Ag), *Guarea kunthiana* (Gk) e *Aspidosperma polyneuron* (Ap), aos tratamentos apenas com nitrogênio (+N) e com solução nutritiva completa (+C), em relação à referência sem adição de nutrientes. Af, amônio na folha; As, amônio na seiva do xilema; aaf, aminoácidos totais na folha; aas, aminoácidos totais na seiva do xilema; Nf, nitrato na folha; NRF, atividade da enzima nitrato redutase; Ns, nitrato na seiva do xilema; N total, conteúdo de N total; Pf, proteínas solúveis totais na folha. Eixo 1 - 38,3%; Eixo 2 - 28,1%.

6. DISCUSSÃO

Foi possível observar uma relação entre o grau de tolerância à sombra e as respostas das mudas aos tratamentos. *Croton floribundus* (intolerante à sombra) respondeu à adição de N com aumento das trocas gasosas foliares e do crescimento. Por outro lado, a espécie mais tolerante à sombra (*A. polyneuron*) não foi afetada no crescimento e na fisiologia pelo mesmo tratamento, mas apresentou alterações metabólicas que indicam acúmulo de N. Já *G. kunthiana* e *A. graveolens* apresentaram respostas intermediárias. Além disso, houve diferença entre os efeitos da adição de N isoladamente ou em conjunto com outros nutrientes sobre os parâmetros avaliados.

Croton floribundus foi a espécie que mais respondeu ao aumento de N em termos de fisiologia e crescimento. Apesar de a adição de N isoladamente já ter tido um efeito positivo sobre os parâmetros biométricos e fisiológicos, a resposta foi mais intensa quando outros nutrientes foram adicionados em conjunto. Essa resposta positiva à adição de nutrientes ocorreu mesmo nas condições de baixa luminosidade, utilizadas neste experimento com o intuito de simular o ambiente de sub-bosque de uma floresta tropical. Dessa forma, o aumento do suprimento dos nutrientes pode alterar os padrões de alocação dos mesmos e aumentar o crescimento, mesmo quando há baixa irradiância (SANTIAGO et al., 2012). Nas mudas de *C. floribundus*, houve maior investimento em parte aérea, nos dois tratamentos, o que indica maior aproveitamento da energia luminosa (SANTOS et al., 2003). O aumento da área foliar específica nos dois tratamentos confirma o que foi encontrado por Cárate-Tandalla, Leuschner, Homeier (2015), em que mudas de *Pouteria torta* responderam à adição de N aumentando esse parâmetro em mais de 40%. Assim, em curto prazo, essa espécie poderia ser favorecida pelo aumento de N no solo, resultando em crescimento rápido. Porém, em longo prazo, esse maior investimento em parte aérea em detrimento à raiz (conforme indicado pela menor razão raiz/parte aérea) pode causar efeitos negativos no desempenho dessa espécie em condições de déficit hídrico, devido à limitação na obtenção de água. Além disso, o maior investimento em área foliar e a menor esclerofilia podem implicar em maior perda de água por transpiração (CORREA et al., 2008).

Na espécie intolerante à sombra, *A. graveolens*, o tratamento N apresentou um efeito negativo no comprimento da parte aérea, enquanto C induziu respostas positivas no crescimento e na fisiologia. Semelhante a *C. floribundus*, as mudas de *A. graveolens* também investiram mais em parte aérea quando tratadas com todos os nutrientes, indicando que algum deles (e não apenas o N) estava sendo limitante para o crescimento. O P normalmente é considerado o nutriente mais limitante nos solos de florestas tropicais (DUARTE, 2007). De fato, Santiago et al. (2012) reportaram que mudas de árvores da floresta tropical do Panamá tratadas com adição de N e P apresentaram maior massa que as tratadas apenas com N, indicando que múltiplos nutrientes interagem e podem ser limitantes no crescimento dessas espécies. As mudas de *A. graveolens* responderam aos dois tratamentos reduzindo transpiração e condutância estomática, que são mecanismos de controle da perda de água, levando à maior eficiência no uso da água e compensando assim a maior área foliar e menor razão raiz/parte aérea (MOTT; FRANKS, 2001). Além disso, a função estomática pode ser limitada pela disponibilidade de nutrientes em ambientes com pouca luz (PASQUINI; SANTIAGO, 2012).

