

MARINA CÂMARA MATTOS MARTINS

**Ecofisiologia do uso de reservas de carbono e
nitrogênio ao longo do ciclo de vida de
Hymenaea courbaril var. *stilbocarpa* (Heyne)
Lee & Lang. (Leguminosae, Caesalpinioideae)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da
Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de
MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E
MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de
Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

São Paulo

2007

MARINA CÂMARA MATTOS MARTINS

**Ecofisiologia do uso de reservas de carbono e
nitrogênio ao longo do ciclo de vida de
Hymenaea courbaril var. *stilbocarpa* (Heyne)
Lee & Lang. (Leguminosae, Caesalpinioideae)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da
Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de
MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E
MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de
Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADOR: DR. MARCOS PEREIRA MARINHO AIDAR

“De grande significado reconhecer que muito mais importante, para qualquer um de nós na vida, não é bem aquilo que nos sucede, mas justamente o que fazemos acontecer”

Francisco Cândido Xavier

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades colocadas em minha vida.

À minha família pelo apoio, incentivo, dedicação, amor e respeito sempre. Sem vocês seria completamente impossível chegar até aqui.

Ao Eduardo, meu namorado, pela compreensão e companheirismo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcos Pereira Marinho Aidar pelo aprendizado, amadurecimento e amizade.

Ao Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge, do Departamento de Botânica (USP) pelas idéias durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ladaslav Sodek, do Departamento de Fisiologia Vegetal (UNICAMP) por permitir a realização das análises de aminoácidos em seu laboratório e pela atenção concedida, e ao seu aluno Gilberto Costa Justino pelo auxílio com os equipamentos, paciência e amizade.

À Dra. Agnes Elisete Lucci, da Seção de Anatomia do Instituto de Botânica pelo auxílio com as técnicas de anatomia.

Ao Dr. Marco Aurélio Silva Tiné pelo acompanhamento constante do trabalho, ajuda e sugestões.

Aos funcionários da Seção de Manutenção do Instituto de Botânica, Marco Antônio e Edmilson, por operarem o cesto aéreo para as coletas nas copas das árvores.

À amiga Fernanda Lopes de Macedo pela amizade sincera e ajuda durante todo o trabalho.

Ao Msc. João R. L. de Godoy pelas medidas de fotossíntese.

A todos os pesquisadores, estagiários e funcionários da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica pela convivência, atenção, auxílio e por tornar este um lugar especial.

Aos pesquisadores Dra. Marília Gaspar, Dr. Emerson Alves da Silva, Dra. Márcia Regina Braga, Dra. Mariangela Machado de Carvalho e Dra. Luce Maria Brandão Torres pela atenção, incentivo e amizade.

Aos amigos de laboratório Aline “Mamão”, Amandinha, Amanda “Top”, Amanda S., Claudinha, Cynthia, Denise, Elaine, Fabinho, Fábio, Fabiano, Fê K., Juliana Iura, Kelly, Ludmila, Maraba, Marcelino, Michele, Paty Pinho, Paola, Roberta, Rodrigo, Rosana, Simone, Sabrina, Tati, Vanessa Oliveira, Vanessa Rebouças.

Aos estagiários Mariana Mello, Fábio Lecina e Fernanda Siqueira que me ajudaram na triagem e moagem do material vegetal.

À Mary Monteiro, técnica do laboratório, pelos socorros imediatos.

Aos companheiros de disciplinas Aline Martins, Igor e Vivi pela maravilhosa convivência.

Aos amigos Grazi e Rubem pelas inúmeras e divertidas hospedagens em Campinas.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida (proc. 04/12149-0).

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Introdução..... | 1 |
| 1. Ciclo de vida | 1 |
| 2. Metabolismo de Carbono | 2 |
| 3. Metabolismo de Nitrogênio | 7 |
| 4. Interação Carbono-Nitrogênio | 11 |
| 5. <i>Hymenaea courbaril</i> (jatobá) e o uso de reservas de carbono e nitrogênio..... | 12 |
| Objetivos | 14 |
| Material e Métodos | 15 |
| 1. Sementes e plântulas..... | 15 |
| 1.1 Germinação e obtenção das plântulas | 15 |
| 1.2 Coletas | 15 |
| 1.3 Análises de carboidratos | 16 |
| 1.4 Análises na seiva do xilema | 17 |
| 1.4.1 Compostos nitrogenados | 17 |
| 1.4.2 Carboidratos | 19 |
| 1.5 Conteúdo total de carbono e nitrogênio nos tecidos e análise isotópica | 19 |
| 1.6 Análise estatística..... | 19 |
| 2. Indivíduos jovens e adultos | 19 |
| 2.1 Coleta de material vegetal | 19 |
| 2.2 Análise de solo | 21 |
| 2.3 Triagem do material vegetal | 21 |
| 2.3.2 Anatomia dos ramos | 22 |
| 2.4 Análises bioquímicas | 22 |
| 2.5 Medidas de fotossíntese | 22 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.6 Análise estatística | 23 |
| Resultados | 24 |
| Experimento 1 – Plântulas | 24 |
| Crescimento e desenvolvimento | 24 |
| Análises de carboidratos nos diferentes órgãos | 26 |
| Transporte no xilema | 34 |
| Espectrometria de massas e fracionamento isotópico de ^{15}N | 35 |
| Experimento 2 – Indivíduos jovens e adultos | 40 |
| Análises de solo | 40 |
| Análises em folhas de <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i> | 40 |
| Anatomia dos ramos de <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i> | 46 |
| Análises bioquímicas em caule de <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i> | 47 |
| Análises bioquímicas na seiva do xilema de <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i> | 49 |
| Discussão | 54 |
| Conclusões | 65 |
| Referências Bibliográficas | 67 |

RESUMO

Ecofisiologia do uso de reservas de carbono e nitrogênio ao longo do ciclo de vida de *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (Lee & Lang.)

A estocagem de reservas da semente garante o desenvolvimento da plântula até que esta possa realizar fotossíntese. O crescimento e desenvolvimento ao longo do ciclo de vida da planta sofrem influência da sazonalidade, sendo a remobilização de compostos de carbono e nutrientes internos uma resposta comum à variações temporais na disponibilidade de recursos. Em plantas existe uma estreita correlação entre os metabolismos de carbono e nitrogênio, especialmente em relação ao controle da fotossíntese e desenvolvimento foliar. Pouco se sabe sobre o acúmulo e a mobilização de reservas em espécies arbóreas de florestas tropicais e seu papel na produtividade e reprodução. *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (jatobá) é uma leguminosa arbórea tropical semi-decídua considerada secundária tardia na sucessão ecológica e que ocorre em Floresta Estacional Semi-Decidual e Floresta Ombrófila Densa. Os objetivos deste trabalho são caracterizar os mecanismos de uso de reservas de carbono e nitrogênio para o estabelecimento de plântulas e compará-los com indivíduos jovens e adultos de *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. Para o experimento com plântulas, sementes foram germinadas e colocadas em vasos em estufa durante 78 dias. A cada coleta, a seiva do xilema era retirada e a plântula dividida em raízes, caule, folhas e cotilédones. Os órgãos eram liofilizados e moídos para análise de carboidratos por cromatografia de troca aniônica de alto desempenho com detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD), conteúdo de amido, análise da composição da seiva do xilema e conteúdo total de carbono e nitrogênio por espectrometria de massas. Para o experimento com indivíduos jovens e adultos, foram realizadas coletas bimensais no período de junho/05 a abril/06 em cinco espécimes localizados no Instituto de Botânica de São Paulo. A cada coleta, eram excisados dois ramos por indivíduo, sendo a seiva do xilema retirada e as folhas e os caules utilizados para análises

bioquímicas (mesmos parâmetros das plântulas). Também foram mensuradas medidas pontuais de fotossíntese em folhas de cada ramo. Os resultados de mobilização de reservas em plântulas confirmaram que o fluxo principal de carbono durante o desenvolvimento se dá dos cotilédones para a parte aérea. O caule, além da função de transporte, seria também um órgão armazenador de amido durante o estabelecimento. Os principais aminoácidos transportados na seiva do xilema são ácido aspártico e asparagina, porém foi observado que o transporte de nitrogênio oriundo da degradação dos corpos protéicos dos cotilédones é realizado pela arginina. Em indivíduos jovens e adultos, os resultados de diversos parâmetros analisados mostraram uma variação sazonal drástica no mês de outubro/05, época em que folhas jovens estão se expandindo após o período de inverno para reconstrução da copa e quando os nutrientes reassimilados após a senescência foliar são remobilizados. Os teores de amido nas folhas foram mais expressivos nos meses de outubro e dezembro/05. A arginina apresentou contribuição significativa para o transporte de N durante o período de remobilização de nutrientes. Assim, a arginina pode ser utilizada como um indicador de mobilização de N das proteínas de reserva dos cotilédones em plântulas e da remobilização da reserva vegetativa em indivíduos jovens e adultos durante a transição das estações inverno-primavera. Os resultados indicam que os processos de estabelecimento da plântula e o crescimento sazonal de indivíduos adultos são muito similares, sugerindo que a plântula pode ser considerada equivalente ao novo ramo produzido na estação de crescimento. Deste modo, o processo básico de desenvolvimento apresenta um padrão modular e indica que a planta adulta pode ser entendida como um conjunto de módulos estruturais, caracterizando uma metapopulação composta por elementos estruturais similares a estrutura da plântula.

Palavras-chaves: *Hymenaea courbaril*, metabolismo de carbono e nitrogênio, reservas, crescimento modular.

ABSTRACT

Ecophysiology of carbon and nitrogen reserves use during the life cycle of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (Lee & Lang.)