Em *G. kunthiana*, o tratamento N diminuiu a massa seca do caule, o que pode estar relacionado com a inibição da fotossíntese líquida, indicando efeito deletério do N sozinho (semelhante a *A. graveolens*). Mao et al. (2018) também encontraram menores taxas fotossintéticas quando adicionado N em grande quantidade em espécies moderadamente tolerantes à sombra. Além disso, o aumento da disponibilidade de N pode resultar em um desequilíbrio nutricional, limitando a captação de nutrientes como K, Ca e Mg pelas raízes. Estudos já mostraram que a capacidade fotossintética diminui quando há diminuição no conteúdo foliar de Ca e Mg (MAO et al., 2018). Por outro lado, quando o N foi adicionado com outros nutrientes, não houve diferença no crescimento, apesar de a fotossíntese líquida, condutância estomática e transpiração terem diminuído. Assim, outros nutrientes podem estar contrabalanceando parcialmente o efeito negativo do aumento de N.

Já *A. polyneuron* não apresentou alterações nos biométricos em resposta aos tratamentos. Como espécie altamente tolerante à sombra, ela apresenta metabolismo mais lento, com taxas fotossintéticas mais baixas, menor ganho de carbono e crescimento mais lento (KITAJIMA, 1994), e assim, menor demanda por nutrientes, de forma que os níveis de nutrientes no solo da referência já eram suficientes para seu crescimento nas condições do experimento. Nas trocas gasosas

de *A. polyneuron*, houve apenas um efeito negativo na concentração intracelular de CO₂, no tratamento C, que não afetou a fotossíntese.

Apesar de não ter apresentado muitas mudanças nos parâmetros biométricos e fisiológicos, *A. polyneuron* foi a espécie que apresentou mais alterações metabólicas em resposta à adição de N e outros nutrientes. Como possui metabolismo mais lento, os compostos em excesso ficam armazenados nas células, gerando acúmulo de NO₃⁻, proteínas e N total nas folhas, que aconteceu tanto em N como em C. O acúmulo de NO₃⁻ pode induzir a atividade da NR na folha, pois é o substrato pra ativação da enzima (KAISER; HUBER, 2001), ou mesmo estar relacionado com o ajuste osmótico, em que acúmulo de solutos possibilita o decréscimo do potencial osmótico e hídrico da planta, permitindo assim maior entrada de água (CHAVES-FILHO; STACCIARINI- SERAPHIN; 2001).

Em *C. floribundus*, o tratamento N aumentou a concentração de NO₃⁻ na seiva do xilema e na folha, indicando a translocação deste composto até a folha, onde o N é preferencialmente assimilado nas espécies pioneiras (AIDAR et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2017; DEBIASI et al., 2019). Apesar disso, a adição de N não resultou em um aumento no conteúdo de proteínas solúveis totais e de N total na folha de *C. floribundus*, o que pode ter acontecido pela utilização desses metabólitos para a formação de novos tecidos, resultando em maior crescimento.

Em *G. kunthiana*, houve aumento de N total e no conteúdo de aminoácidos nas folhas de plantas tratadas com N, como em mudas de *Cryptocarya chinensis* (Hance) Hemsl., que também apresentou aumento no conteúdo de aminoácidos (MAO et al., 2018). Já em mudas tratadas com C, a diminuição de aminoácidos totais na seiva do xilema e o aumento do conteúdo de proteínas nas folhas indica maior assimilação de N nesse órgão. Em *A. graveolens*, quando tratadas com N, houve aumento apenas de NH₄⁺ na seiva do xilema, e proteínas nas folhas, como encontrado por Mao et al. (2018), que observaram em árvores de *Cryptocarya concinna* Hance e *C. chinensis* tratadas com N um aumento na concentração de proteínas nas folhas. Enquanto em C, houve diminuição de NH₄⁺ nas folhas e aminoácidos na seiva do xilema, e aumento na concentração de aminoácidos nas folhas, bem como N total e maior atividade da NR.

A análise geral dos parâmetros metabólicos indica que *A. polyneuron* é a espécie melhor bioindicadora, pois foi a espécie mais responsiva ao aumento de N no solo, acumulando compostos nitrogenados principalmente nas folhas. Portanto,

ela poderia ser usada em avaliações de campo em fragmentos florestais para indicar o aumento de N no solo decorrente de atividades humanas. Já *C. floribundus* apresentou respostas muito diferentes entre os tratamentos com N isolado ou em conjunto com outros nutrientes, além de ter menor acúmulo de compostos nitrogenados. Esses resultados contrastam com o encontrado por Mao et al (2018), que sugerem que as espécies intolerantes à sombra são mais sensíveis, em seu metabolismo, ao aumento de N no solo do que as tolerantes à sombra, em florestas tropicais.