Seed reserves guarantee seedling development until photosynthesis is established. After that, growth and development throughout the plant's life cycle will be influenced by seasonality. The internal nutrients and carbon remobilization is a common response to temporal variations in the availability of resources. Little is known about storage and mobilization of the resources in tropical tree species and their role in productivity and reproduction. *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (jatobá) is a semi-deciduous late successional leguminous tree species occurring in Seasonal Semi-deciduous and Dense Ombrophilous Forests. There is a close relation in plants between the carbon and nitrogen metabolism, specially in the control of photosynthesis and leaf development. Studies about how the metabolism of these two elements is synchronized are essential to understand the growth strategy of the plants. The aim of this work was to characterize the mechanisms involved in the use of carbon and nitrogen reserves along the life cycle of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*, from seedling establishment to young and adult trees. In the first experiment carried out with seedlings, seeds were germinated and grown in pots in a greenhouse for 78 days. For each sampling time, xylem sap was collected and the seedlings were separated into roots, trunk, leaves and cotyledons. The organs were freeze-dried and powdered for the following analyses: carbohydrate analysis by high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection HPAEC-PAD, starch content, xylem sap composition, total carbon and nitrogen content and carbon and nitrogen stable isotopic composition. A second experiment with young and adult trees (N = 5) was performed, where samples were taken every two months between June/2005 to April/2006 from individuals located in the Institute of Botany of São Paulo. For each sampling period, two branches per individual were excised,

and the xylem sap, bark and leaves were sampled for biochemical analysis as performed in the seedlings experiment. In addition, photosynthetic CO₂ assimilation was measured in leaves of sampled branches. The results for reserve mobilization in seedlings confirmed that the main carbon flux during establishment occurs from cotyledons to shoots. The trunk, besides a clear function in compound transport, was also the localization of transitory starch storage during establishment period. The main amino acids transported in xylem sap were aspartic acid and asparagine, however the transport originating from degradation of storage proteins in cotyledons involved arginine. In young and adults trees, data showed a dramatic seasonal variation in the growth season (october/2005) associated with the flush of new leaves and the remobilization of stored nutrients in order to rebuilt the canopy after the winter (deciduous period). Starch content was higher in october and december/05. Arginine was the main amino acid used for nitrogen transportation during the period of remobilization, configuring an indicator of nitrogen mobilization from cotyledons in the seedling establishment period and from vegetative storage proteins in adults during growth season. The metabolism indicates that seedling establishment and seasonal growth in adult trees are similar, suggesting that the seedling can be considered similar to a new branch produced in the adult canopy during the growth season. Accordingly, the basic development process occurs on a modular basis and indicates that the adult tree canopy can be understood as a collection of modules characterizing a metapopulation formed by structural elements similar to a seedling.

Key-words: *Hymenaea courbaril*, carbon and nitrogen metabolism, storage, modular growth.

INTRODUÇÃO

1. Ciclo de vida

O aparecimento das reservas nas sementes foi um dos fatores importantes no surgimento e evolução de sementes em plantas. As reservas das sementes funcionam como fonte de energia para manter os processos metabólicos em funcionamento e/ou como fonte de matéria para a construção dos tecidos vegetais que irão constituir a plântula (Buckeridge *et al.*, 2004).

Após a germinação, a plântula emergente é parcialmente impossibilitada de adquirir recursos externos, sendo a energia e metabólitos necessários para o seu desenvolvimento até atingir a fase autotrófica provenientes das substâncias acumuladas nos tecidos de reserva das sementes (Buckeridge *et al.*, 2004).

A massa das sementes pode refletir o conteúdo de reservas, sendo importante para a dispersão, crescimento e habilidade competitiva das plantas durante o estabelecimento. A massa também é especialmente vista como um componente importante para a tolerância à sombra em florestas, permitindo a sobrevivência da plântula por um longo período de tempo (enquanto houver deficiência de carbono) no sub-bosque até que possa atingir posição de maior exposição à luz. A massa da plântula, incluindo os cotilédones (órgãos armazenadores de reservas), decresce gradualmente devido ao balanço negativo de carbono que perdura até que ocorra o estabelecimento da plântula e seja iniciada a fase fotossintética, que marca a transição heterotrofia - autotrofia (Rose & Poorter, 2003).

Como as plantas são sésseis e na maioria dos casos vivem em ambientes sazonais, estocar nutrientes é um processo importante e decisivo na sua sobrevivência, e segundo Chapin *et al.* (1990), podem-se distinguir algumas classes de estocagem, como por exemplo:

- acúmulo - acúmulo de compostos que não promovem crescimento direto;
- formação de reservas - compartimentação regulada metabolicamente ou síntese de

compostos de reserva a partir de recursos que podem levar ao crescimento direto;

- reciclagem - reutilização de compostos que possuem função fisiológica imediata e contribuem para o crescimento ou defesa, e podem ser quebrados para sustentar um crescimento futuro .

Os vegetais acumulam matéria seca na forma de carboidratos, proteínas e lipídeos, visando assegurar o suprimento de esqueletos de carbono e energia química para o crescimento ou manutenção, quando não há produção de fotoassimilados (Buckeridge *et al.*, 2004; Pimentel, 1998). Este acúmulo pode ocorrer em diversos tecidos e órgãos, incluindo brotos, folhas, galhos, caules, raízes, sementes e frutos.

Ao longo de seu ciclo de vida, o crescimento e desenvolvimento da planta são influenciados pelo ciclo sazonal, implicando em uma mudança regular no ambiente e em respostas biológicas condicionadas por este (Battey, 2000). Variações sazonais na disponibilidade de água, luz e nutrientes em florestas tropicais possuem o potencial para limitar a produtividade das plantas (Newell & Mulkey, 2002). Uma resposta comum à variação temporal na disponibilidade de recursos é a remobilização de compostos de carbono e nutrientes internos, acumulados quando abundantes e estocados até que sejam necessários. Isto permite às plantas serem parcialmente independentes da disponibilidade externa de nutrientes (Cherbuy *et al.*, 2001). A remobilização interna inclui tanto a recirculação de reservas após a estocagem quanto a reciclagem dos tecidos senescentes, implicando no re-uso de compostos (Chapin *et al.*, 1990). A captura de carbono é feita pelas folhas enquanto a de água e nutrientes minerais é feita pelas raízes, implicando no favorecimento da alocação de biomassa nas folhas quando houver limitação de luz e no favorecimento das raízes quando nutrientes minerais se tornarem limitantes para o crescimento (Shipley & Meziane, 2002).

2. Metabolismo de Carbono

O crescimento e a produtividade primária dos ecossistemas são dependentes

principalmente do processo de fotossíntese, que se inicia com a utilização da luz solar para a oxidação de moléculas de água. A energia química armazenada na reação de oxidação é processada pela cadeia de transporte de elétrons nos tilacóides dos cloroplastos por uma série de carregadores a fim de produzir poder redutor (NADPH) e moléculas de alta energia (ATP), que serão utilizados nas reações de redução de carbono (Melis, 1999). A luz é capturada pelos complexos coletores de luz que afunilam a energia luminosa para os centros de reação fotoquímica nos fotossistemas I e II (Cruz *et al.*, 2004).

A absorção de fótons pelas clorofilas, a transferência de energia para os centros de reação e o início da cadeia de transporte de elétrons devem ser bem regulados para prevenir a super-excitação dos fotossistemas, que favorece a formação de espécies altamente reativas e a fotoinibição da maquinaria fotossintética. A regulação está relacionada com os fluxos de ATP e NADPH (Cruz *et al.*, 2004).

O CO₂ é difundido da atmosfera até os sítios de carboxilação a partir dos estômatos. Uma vez dentro dos cloroplastos, o CO₂ passa por uma série de reações redutoras conhecida como Ciclo de Calvin. Inicialmente, o CO₂ é enzimaticamente combinado com a ribulose-1,5-bifosfato (RuBP) pela enzima ribulose-1,5-bifosfato carboxilase oxigenase (RUBISCO) para formar um intermediário instável de 6 C, que se dissocia em duas moléculas de 3-fosfoglicerato (3-PGA). Os PGA são convertidos à trioses-fosfato em reações que requerem ATP e NADPH. A absorção contínua de CO₂ exige que o acceptor primário RuBP seja regenerado a partir de uma série de reações enzimáticas que interconvertem açúcares fosfato de 3 a 7 C (Sharkey, 1985). A maior parte das trioses fosfato formadas é dirigida para a regeneração da RuBP, enquanto 1/6 delas podem ser desviadas para a síntese de amido na própria organela ou encaminhada para o citosol para a formação de sacarose (Taiz & Zeiger, 2004). A regulação da alocação de trioses-fosfato para o citosol propicia uma adequação nas taxas de C exportadas para os drenos, ao mesmo tempo em que mantém no cloroplasto a quantidade necessária para a regeneração da RuBP e síntese de outros produtos do ciclo de

Calvin (Geiger & Servaites, 1994).

Uma medida de sucesso durante a regulação diurna da fotossíntese é a habilidade da planta em manter um balanço interno positivo em relação aos diversos processos envolvidos (componentes físico, fotoquímico e bioquímico) enquanto respondem às condições ambientais (Geiger & Servaites, 1994).

O carbono é acumulado inicialmente na forma de carboidratos (amido, polissacarídeos de parede celular, frutanos e sacarose, dependendo da espécie e do compartimento da planta), e posteriormente na forma de ácidos orgânicos, compostos fenólicos solúveis, taninos hidrolizáveis ou lipídeos. O acúmulo de carbono pode acontecer sob condições de estresse (alta intensidade luminosa e baixa disponibilidade de nutrientes, por exemplo) e as reservas de carbono podem sustentar o crescimento quando esse estresse for aliviado.

O amido é a forma mais significativa de reserva de C em plantas em termos de quantidade, universalidade e distribuição em diferentes espécies (Martin & Smith, 1995). Consiste de diferentes polímeros de glucose arranjados em uma estrutura semicristalina tridimensional, o grânulo de amido. O amido pode ser quimicamente fracionado em dois tipos de polímeros de glucanos: amilose e amilopectina. A amilopectina é o maior componente do amido nas folhas, é uma molécula grande, com estrutura ramificada e responsável pela natureza granular do amido. A amilose é menor, essencialmente linear e sintetizada dentro da matriz formada pela amilopectina (Zeeman *et al.*, 2004). A biossíntese de amido envolve não somente a produção de glucanos, mas também sua conformação em uma forma organizada dentro do grão de amido. A simplicidade relativa na via de biossíntese deste polímero não explica a enorme variabilidade de composição de amido entre as diferentes espécies, variedades e tecidos. Em todas as espécies que tem sido investigadas, existem isoformas das enzimas de cada um dos passos envolvidos na biossíntese de amido, o que permite a flexibilidade para especialização e controle da biossíntese. Podem ocorrer diferenças nos produtos, propriedades cinéticas, tempo de expressão durante a formação do grão de amido e

nos órgãos em que são ativados (Martin & Smith, 1995).

O amido suporta o metabolismo e crescimento no escuro, quando a fotossíntese não é possível. Em muitos tecidos de plantas, incluindo as folhas, o amido é degradado dentro do plastídeo em que foi sintetizado (Zeeman *et al.*, 2004). A enzima que inicia o ataque aos grãos de amido é a α -amilase e estudos de bioquímica e análise de seqüências genômicas revelaram que esta enzima está presente dentro dos cloroplastos (Li *et al.*, 1992 a; Stanley *et al.*, 2002). Algumas hidrolases atuam nas quebras das ramificações (α - 1,6) para que a cadeia linear (α - 1,4) seja exposta à degradação. Na ausência de fosfato, maltose e glucose são os produtos predominantes da quebra do amido e são exportados dos plastídeos para prover substratos para a síntese de sacarose e para utilização no metabolismo celular (Zeeman *et al.*, 2004).

A maioria dos carboidratos acumulados nos sítios de estocagem é translocada durante a estação de crescimento e este fenômeno está associado à presença de drenos fortes. A sacarose é o carboidrato mais comumente translocado (pelo floema) entre as fontes, órgãos exportadores de C, e os drenos, órgãos consumidores de C.

As plantas lenhosas usam tanto os carboidratos estocados quanto os produzidos pela fotossíntese para o metabolismo e crescimento. Ao avançarem para os estágios sucessivos de crescimento, incluindo plântula, árvore jovem, madura e senescente, sua estrutura e a partição de carboidratos se torna complexa (Bloom *et al.*, 1985).

Além de seu papel essencial como substratos no metabolismo de carbono e energia e na biossíntese de polímeros, os açúcares têm funções importantes como primeiro mensageiros na transdução de sinais. Em plantas, a produção de açúcares pela fotossíntese é um processo vital e a percepção/sinalização de açúcares modula, coordena e integra a síntese de carboidratos nos diferentes tecidos e órgãos em resposta a sinais ambientais que governam o crescimento e desenvolvimento durante todo o ciclo de vida da planta (Rolland *et al.*, 2002; Baier *et al.*, 2004).

Durante a germinação e desenvolvimento da plântula, açúcares podem reprimir a

mobilização de nutrientes, alongamento do hipocótilo, desenvolvimento da raiz, etc. Além disso, efeitos de açúcares têm sido observados na transição floral e na regulação da senescência foliar (Rolland *et al.*, 2002).

Açúcares como a glucose e sacarose regulam muitos processos celulares importantes em plantas, como acúmulo de fotoassimilados, mobilização e reserva. Por exemplo, em condições de alta demanda por carboidratos e baixa disponibilidade de luz, o sistema de regulação aumenta a produção e mobilização de fotoassimilados através do aumento da expressão dos genes envolvidos na fotossíntese. Por outro lado, quando os fotoassimilados não são prontamente necessários, genes envolvidos na síntese de amido são ativados para manter um balanço entre o suprimento de C, demanda e reserva. Funções de transporte respondem à disponibilidade de fotoassimilados modulando a expressão de genes relacionados ao transporte de sacarose e os níveis de proteínas, para integrar a demanda dos drenos com as fontes produtoras e exportadoras de carboidratos (Baier *et al.*, 2004). Além de determinar a atividade da maquinaria metabólica, a regulação por carbono também regula a fotossíntese a nível foliar, através da regulação do desenvolvimento foliar (Paul & Pellny, 2003).

Diversos estudos apontam a hexoquinase (HKK), enzima que catalisa a primeira reação da glicólise, como um sensor de açúcar com uma função regulatória distinta. Açúcares que são substratos para esta enzima causam a repressão da expressão de genes fotossintéticos em baixos níveis fisiológicos e a repressão é bloqueada quando são utilizados inibidores específicos para a HKK (Rolland *et al.*, 2002).

Para ativar vias de transdução de sinais, os açúcares primeiramente necessitam ser percebidos e a dupla função como nutriente e molécula sinalizadora pode complicar a análise dos mecanismos envolvidos. Estudos bioquímicos evidenciam a participação de diversas proteínas quinases, proteínas fosfatases e Ca^{2+} como segundo mensageiro, e embora muitos fatores de transcrição e elementos reguladores *cis* parecem mediar o controle de açúcar na

expressão gênica, os seus papéis precisos nas vias de transdução de sinais necessitam mais investigações (Rolland *et al.*, 2002).

Muitos genes de plantas, que codificam enzimas e outras proteínas envolvidas na assimilação, acúmulo e mobilização de reservas têm demonstrado respostas em nível de transcrição tanto para o acúmulo como para a diminuição nos níveis de carboidratos. Alguns estudos também sugerem que açúcares sinalizadores podem ser importantes na regulação do status fonte-dreno e na partição de carbono na planta (Lloyd & Zakhleniuk, 2004).

3. Metabolismo de Nitrogênio

Nitrogênio é o elemento mais extensivamente assimilado do solo pelas plantas superiores e o metabolismo deste elemento é um processo essencial, necessário para a biossíntese de biomoléculas vitais como aminoácidos (proteínas), nucleotídeos (ácidos nucléicos), clorofila e outros metabólitos contendo N (Lam *et al.*, 2006). O conhecimento sobre a assimilação, compartimentação e reciclagem é crítico para a fisiologia ecológica de plantas porque a disponibilidade de N limita o crescimento e a produtividade vegetal mais do que qualquer outro fator nutricional (Vitousek & Howard, 1991; Crawford & Glass, 1998).

Após a absorção pela planta, o N inorgânico precisa ser incorporado na forma orgânica e isto ocorre pelo processo de assimilação. O amônio (NH_4^+) é rapidamente assimilado na forma orgânica pela enzima sintetase da glutamina (GS), que catalisa a reação do NH_4^+ com o aminoácido ácido glutâmico, para formar a amida glutamina (Sodek, 2004). A síntese de glutamato pode ser mediada pelas enzimas amidatransferase de glutamina: 2-oxoglutarato (GOGAT) ou pela glutamato desidrogenase (GDH). O sistema GS-GOGAT é dominante para a síntese de glutamato em plantas superiores enquanto a GDH está provavelmente envolvida na sua oxidação (Oaks, 1994). A assimilação de NH_4^+ em aminoácidos é quantitativamente mais significativa para espécies tardias da sucessão (Chapin *et al.*, 1993; Warren, 2006).

O nitrato (NO_3^-) pode ser reduzido nas folhas ou raízes primeiramente pela ação da enzima redutase do nitrato, localizada no citoplasma. Esta enzima é a principal porta de entrada de N no metabolismo vegetal. O produto formado (NO_2^-) é então reduzido a NH_4^+ pela enzima redutase do nitrito, localizada nos cloroplastos das folhas e plastídeos das raízes (Sodek, 2004).

Os aminoácidos formados podem ser exportados através do xilema (principalmente em raízes) e floema (folhas). A análise de compostos nitrogenados na seiva do xilema pode indicar como a planta está transportando o nitrogênio assimilado (Fischer *et al.*, 1998) e as mudanças sazonais causadas por diferenças na intensidade de absorção e atividade metabólica das raízes ao longo do ano. O nitrogênio transportado pelo xilema pode não ser exclusivamente de origem radicular, pois as reservas de N podem ser remobilizadas (Moreno & Garcia-Martinez, 1983). Geralmente, os aminoácidos transportados no xilema são as amidas (asparagina e glutamina) e aminoácidos ácidos (glutamato e aspartato). O nitrato não é retranslocado via floema, e portanto sua presença no xilema é indicativo de absorção radicular. Em espécies leguminosas tropicais é comum encontrar ureídeos, alantoína e ácido alantóico especialmente naquelas capazes de fixação simbiótica de nitrogênio (Schmidt & Stewart, 1998; Aidar *et al.*, 2003).

Aidar *et al.* (2003) indicam que o perfil dos compostos nitrogenados transportados no xilema é característico de diferentes estratégias de regeneração entre árvores da Mata Atlântica. Espécies pioneiras transportam principalmente nitrato e asparagina, espécies secundárias iniciais transportam glutamina e arginina e espécies secundárias tardias transportam principalmente asparagina e arginina. Estes resultados indicam que a aquisição e transporte de nitrogênio são aspectos importantes na caracterização da estratégia de uso de N das espécies arbóreas.