Esses dados indicam a importância de avaliar mais parâmetros do metabolismo do N além do N total nas folhas, pois em várias situações o N total não respondeu ao aumento de N no solo, como pode ser visto em *C. floribundus*, que não apresentou mudanças nos valores de N total nos dois tratamentos, mas quando analisados diferentes parâmetros metabólicos, encontrou-se aumento de NO_3^- nas folhas. Além disso, a análise da seiva do xilema também é importante, pois traz informações relevantes sobre a translocação de N nas plantas. Como o nível de NH_4^+ na seiva do xilema foi pouco responsivo aos tratamentos realizados, por ser muito pouco translocado pela planta devido a sua toxicidade (BRITTO et al., 2001), ele não deve ser indicado como biomarcador, assim como a atividade da NR. Já o NO_3^- é menos tóxico e a planta pode acumular e translocar em altos níveis, sendo um bom biomarcador nas espécies avaliadas. A análise integrada de vários parâmetros metabólicos permite uma visão mais ampla do metabolismo de N, do que a simples avaliação do N total, que é mais comum na literatura.

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, foi aceita a hipótese de que espécies com maior grau de tolerância à sombra são menos favorecidas pelo aumento de N no solo que as intolerantes, apresentando maior acúmulo de compostos nitrogenados em seus órgãos. Observou-se que *A. polyneuron*, espécie de maior tolerância à sombra, apresentou maior acúmulo de compostos nitrogenados na folha, enquanto *C. floribundus*, espécie de menor tolerância à sombra, foi uma das que menos apresentou acúmulo de compostos, porém houve estímulo no crescimento de suas mudas nos tratamentos.

A hipótese de que o efeito do N sobre as plantas é alterado quando adicionado em conjunto com outros nutrientes foi aceita, pois nas análises metabólicas, para as espécies com maior grau de tolerância à sombra, observaram-se maiores alterações no acúmulo de compostos nitrogenados quando adicionado N sozinho. Já nas intolerantes à sombra, o efeito sobre o crescimento foi maior quando o N foi adicionado junto com os demais nutrientes.

Contudo, estudos em campo são essenciais para melhor entendimento da ecofisiologia das espécies arbóreas da Mata Atlântica e dinâmica dos fragmentos florestais sujeitos ao excesso de N.

8. REFERÊNCIAS

- ABER, J.D.; NADELHOFFER, K.J.; STEUDLER, P.; MELILLO, J.M. Nitrogen saturation in Northern Forest Ecosystems. **BioScience**, v.39, p.378-386, 1989.
- AIDAR, M.P.M.; SCHMIDT, S.; MOSS, G.; STEWART, G.R.; JOLY, C.A. Nitrogen use strategies of neotropical rainforest trees in threatened Atlantic Forest. **Plant, Cell and Environment**, p.389-399, 2003.
- ALMEIDA, D.S; **Recuperação ambiental da mata atlântica**. 3ª ed. Ilhéus: Editus, p. 10-14, 2016.
- BITTSÁNSZKY, A; PILINSZKY, K; GYULAI, G; KOMIVES, T. Overcoming ammonium toxicity. **Plant Science**, v. 231, p. 184-190, 2015.
- BLOOM, A.J. Nutrição mineral. In: Taiz, L; Zeiger, E. (Eds.), **Fisiologia Vegetal**. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, p. 95-116, 2009.
- BOBBINK, R.; HICKS, K.; GALLOWAY, J.; SPRANGER, T.; ALKEMADE, R.; ASHMORE, M.; BUSTAMANTE, M.; CINDERBY, S.; DAVIDSON, E.; DENTENER, F.; EMMETT, B.; ERISMAN, J.W.; FENN, M.; GILLIAM, F.; NORDIN, A.; PARDO, L.; DE VRIES, W. Global assessment of nitrogen deposition effects on terrestrial plant diversity: a synthesis. **Ecological Applications**, v.20, p. 30-59, 2010.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. **Analytical Biochemistry**, p. 248-254, 1976.
- BRITTO, D.T.; SIDDIQI, M.V.; GLASS, A.D.M.; KRONZUCKER, H.J. Futile transmembrane NH₄⁺ cycling: A cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, p. 4255-4258, 2001.
- BRITTO, D.T.; KRONZUCKER, H.J. NH₄⁺ toxicity in higher plants: a critical review. **Journal of Plant Physiology**, v. 159, p. 567–584, 2002.
- CÁRATE-TANDALLA, D.; LEUSHNER, C.; HOMIER, J. Performance of seedlings of a shade-tolerant tropical tree species after moderate addition of N and P. **Frontiers in Earth Science**, v.3, p. 75, 2015.
- CHAVES-FILHO, J.T.; STACCIARINI-SERAPHIN, E. Alteração no potencial osmótico e teor de carboidratos solúveis em plantas jovens de lobeira (*Solanum lycocarpum* St.-Hil) em resposta ao estresse hídrico. **Brazilian Journal of Botany**, v. 24, p. 199-204, 2001.
- CLELAND, E.E.; HARPOLE, W.S. Nitrogen enrichment and plant communities. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v.1195, p. 46-61, 2010.
- CORDEIRO, L. Fixação do Nitrogênio. KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 76-93, 2004.