As proteínas de reserva representam a maior fonte de N para a germinação e desenvolvimento da plântula, sendo este o período crucial do ciclo de vida em que um grande

número de metabólitos são necessários para suportar um crescimento rápido (Todd *et al.*, 2001).

Durante o ciclo de vida de uma planta, o nitrogênio orgânico estocado na forma de proteínas durante a senescência foliar ou na semente (reserva vegetativa em folhas e ramos; ou nas sementes, no endosperma e cotilédones) precisa ser remobilizado através de um mecanismo geral e eficiente (Fischer *et al.*, 1998). As proteínas de reserva vegetativa possuem múltiplas funções na biologia de legumes forrageiros como fonte de N estocado em fases específicas do desenvolvimento, papel adaptativo similar às proteínas anti-congelamento propiciando tolerância ao frio e como agentes de defesa contra ataque de patógenos (Avice *et al.*, 2003).

O acúmulo de arginina como fonte de N é comum em muitas espécies de plantas, constituindo cerca de 40% do N em sementes protéicas e 50 a 90% do pool livre total de N em árvores frutíferas. O predomínio de arginina sugere que este composto possui um papel central na economia de N em plantas (Micallef & Shelp, 1989).

Como o nitrogênio é geralmente o fator mais limitante para o crescimento vegetal nos ecossistemas terrestres, a economia de nitrogênio na planta é de grande importância para a sua sobrevivência e produtividade. Em contraste com plantas anuais, as plantas perenes herbáceas ou lenhosas podem remobilizar N estocado durante o outono/inverno na forma de proteínas e aminoácidos de reserva nos ramos para suportar o crescimento de novas folhas na primavera, antes ou ao mesmo tempo em que há assimilação *de novo* de N pela raiz. O crescimento de novas folhas é o principal dreno para a remobilização, podendo utilizar até cerca de 90% do N total originado da remobilização (Frak *et al.*, 2002).

Pouco é conhecido sobre a capacidade de espécies arbóreas tropicais de acumular reservas sazonais e como elas são recicladas e transportadas na estação de crescimento seguinte.

Existe uma complexa rede metabólica que regula a assimilação de N e muitos estudos

realizados com bactérias, fungos e plantas buscam elucidar a forma com que as células podem ajustar e monitorar o status de N, mecanismo conhecido como “nitrogen sensing”.

A PII é uma proteína descrita como altamente conservada, presente em plantas superiores, cianobactérias e eubactérias e envolvida na regulação do metabolismo de N. Estudos realizados com *E. coli* verificaram que esta proteína regula o metabolismo de N nos níveis de transcrição e pós-tradução, a partir do controle da expressão gênica e da atividade enzimática da enzima chave para a assimilação de N, a sintetase da glutamina (GS). Em cianobactérias, a proteína PII modifica a atividade dos transportadores de nitrato/nitrito. Em plantas, a PII é uma proteína de plastídeo codificada no núcleo, parecida com as proteínas bacterianas e de cianobactérias em muitos aspectos, indicando que as proteínas PII de plantas podem ser um dos componentes envolvidos no “nitrogen sensing” em plantas superiores (Ferrario-Méry *et al.*, 2006; Lam *et al.*, 2006).

Ferrario-Méry *et al.* (2006) realizaram um trabalho que descreve as conseqüências fisiológicas da ausência da proteína PII na biossíntese de arginina em *Arabidopsis* utilizando plantas mutantes deficientes para esta proteína. Os autores sugerem que as vias de biossíntese de arginina são altamente e especificamente afetadas nos mutantes sob condições de escassez de N, como já descrito para cianobactéria. Assim, a primeira evidência para a função fisiológica da proteína PII em plantas seria a ativação da N-acetilglutamato quinase (NAGK), enzima que catalisa a etapa chave para a biossíntese de arginina.

Existe ainda um controle geral de aminoácidos (GAAC), primeiramente identificado em cevada, ativado quando as células necessitam de um aminoácido específico, a partir de uma reprogramação de transcrição rápida para ativar as múltiplas vias de biossíntese de aminoácidos. Homólogos da maioria dos componentes do GAAC são encontrados em plantas superiores (Lam *et al.*, 2006).

Muitos são os componentes comuns na percepção de N em plantas superiores e outras formas de vida, porém o entendimento sobre estes sistemas é ainda incompleto e

modificações significativas no sistema de “nitrogen sensing” em plantas superiores podem ser uma estratégia de adaptação ao seu estilo de vida único (Lam *et al.*, 2006).

4. Interação Carbono-Nitrogênio

O metabolismo de N está intimamente interligado ao metabolismo de carboidratos em diversas etapas do metabolismo vegetal: síntese de malato para prevenir a alcalinização provocada pela assimilação de nitrato, 2-oxoglutarato como principal composto acceptor de amônio na via GS-GOGAT e numerosos outros ácidos orgânicos e intermediários fosforilados que são necessários como percussores de carbono nas diferentes vias biossintéticas de aminoácidos. Desse modo, o metabolismo de N interage em vários pontos com os fluxos de C, íons e fotoassimilados e a regulação de pH ao nível celular e da planta como um todo, influenciando o desenvolvimento e arquitetura da planta, tempo de senescência e floração (Stitt *et al.*, 2002).

Paul & Pellny (2003) indicam que a fotossíntese é regulada em um processo de mão dupla. A luz regula a expressão de genes da fotossíntese e a atividade dos produtos dos genes (controle por “feedforward”). A taxa de uso dos produtos do ciclo de Calvin é determinada pelo estado nutricional e temperatura, também afetando a fotossíntese (controle por “feedback”). Enquanto o primeiro tipo de controle garante o uso eficiente da luz, o segundo garante que o fluxo de C seja balanceado através das vias metabólicas que produzem e consomem C, de modo que o fosfato inorgânico seja reciclado e o N distribuído adequadamente nos diferentes processos que garantem o crescimento e sobrevivência da planta. Os mecanismos responsáveis são ainda muito pouco conhecidos, mas o balanço carbono-nitrogênio, mais do que a condição de carbono *per se*, é central no entendimento o controle de “feedback” da fotossíntese através de metabólitos de carbono.

As plantas reduzem a disparidade nos suplementos de C e N aumentando sua capacidade de adquirir recursos mais limitantes. Processos que determinam a capacidade da

planta para aquisição de carbono e nutrientes sempre competem com algum outro pelas reservas internas (Bloom *et al.*, 1985).

O maior desafio no estudo do metabolismo e utilização de N é o desenvolvimento de metodologia e abordagens para analisar esta complexa rede metabólica e as preferências das espécies. Assim, uma abordagem que avalia a relação C:N como um indicador das inter-relações entre os dois metabolismos é favorecida no aspecto da simplicidade metodológica a ser utilizada e propicia um excelente sistema para explorar e entender o metabolismo fundamental que suporta os processos de crescimento e desenvolvimento vegetal.

Pouco se sabe sobre o acúmulo e a mobilização de reservas em espécies arbóreas das florestas tropicais e seu papel na produtividade e reprodução. Newell *et al.* (2002) apresentam um trabalho sobre sazonalidade e estocagem de carboidratos em plantas tropicais, indicando que tecidos como raízes, troncos e galhos servem como sítios de reserva de carboidratos. É possível que mecanismos similares possam existir em processos de estocagem e remobilização de compostos nitrogenados.

5. *Hymenaea courbaril* (jatobá) e o uso de reservas de carbono e nitrogênio

O jatobá (*Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*) é uma árvore de 20 – 30 m, com tronco de até 200 cm de diâmetro, distribuída desde o Caribe e México até a Bolívia, Guiana Francesa e Brasil. Ocorre em Floresta Estacional Semi Decidual e Floresta Ombrófila Densa até zonas subtropicais secas e úmidas, tolerando precipitação entre 600 e 4200 mm, temperatura média anual entre 22 e 28°C e solos com pH entre 4 e 7,5. É uma espécie típica de floresta madura e primária, sendo considerada secundária tardia (ou clímax) na sucessão florestal (Lee & Langenheim, 1975).

As plântulas de *Hymenaea courbaril* são consideradas, em relação aos cotilédones de reserva, como fanerocotiledonar, epígea e globóide (Santos *et al.*, 2004). Os cotilédones são compostos por 46% de carbono, 9% de proteína e 3,5 % de lipídeos. As sementes germinam

em sub-bosque da floresta madura, sendo as plântulas tolerantes à sombra. *H. courbaril* var. *stilbocarpa* é nativa ao longo de rios em florestas relativamente secas do estado de São Paulo e de partes adjacentes do Rio de Janeiro e Minas Gerais. Floresce de novembro a janeiro e os frutos estão geralmente maduros em setembro (Lee & Langenheim, 1975).

Tiné *et al.* (2000) verificaram que em cotilédones de jatobá, a reserva do polissacarídeo de parede celular xiloglucano corresponde a 40% massa seca do órgão e é mobilizada após a germinação, concomitante com o desenvolvimento da plântula e configurando uma reserva pós-germinativa. Santos *et al.* (2004) demonstraram que a mobilização do xiloglucano é sincronizada com a expansão dos eófilos e primeiros metáfilos da plântula, sendo responsáveis pelo suporte energético para o início do processo fotossintético e a transição dreno-fonte nestes tecidos. Martins (2004) demonstrou que a presença de antocianinas durante o período de expansão dos eófilos é diretamente proporcional à disponibilidade da reserva do cotilédone de jatobá, indicando que a redução na pigmentação é uma resposta a tratamentos que reduzem os níveis de carboidratos de reserva. Haddad *et al.* (2004) verificaram que a espécie tem folhas bastante longevas, que atingem 430 ± 30 dias e conteúdo de nitrogênio de cerca de 0,8% e uma capacidade de reabsorver nitrogênio de cerca de 49%.