CRUZ, J.L.; PELACANI, C.R.; CARVALHO, J.E.B.; SOUZA FILHO, L.F.S.; QUEIROZ, D.C. Níveis de nitrogênio e taxa fotossintética do mamoeiro "golden". **Ciência Rural**, v. 37, p. 64-71, 2007.

DEBIASI, T.V. CALZAVARA, A.K.; SILVA, L.M.I.; SILVA, J.G.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J.A.; STOLF-MOREIRA, R.; AIDAR, M.P.M.; SODEK, L.; OLIVEIRA, H.C. Nitrogen metabolism of neotropical tree seedlings with contrasting ecological characteristics. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 41, p. 131, 2019.

DÍAZ-ÁLVAREZ, E.A; LINDIG-CISNEROS, R; de la BARRERA, E. Biomonitors of atmospheric nitrogen deposition: potential uses and limitations. **Conservation Physiology**, 6(1), 2018.

DUARTE, E.M.G. **Ciclagem de nutrientes por árvores em sistemas agroflorestais na mata atlântica**. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

DURIGAN, G.; SIQUEIRA, M.F.; FRANCO, G.A.D.C. Threats to the Cerrado remnants of the state of São Paulo, Brazil. **Scientia Agricola**, v. 64, p. 355-363, 2007.

FAO. **Soil map of the world**. Roma, Italy: FAO-UNESCO, 1994.

FAQUIN, V. **Nutrição mineral de plantas**. Dissertação (Especialização em Solos e Meio Ambiente)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

GARGALLO-GARRIGA, A; WRIGHT, S.L.; SARDANS, J.; PÉREZ-TRUJILLO, M.; ORAVEC, M.; VECEROVÁ, K.; URBAN, O.; FERNÁNDEZ-MARTÍNES, M.; PARELLA, T.; PEÑULAS, J. Long-term fertilization determines different metabolomic profiles and responses in saplings of three rainforest tree species with different adult canopy position. **Plos one**, v. 5, p. 1-21, 2017.

GUARIEIRO, L.L.N.; VASCONCELLOS, P.C.; SOLCI, M.C. Poluentes atmosféricos provenientes da queima de combustíveis fósseis e biocombustíveis: uma breve revisão. **Revista Virtual de Química**, v.3, p. 434-445, 2011.

GUIDI, L.; LOREFICE, G.; PARDOSSI, A.; MALORGIO, F.; TOGNON, F.; SOLDATINI, G.F. Growth and photosynthesis of *Lycopersicon esculentum* (L.) plants as affected by nitrogen deficiency. **Biologia Plantarum**, v. 40, p. 235-244, 1998.

HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological Statistics, 2001.

HAWKESFORD, M.; HORST, W.; KICHEY, T.; LAMBERS, H.; SCHJOERRING, J.; MOLLER, I.S.; WHITE, P. Functions of macronutrients. P. Marschner (Ed.) **Marschner's mineral nutrition of higher plants**, 3ª edição, p. 135-189, 2012.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. **Embrapa**, n.13, p.38, 2001.

ISELL, F.; REICH, P.B.; TILMAN, D.; HOBBIE, S.E.; POLASKY, S.; BINDER, S. Nutrient enrichment, biodiversity loss, and consequent declines in ecosystem productivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v.110, p. 11911-11916, 2013.