A utilização das reservas da semente no estabelecimento das plântulas de jatobá é um processo bem estudado, entretanto o conhecimento sobre a mobilização e utilização das reservas de nitrogênio ainda não é conhecido para a espécie. Apenas a concentração inicial de nitrogênio nas sementes foi avaliada (cerca de 9%, como citado acima), e considerando que a semente da espécie tem cerca de 4 a 5 g há uma boa disponibilidade de nitrogênio para o crescimento inicial da plântula.

O conhecimento sobre o processo de acúmulo e utilização de reservas sazonais pela copa (folhas e ramos) dos indivíduos adultos de jatobá, que é uma espécie semi-decídua, é praticamente desconhecido.

OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivos conhecer e comparar os padrões e mecanismos de uso de reservas de carbono e nitrogênio em plântulas e indivíduos adultos de *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (Hayne).

Objetivos específicos

- Caracterização da mobilização de reservas de nitrogênio e carbono na germinação das sementes e no estabelecimento de plântulas de jatobá;
- Caracterização do acúmulo e mobilização sazonal de reservas de nitrogênio e carbono na copa de indivíduos adultos de jatobá.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Sementes e plântulas

1.1 Germinação e obtenção das plântulas

200 sementes de *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* foram desinfetadas com hipoclorito de sódio comercial concentrado por 30 minutos, a fim de evitar contaminação por microrganismos. Em seguida, as sementes foram lavadas e submetidas à escarificação mecânica nas regiões laterais em relação ao embrião, com o auxílio de um alicate. As sementes foram mantidas em bandejas de plástico contendo vermiculita, em câmaras de germinação MA 400 Marconi, a 30 °C e regadas com água periodicamente até o momento da protusão da radícula. Quinze dias após o início da embebição, as sementes foram transferidas para vasos (5 L) contendo areia: vermiculita (2:1 v/v), sendo 5 plântulas por vaso, mantidas em casa de vegetação à temperatura ambiente por todo o experimento. Semanalmente, eram adicionados 200 mL de solução de Hoagland (Epstein, 1972) modificada (sem fonte de nitrogênio) e 50 mL de solução de sulfato de amônio 0,5 mM aos vasos, procurando evitar deficiência mineral.

1.2 Coletas

Foram realizadas 8 coletas (2 de sementes e 6 de plântulas) ao longo de 78 dias, sendo as seis primeiras coletas semanais e as duas últimas quinzenais. A cada coleta, as plântulas foram analisadas quanto ao crescimento (altura, número de folhas e área foliar) e tiveram seiva do xilema coletada *in vivo* através de uma bomba de pressão (PMS Instrument modelo 1000, Oregon EUA). As plântulas eram separadas em cotilédones, caules, folhas e raízes, congeladas em nitrogênio líquido e estocadas em -20 °C até o processamento para as análises bioquímicas. As amostras de tecidos vegetais foram liofilizadas, obtendo-se a massa seca das

plântulas e a razão raiz : parte aérea. O material seco foi moído em moinho de bola (modelo TE 350, Tecnal).

Devido à dificuldade de obtenção e a grande variação de volume de seiva do xilema, especialmente nas fases iniciais do desenvolvimento das plântulas de jatobá, adotou-se um procedimento padrão para as coletas: as seivas amostradas eram congeladas e liofilizadas, sendo posteriormente dispersas em 100 μ L de água deionizada para análise de carboidratos e aminoácidos em cromatografia líquida de alto desempenho (HPAEC-PAD).

Foram realizadas duas medidas de fluorescência da clorofila *a* através de fluorômetro PAM 2100 (Portable Chlorophyll Fluorometer, Walz, Germany), a fim de acompanhar a evolução da eficiência fotoquímica do PSII em folhas adaptadas ao escuro (relação F_v/F_m).

1.3 Análises de carboidratos

Para as análises de carboidratos, 50 mg de material vegetal (raiz, caule, folhas e cotilédones) foi extraído com 500 μ L de etanol 80 % (v/v), 20 minutos em banho-maria a 80 °C, por 4 vezes, totalizando 2 mL. Após centrifugação (13000 rpm, 5 minutos), os sobrenadantes foram combinados, secos em centrífuga concentradora a vácuo (*speed-vac*, Labconco Centrivap 78100-00, Kansas, USA) e dispersos em 1 mL de água deionizada. As folhas ainda tiveram os pigmentos retirados com 500 μ L de clorofórmio. As amostras foram deionizadas através de passagem por resinas Dowex catiônica e aniônica e em seguida filtradas (Millipore 0,25 μ m) para análise de glucose, frutose e sacarose por Cromatografia de Troca Aniônica de Desempenho com Detector de Pulso Amperométrico (HPAEC/PAD) modelo DX500, em coluna CarboPac PA-1 (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, EUA) através de eluição isocrática com 200mM de hidróxido de sódio em água, com fluxo 1mL/min: 0-15 min 50 % NaOH 200 mM e 50 % H₂O, 15-20 min 100 % NaOH 200 mM, 20-25 min 50 % NaOH 200 mM e 50 % H₂O. As áreas de cada pico foram corrigidas de acordo com a sensibilidade do detector para cada açúcar.

A análise de amido foi baseada no método de Amaral *et al.* (2006), no qual os precipitados da extração etanólica foram secos em estufa 60 °C, por 1 hora. Nestes foram adicionados 500 µL de α -amilase termoestável (120U.mL⁻¹) da bactéria *Bacillus licheniformis* (MEGAZYME) diluída em tampão MOPS pH 6,5 10 mM. As amostras foram incubadas a 75 °C por 30 minutos. Este procedimento foi repetido mais uma vez, totalizando 1 mL de enzima. Após resfriamento até 50 °C, adicionou-se 500 µL de amiloglicosidase (30U.mL⁻¹) do fungo *Aspergillus niger* (MEGAZYME) diluída em tampão acetato de sódio pH 4,5 100 mM e as amostras foram incubadas por 30 minutos. Este procedimento foi repetido novamente, totalizando 2mL de enzima. Posteriormente, alíquotas de 50 µL de extrato foram incubadas com 750 µL da solução do kit GODPOD (Glicose PAP Liquiform/CENTERLAB), contendo as enzimas glucose oxidase e peroxidase e os reagentes 4-aminoantipirina e fenol, a 30 °C, por 15 minutos. O teor de glucose liberado foi determinado em leitor de microplacas de Elisa, a 490 nm. A glucose liberada foi calculada e ajustada (-10 %) para a massa de glucose ligada que está presente no amido.

1.4 Análises na seiva do xilema

1.4.1 Compostos nitrogenados

A separação e análise da composição de aminoácidos livres na seiva do xilema foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC), modelo LKB 2152 LC (Bromma), em coluna de fase reversa, após derivação com orto-ftaldialdeído (OPA), segundo Jarret *et al.* (1986).

A separação efetuou-se por meio de um gradiente gerado com os solventes tampão fosfato [(CH₃COONa.3H₂O + Na₂HPO₄.7H₂O) pH 7,25 50 mM, 20 mL de tetrahydrofurano e 20 mL de metanol específico para HPLC em 1 L de volume final completado com água deionizada] (= tampão “A”) na bomba A e metanol 65 % (= tampão “B”) específico para

HPLC na bomba B. Ambos os tampões foram deaerados, sendo o tampão “A” filtrado à vácuo (Millipore 0,45 μm).

O reagente OPA foi preparado dissolvendo-se 50 mg de OPA em 1 mL de metanol, com posterior mistura em 6,5 mL de tampão borato-NaOH pH 9,5 (2,4 g de ácido bórico em 90 mL de H₂O e o pH ajustado com NaOH 2N) e filtrado (Millipore 0,45 μm). Para a derivação, adicionou-se 5 μL de mercaptoetanol a 625 μL da mistura.

Uma alíquota de 10 μL de amostra ou padrão foi misturada com 30 μL do reagente OPA-borato + mercaptoetanol em eppendorf. Após 2 min de reação, tempo suficiente para a formação dos derivados aminoácidos-OPA, injetaram-se 10 μL da amostra derivada no HPLC. É aconselhável que a aplicação da amostra siga um padrão “sanduíche”: parte do descarte do HPLC é recolhido antes do início das análises e são colocados na seringa 5 μL do descarte + 10 μL da amostra derivada + 5 μL do descarte. A eluição das amostras ocorreu a partir de um gradiente entre os tampões “A” e “B”, através da coluna Water Spherisorb ODS-2, 5 μm , 4,6 mm x 250 mm (Supelco Inc. USA), com fluxo de 0,8 mL/min: 0-5 min 20-28 % “B”, 6-35 min 28-58 % “B”, 36-40 min 58-75 % “B”, 41-56 min 75-95 % “B” e 57-71min 95-100 % “B”.

Ao passar pela coluna, os derivados aminoácidos-OPA foram detectados pelo monitor de fluorescência (modelo RF-530, Shimadzu). Os registros da área e do tempo de retenção de cada derivado foi efetuado pelo integrador LKB (modelo 2221).

As concentrações de aminoácidos nas amostras foram determinadas pela área dos picos integrados, comparados aos picos do padrão SIGMA AAS-18, com 15 aminoácidos protéicos (ASP, GLU, SER, HIS, GLY, THR, ARG, ALA, TYR, MET, VAL, PHE, ILE, LEU e LYS), aos quais se adicionou os aminoácidos ASN, GLN e GABA, todos à concentração de 250 nmol/mL.

O transporte de nitrogênio na forma de aminoácidos na seiva do xilema foi estimado através da proporcionalidade entre a concentração total de determinado aminoácido, seu

conteúdo de átomos de nitrogênio e a concentração total de nitrogênio da amostra: por exemplo, a proporção de nitrogênio transportado na forma de um determinado aminoácido (ASN) foi estimada através da comparação da concentração deste aminoácido multiplicado pelo número de átomos de nitrogênio na molécula (dois para a ASN) em relação à concentração total de nitrogênio transportado por todos os aminoácidos analisados (% N-AA).

1.4.2 Carboidratos

Para análise de glucose, frutose e sacarose na seiva do xilema preparou-se um “pool” de amostras por coleta, sendo cada “pool” composto por 3 amostras. Realizou-se análise por Cromatografia de Troca Iônica de Desempenho com Detector de Pulso Amperométrico (HPAEC/PAD) modelo DX500, conforme já descrito no item 1.3.

1.5 Conteúdo total de carbono e nitrogênio nos tecidos e análise isotópica

Amostras de tecidos vegetais (cotilédones, caules e folhas) liofilizados e moídos foram analisadas no Laboratório de Ecologia Isotópica, CENA/USP (Piracicaba, SP) por fluxo contínuo em analisador elementar (Carlo Erba) em linha com um espectrômetro de massas (Finnegan Delta Plus), onde se obtém a razão dos isótopos estáveis do nitrogênio e carbono ($\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$) e suas concentrações totais (%N, %C).

1.6 Análise estatística

Os dados foram analisados através de teste ANOVA (LSD) e Teste t ($P < 0,05$) em software WINSTAT (R. Fitch Software, Cambridge, MA, EUA).

2. Indivíduos jovens e adultos

2.1 Coleta de material vegetal

Três exemplares de *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* jovens (cerca de 6 – 8 m altura) e 2 adultos (mais de 15 m altura) localizados no Instituto de Botânica de São Paulo tiveram 14 de seus ramos marcados no início do estudo para as coletas bimensais (no período de junho/05 a abril/06), realizadas com o auxílio de um cesto aéreo. Foram selecionados ramos que recebiam incidência direta de luz e que estavam numa mesma faixa da copa.

A cada coleta foram excisados dois ramos por indivíduo. Primeiramente, as folhas eram separadas dos ramos e congeladas em nitrogênio líquido a fim de minimizar a transpiração. As seivas do xilema eram então extraídas dos ramos através de uma bomba de vácuo manual e congeladas (-20 °C) até a realização das análises (Aidar *et al.*, 2002). Os ramos também foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -20 °C até o processamento para as análises bioquímicas. Foram medidos o diâmetro a altura do peito (DAP) e diâmetro a altura do solo (DAS) de cada indivíduo (Figuras 1 e 2).

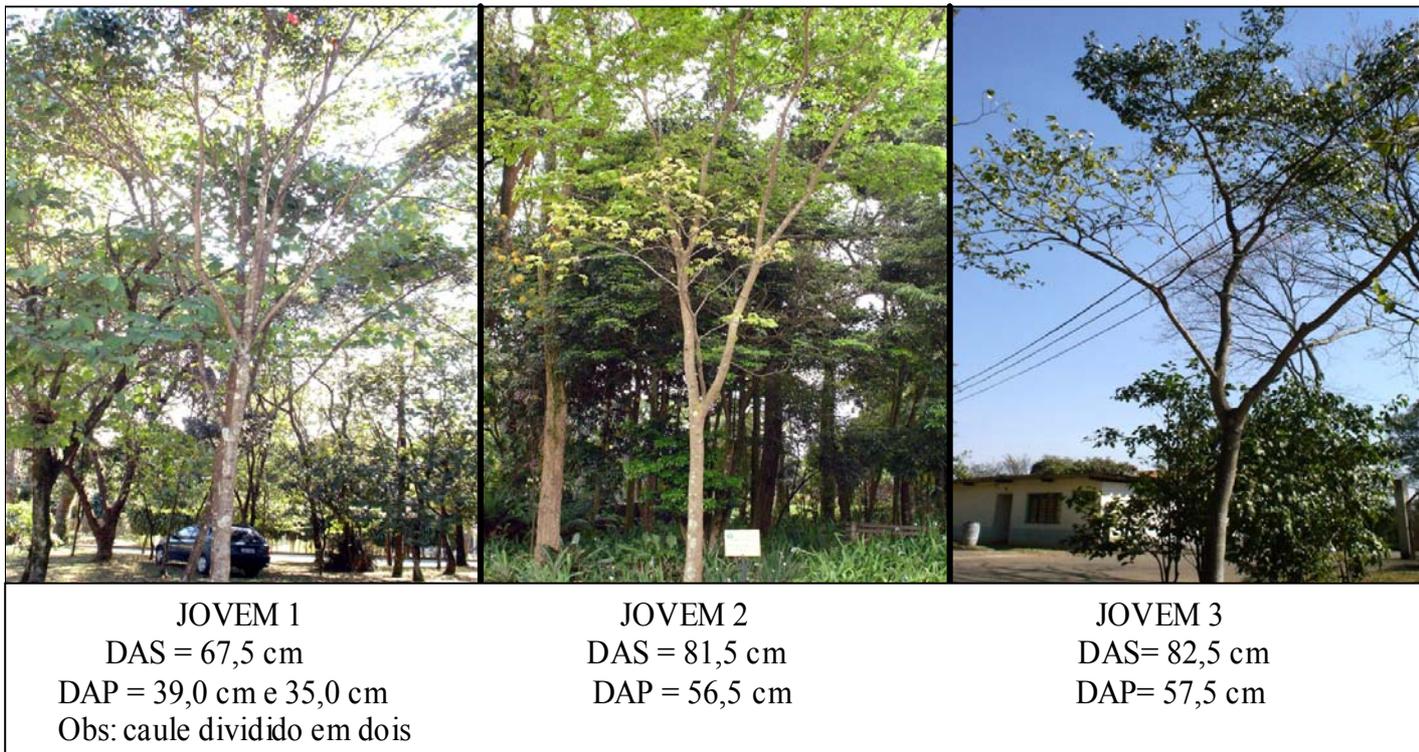


Figura 1. Aspecto geral dos indivíduos jovens e diâmetros a altura do solo e a altura do peito.



Figura 2. Aspecto geral dos indivíduos adultos amostrados.

2.2 Análise de solo

Uma amostra de cada indivíduo (10 cm de solo coletado a 2 m do indivíduo no mês de junho/06) foi encaminhada para análise de fertilidade e conteúdo total de nitrogênio no Departamento de Ciência do Solo – ESALQ/USP, Piracicaba.

2.3 Triagem do material vegetal

Com o intuito de amostrar a copa de maneira real e localizar sítios de acúmulo e mobilização das reservas de carbono e nitrogênio, estabeleceu-se classes de tamanho de folhas e ramos. Obteve-se 4 classes de folhas, partindo da base de inserção do órgão no pecíolo até o ápice: até 5 cm; 5,1-7,5 cm; 7,6-10 cm e maior que 10 cm de comprimento. Os ramos foram classificados de acordo com o diâmetro: até 0,5 cm; 0,5 -1 cm e maior que 1 cm.

Após a separação das folhas nas diferentes classes de tamanho, o material foi liofilizado e moído em moinho de bola para as análises bioquímicas.

2.3.2 Anatomia dos ramos

Para identificar os tecidos dos ramos utilizados para as análises bioquímicas, secções de aproximadamente 1,5 cm de comprimento foram coletados e imediatamente imersos em solução de FAA 70%, por 48 horas. Após esta etapa, o material permaneceu em etanol 70% até o momento da inclusão em polietilenoglicol (PEG) 2000, segundo Richter (1981). Para tanto, as amostras passaram por uma série etanólica (EtOH 50%, 30%, 10% e água permanecendo 1 hora em cada solução) e foram transferidas para uma solução de PEG a 20% em um becker dividido em 5 partes, permanecendo 3 dias em estufa a 60°C até que a solução atingisse 1/5 do volume inicial. As amostras foram então inclusas em PEG puro, os blocos foram preparados e realizou-se cortes em micrótomo rotatório (modelo CUT 4055, Olympus). O material foi corado com dupla coloração safranina 1% aquosa e azul de astra 1% aquoso na concentração 9:1, de acordo com Kraus & Arduin (1997).

2.4 Análises bioquímicas

As análises de carboidratos nas folhas e tecidos dos ramos (córtex e fibras + floema) foram realizadas por Cromatografia de Troca Iônica de Desempenho com Detector de Pulso Amperométrico (HPAEC/PAD) modelo ICS 3000, em coluna CarboPac (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, EUA) através de eluição isocrática com 250mM de hidróxido de sódio em água, com fluxo 0,25 mL/min : 0-15 min 40 % NaOH 250 mM e 60 % H₂O, 15-20 min 80 % NaOH 250 mM, 20-25 min 40 % NaOH 250 mM e 60 % H₂O. As áreas de cada pico foram corrigidas de acordo com a sensibilidade do detector para cada açúcar.

As seivas do xilema dos indivíduos jovens e adultos foram analisadas em HPLC conforme descrito no item 1.4.

2.5 Medidas de Fotossíntese

Medidas pontuais de fotossíntese foram realizadas nos meses de coleta utilizando o Sistema Portátil de Analisador de Gás Infra-Vermelho (IRGA), modelo LI 6400, LiCor, com PAR= 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, segundo padrão definido no laboratório (Aidar *et al.*, 2002)

2.6 Análise estatística

Os dados foram analisados através de teste ANOVA (LSD) e Teste t ($P < 0,05$) em software WINSTAT (R. Fitch Software, Cambridge, MA, EUA).