JIANG, L.; TIAN, D.; MA, S.; ZHOU, X.; XU, L.; ZHU, J.; JING, X.; ZHENG, C.; SHEN, H.; ZHOU, Z.; LI, Y.; ZHU, B.; FANG, J. The response of tree growth to nitrogen and phosphorus additions in a tropical montane rainforest. **Science of the Total Environment**, v.618, p. 1046-1070, 2018.

KAISER, W.M.; HUBER, S.C. Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 1981-1989, 2001.

KANAKIDOU, M.; MYRIOKEFALITAKIS, S.; DASKALAKIS, N.; FANOUGARIS, G.; NENES, A.; BAKER, A.R.; TSIGARIDIS, K.; MIHALOPOULOS, N. **Journal of the Atmospheric Sciences**, v. 73, p. 2039-2047, 2016.

KIRKBY, E.A.; RÖMHELD, V. Micronutrients in plant physiology: functions, uptake and mobility. **The International Fertiliser Societ**, p. 52, 2007.

KITAJIMA, K. Relative importance of photosynthetic traits and allocation patterns as correlates of seedlings shade tolerance of 13 tropical trees. **Oecologia**, v. 98, p. 419-428, 1994.

KOZLOWSKI, T.T.; PALLARDY, G.S. Physiology of woody plants. **California: Academic**, p. 411, 1997.

KRAISER, T.; GRAS, D.E.; GUTIERREZ, A.G.; GONZALEZ, B.; GUTIÉRREZ, R.A. A holistic view of nitrogen acquisition in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.62, p. 1455-1466, 2011.

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

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

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

LI, Y.; SCHICHEL, B.A.; WALKER, J.T.; SCHWEDE, D.; CHEN, X.; LEHMANN, C.M.B.; PUCHALSKI, M.A.; GAY, D.A.; COLLETT JR., J.L. Increasing importance of deposition of reduced nitrogen in the United States. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, p. 5874-5879, 2016.

LI, W.; ZHANG, H.; HUANG, G.; LIU, R.; WU, H.; ZHAO, C.; MCDOWELL, N.G. Effects of nitrogen enrichment on tree carbon allocation: A global synthesis. **Global Ecology and Biogeography**, p. 1-17, 2019.

LIU, S.X.; WANG, Z.H.; STEWART, B.A. Responses of Crop Plants to Ammonium and Nitrate N. **Advances in Agronomy**, v. 118, p.205-297, 2013.

LIU, N.; WU, S.; GUO, Q.; WANG, J.; CAO, C.; WANG, J. Leaf nitrogen assimilation and partitioning differ among subtropical forest plants in response to canopy addition of nitrogen treatments. **Science of the total environment**, p. 1026-1034, 2018.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Editora Plantarum, p.352, 1992.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 2ª ed. Nova Odessa: Plantarum, p. 41-115, 2002.

LU, X.; MO, J.; GILLIAM, F.S.; ZHOU, G.; FANG, Y. Effects of experimental nitrogen additions on plant diversity in an old-growth tropical forest. **Global Change Biology**, v, 16, p. 2688-2700, 2010.

LU, X.; MO, J.; GILLIAM, F.S.; FANG, H.; ZHU, F.; FANG, Y.; ZHANG, W.; HUANG, J. Nitrogen addition shapes soil phosphorus availability in two reforested tropical forests in southern China. **Biotropica**, v. 44, p. 302-311, 2012.

MAO, Q.; LU, X.; WANG, C.; ZHOU, K.; MO, J. Responses of understory plant physiological traits to a decade of nitrogen addition in a tropical reforested ecosystem. **Forest Ecology and Management**, v. 401, p. 65-74, 2017.

MAO, Q.; LU, X.; MO, H.; GUNDERSEN, P.; MO, J. Effects of simulated N deposition on foliar nutrient status, N metabolism and photosynthetic capacity of three dominant understory plant species in a mature tropical forest. **Science of the Total Environment**, p. 555-562, 2018.

MATSON, P.A.; MCDOWELL, W.H.; TOWNSEND, A.R.; VITOUSEK, P.M. The globalization of N deposition: ecosystem consequences in tropical environments. **Biogeochemistry**, v, 46, p.67-83, 1999.

MCCULLOUGH, H. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. **Clinica Chimica Acta**, v. 17, p. 297-304, 1967.

MILLER, A.J.; CRAMER, M.D. Root nitrogen acquisition and assimilation. **Plant Soil**, v. 274, p. 1-36, 2004.