RESULTADOS

Experimento 1 – PLÂNTULAS

Crescimento e desenvolvimento

As plântulas de *Hymenaea courbaril* apresentaram crescimento gradual ao longo do período de observação, alcançando altura média de 35,19 cm e área foliar total média de 344,27 cm² ao final do experimento (Figura 3).

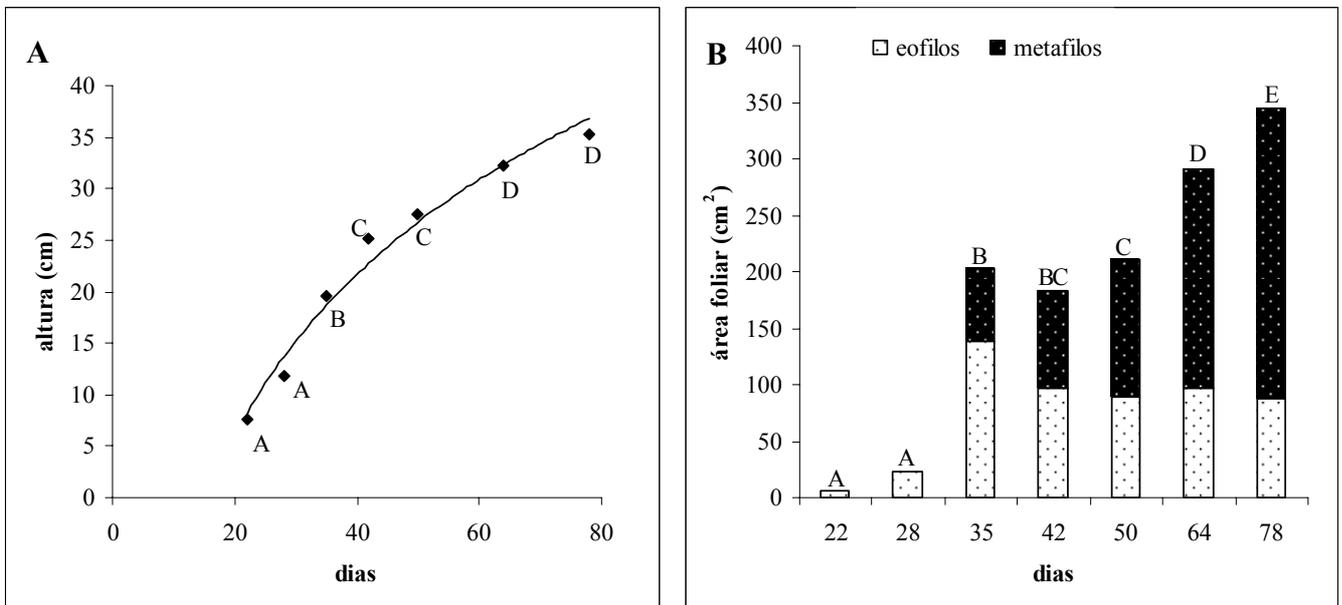


Figura 3. A – altura das plântulas (cm) e B – área foliar total (eófilos e folíolos dos metafílos - cm²) ao longo de 78 dias de experimento. Letras maiúsculas indicam diferença significativa em ANOVA $P < 0,05$ entre as datas de coleta. A significância no gráfico B é para a área foliar total.

Em relação à massa seca média (Figura 4), após 28 dias de experimento houve um decréscimo na massa dos cotilédones e aos 42 dias acentuou-se a queda dos mesmos. Após 50 dias, ocorreu um incremento de massa relacionado ao aumento do número de folhas (folíolos dos metafílos) e, conseqüentemente, aumento da área foliar total.

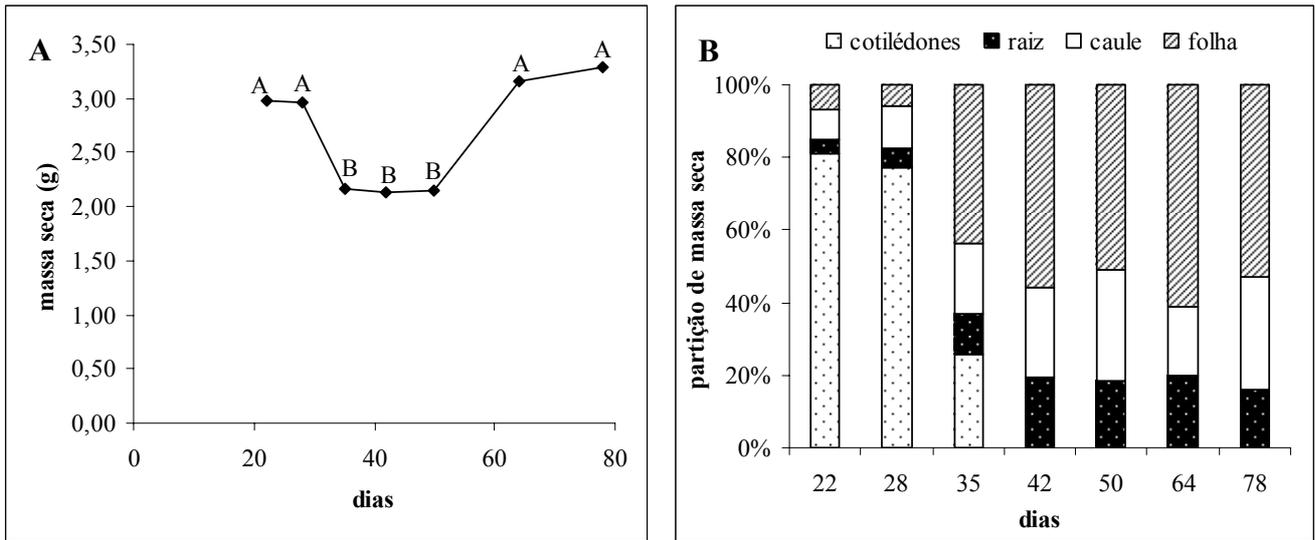


Figura 4. A – massa seca (g) das plântulas ao longo do experimento e B – partição da massa seca em cotilédones, raiz, caule e folhas. Letras maiúsculas indicam diferença significativa em ANOVA $P < 0,05$ entre as datas de coleta.

A razão raiz:parte aérea se manteve ao redor de 0,3 nas duas primeiras coletas, indicando maior investimento na parte aérea (70%) do que nas raízes (30%). Após esse período, a razão diminuiu para 0,19 e flutuações ocorreram ao longo do experimento, sendo que ao final do período de estudo a razão era 0,2 (Figura 5).

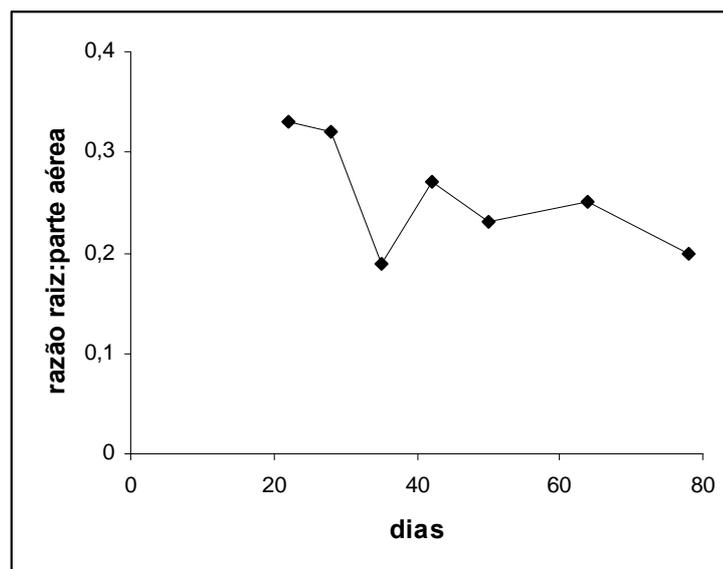


Figura 5. Razão raiz : parte aérea em plântulas de *Hymenaea courbaril*

As medidas de fluorescência da clorofila *a* sugerem que aos 35 dias após o início da embebição das sementes, o aparato fotossintético dos folíolos dos metáfilos, como indicado pela menor eficiência quântica, ainda não estava totalmente desenvolvido. Já aos 78 dias, não há diferença estatística entre os dois tipos foliares, indicando que neste período os metáfilos apresentam aparato fotossintético eficiente (Tabela 1).

Tabela 1. Fluorescência da clorofila *a* (F_v/F_m) em plântulas de *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*.

Letras maiúsculas indicam diferença significativa em ANOVA $P < 0,05$ entre as datas de coleta.

| Dias | eófilos | folíolos dos metáfilos |
|-------------|----------------|-------------------------------|
| 35 | 0,81 (0,01) A | 0,76 (0,02) B |
| 78 | 0,82 (0,01) A | 0,80 (0,02) A |

Análise de carboidratos nos diferentes órgãos

As análises por cromatografia de troca aniônica de carboidratos nos cotilédones revelaram que inicialmente há um baixo teor de monossacarídeos. Aos 22 dias de experimento, as concentrações de glucose, frutose e sacarose aumentaram significativamente e aos 35 dias ocorreu um pico máximo de glucose e frutose, enquanto a sacarose já estava presente em menores quantidades. Aos 42 dias os resultados indicam a senescência destes órgãos, que ocorre após a mobilização das reservas e desorganização de seus tecidos (Figura 6).