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

MO, J.; LI, D. e GUNDERSEN, P. Seedling growth response of two tropical tree species to nitrogen deposition in southern China. **European Journal of Forest Research**, v. 127, p. 275-283, 2008.

MOTT, K.A.; FRANKS, P.J. The role of epidermal turgor in stomatal interactions following a local perturbation in humidity. **Plant, Cell and Environment**, v. 24, p. 657-662, 2001.

NETO, R.L.B.; ARAÚJO, E.I.P. MACIEL, C.M.S.; PAULA, A.; TAGLIAFERRE, C. Fenologia de *Astronium graveolens* Jacq. em floresta estacional decidual em Vitória da Conquista, Bahia. **Ciência Florestal**, v. 28, p. 641-650, 2018.

OLIVEIRA, H.C.; SILVA, L.M.I.; FREITAS, L.D.; DEBIASI, T.V.; MARCHIORI, N.M.; AIDAR, M.P.M.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J.A.; STOLF-MOREIRA, R. Nitrogen use strategies of seedlings from neotropical trees species of distinct successional groups, **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 114, p. 119-127, 2017.

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

PASQUINI, S.C.; SANTIAGO, L.S. Nutrients limit photosynthesis in seedlings of a lowland tropical forest tree species. **Oecologia**, v. 168, p. 311-319, 2011.

RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.J.; HIROTA, M.M. The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed: Implications for conservation. **Biological conservation**, v. 142, p. 1141-1153, 2009.

SANTIAGO, L.S.; WRIGHT, S.J.; HARMS, K.E.; YAVITT, J.B.; KORINE, C.; GARCIA, M.N.; TURNER, B.J. Tropical tree seedling growth responses to nitrogen, phosphorus and potassium addition. **Journal of Ecology**, v. 100, p. 309-316, 2012.

SANTOS, J.B.; PROCÓPIO, S.O.; SILVA, A.A.; COSTA, L.C. Captação e aproveitamento da radiação solar pelas culturas de soja e do feijão e por plantas daninhas. **Bragantia**, v. 62, p. 147-153, 2003.

SCHULTE-UEBBING, L.; DE VRIES, W. Global-scale impacts of nitrogen deposition on tree carbon sequestration in tropical, temperate and boreal forests: A meta-analysis. **Global Change Biology**, v. 24, p. 416-431, 2018.

SOUZA, L.A.; MOSCHETA, I.S.; MOURÃO, K.S.M.; ROSA, S.M. Morfo-anatomia da flor da *Guarea kunthiana* A. Juss. e de *Guarea macrophylla* Vahl. (Meliaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 24, p.591-600, 2002.

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

TEWARI, R.K; KUMAR, P; SHARMA, P.N. Oxidative stress and antioxidant responses in young leaves of mulberry plants grown under nitrogen, phosphorus or potassium deficiency. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 49, p. 313-322, 2007.

TRIPATHI, S.N.; RAGHUBANSHI, A.S. Seedling growth of five tropical dry forest tree species in relation to light and nitrogen gradients. **Journal of Plant Ecology**, v. 7, p. 250-263, 2014.

WILLIS, R.B; MONTGOMERY, M.E; ALLEN, P.R. Improved method for manual, colorimetric determination of total Kjeldahl nitrogen using salicylate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 1804–1807, 1996.

YEMM, E.W.; COCKING,E.C.The determination of amino acid with ninhydrin. **Analyst**, v. 80, p. 209-213, 1955.

ZHOU, J.; XIA, F.; LIU, X.; HE, Y.; XU, J.; BROOKES, P.C. Effects of nitrogen fertilizer on the acidification of two typical acid soils in south China. **Journal of Soils and Sediments**, v. 14, p. 415-422, 2013.

9. Anexos

Anexo 1. Parâmetros bioquímicos de mudas de *Croton floribundus* (Cf), *Astronium graveolens* (Ag), *Guarea kunthiana* (Gk) e *Aspidosperma polyneuron* (Ap) suplementadas no solo com apenas nitrogênio (N) ou solução nutritiva completa (C). As plantas referência (R) receberam apenas água.

Espécie	Cf			Ag			Gk			Ap			
	Tratamento	R	N	C	R	N	C	R	N	C	R	N	C
Ns		3,66±	8,38±	0,100±	1,97±	1,42±	1,08±	0,588±	1,34±	0,833±	2,21±	0,726±	2,95±
		1,04 ^b	0,67 ^a	0,035 ^c	0,26 ^a	0,228 ^a	0,15 ^a	0,083 ^b	0,19 ^a	0,12 ^b	0,56 ^{ab}	0,2 ^b	0,40 ^a
Nf		6,01±	31,7±	14,5±	0,787±	0,711±	0,351±	0,168±	0,323±	0,065±	2,25±	22,2±	26±
		2,60 ^b	0,30 ^a	4,76 ^b	0,18 ^a	0,145 ^a	0,061 ^a	0,021 ^b	0,047 ^a	0,010 ^c	1,41 ^b	2,53 ^a	5,07 ^a
As		0,110±	0,103±	0,082±	0,238±	0,327±	0,224±	0,082±	0,014±	0,031±	0,340	20,7	28,5
		0,010 ^a	0,030 ^a	0,014 ^a	0,022 ^b	0,012 ^a	0,016 ^b	0,009 ^a	0,001 ^b	0,006 ^b			
Af		0,110±	0,119±	0,103±	0,155±	0,170±	0,109±	0,010±	0,010±	0,007±	0,069±	0,006±	0,035±
		0,008 ^a	0,011 ^a	0,007 ^a	0,006 ^a	0,009 ^a	0,001 ^b	0,001 ^a	0,001 ^a	0,009 ^a	0,0006 ^a	0,003 ^b	0,014 ^a
aas		0,619±	0,426±	1,02±	2,46±	1,70±	0,782±	4,32±	5,50±	1,17±	2,47±	6,14±	3,56±
		0,086 ^{ab}	0,060 ^b	0,14 ^a	0,266 ^a	0,395 ^{ab}	0,12 ^b	0,42 ^a	0,22 ^a	0,28 ^b	0,63 ^b	0,46 ^a	0,49 ^b
aaf		4,17±	3,07±	2,54±	15,3±	12,7±	27,5±	4,56±	6,15±	5,68±	4,01±	38,4±	18,8±
		0,37 ^a	0,26 ^{ab}	0,15 ^b	1,99 ^b	2,04 ^b	0,85 ^a	0,51 ^b	0,31 ^a	0,20 ^{ab}	0,55 ^b	5,89 ^a	3,7 ^b
Pf		7,70±	8,61±	6,22±	13±	27±	32,3±	0,490±	0,651±	0,879±	4,73±	7,76±	7,65±
		0,39 ^a	0,30 ^a	0,33 ^b	0,499 ^c	1,75 ^b	0,76 ^a	0,091 ^b	0,1 ^{ab}	0,031 ^a	0,58 ^b	0,79 ^a	0,48 ^a
NRf		9,19±	15,6±	6,68±	6,72±	8,13±	20,4±	5,60±	2,61±	3,44±	0,162±	2,63±	1,18±
		2,17 ^a	3,55 ^a	2,40 ^a	0,89 ^b	0,368 ^b	1,06 ^a	0,45 ^a	0,81 ^a	1,00 ^a	0,034 ^b	0,24 ^a	0,08 ^b
N total		30,8±	32,1±	25,7±	18,4±	23,9±	26,4±	5,60±	26,8±	25,7±	0,162±	22,6±	24,6±
		2,17 ^a	1,13 ^a	0,64 ^a	1,43 ^b	0,256 ^{ab}	2,4 ^a	0,45 ^b	0,48 ^a	0,84 ^a	0,034 ^b	1,5 ^a	1,3 ^a

¹ Ns, nitrato na seiva do xilema ($\mu\text{mol mL}^{-1}$); Nf, nitrato na folha ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF); As, amônio na seiva do xilema ($\mu\text{mol mL}^{-1}$); Af, amônio na folha ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF); aas, aminoácidos totais na seiva do xilema ($\mu\text{mol mL}^{-1}$); aaf, aminoácidos totais na folha ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF); Pf, proteínas solúveis totais na folha (mg g^{-1} MF); NRf, atividade da enzima nitrato redutase ($\text{nmol NO}_2^- \text{g}^{-1} \text{MF min}^{-1}$); N total, conteúdo de N total ($\mu\text{g g}^{-1}$ MF).

² Os valores representam médias \pm erro padrão (n=10). Letras iguais em uma mesma espécie indicam valores que não se diferem conforme ANOVA seguida de teste de Fisher ($p < 0,05$).