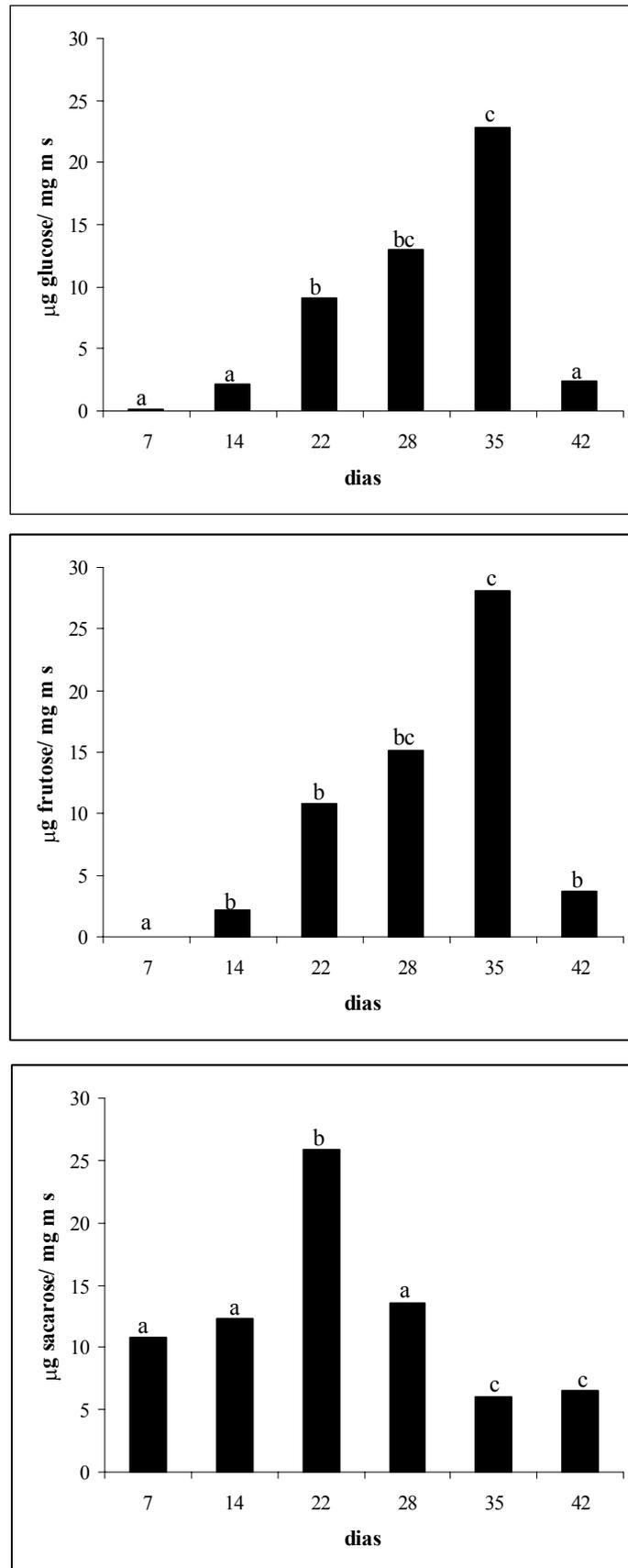


Figura 6. Análise de glucose, frutose e sacarose por cromatografia de troca aniônica (HPAEC/PAD) nos **cotilédones** ao longo do experimento ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de massa seca). Letras minúsculas indicam diferença significativa entre as datas de coleta em ANOVA, $P < 0,05$.

Os teores de amido (Figura 7) aumentaram gradualmente ao longo da mobilização das reservas cotiledonares, atingindo valores máximos aos 35 dias (5 vezes mais amido que ao início do experimento).

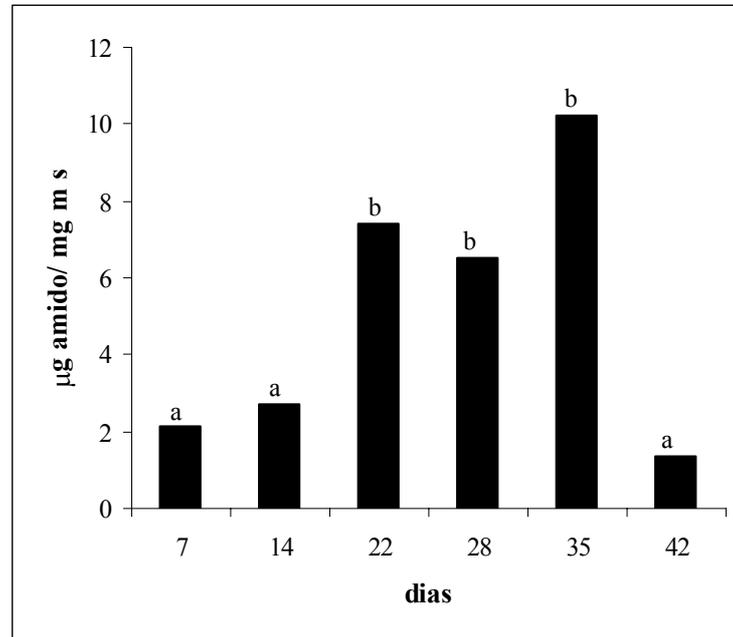


Figura 7. Teor de amido (μg / mg massa seca) nos **cotilédones** ao longo do experimento. Letras minúsculas indicam diferença significativa em ANOVA, $P < 0,05$.

Considerando as análises bioquímicas das raízes (Figura 8), é possível observar que dos 22 aos 28 dias, os conteúdos de glucose e frutose encontram-se mais elevados e a partir dos 42 dias os teores de monossacarídeos se mantêm estáveis. O conteúdo de sacarose também se mantêm constante, porém sofre uma queda entre os 42 e 49 dias.

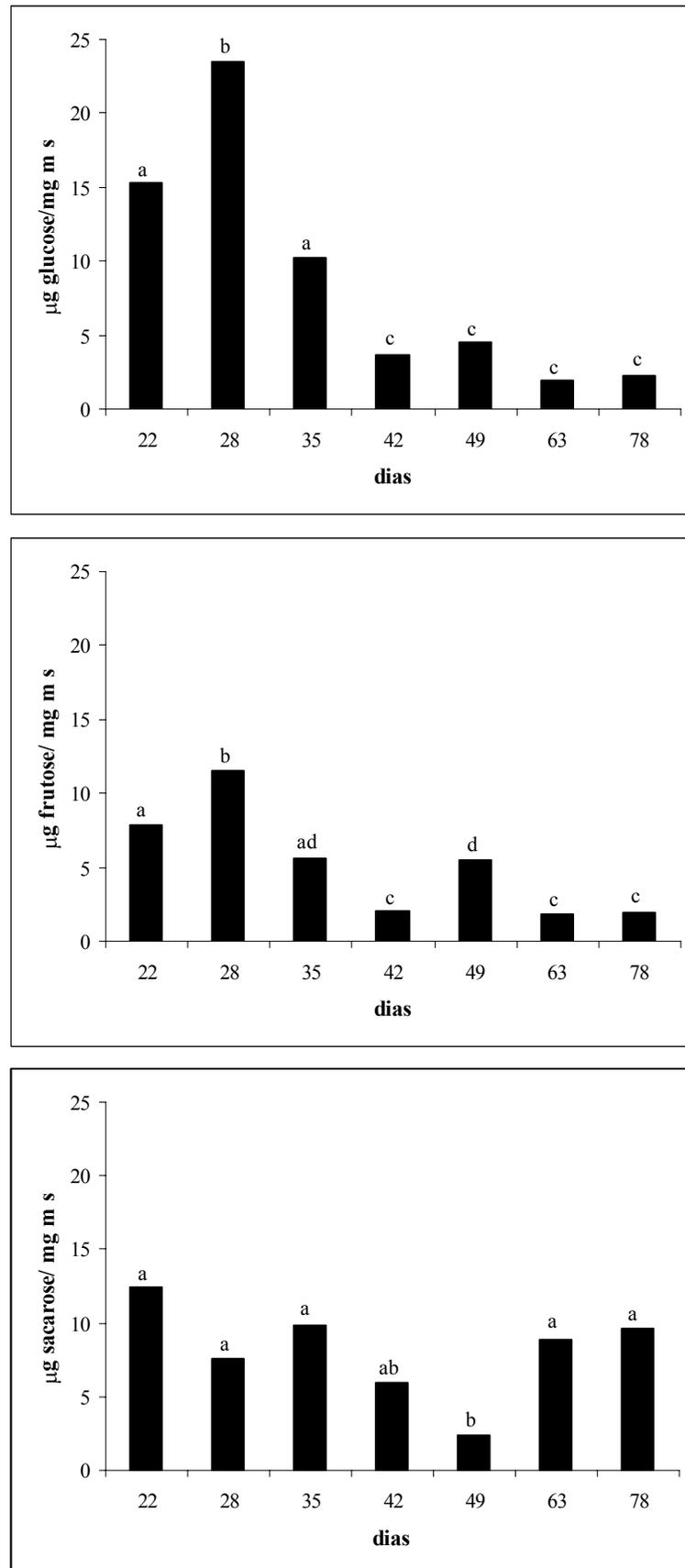


Figura 8. Análise de glucose, frutose e sacarose por cromatografia de troca aniônica (HPAEC/PAD) nas **raízes** ao longo do experimento ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de massa seca). Letras minúsculas indicam diferença significativa entre as datas de coleta em ANOVA, $P < 0,05$.

O teor de amido nas raízes (Figura 9) permaneceu constante ao longo de todo o período de estudo, havendo uma queda significativa aos 28 dias. Em comparação com os cotilédones, o conteúdo de amido nas raízes é bem superior (5 vezes mais).

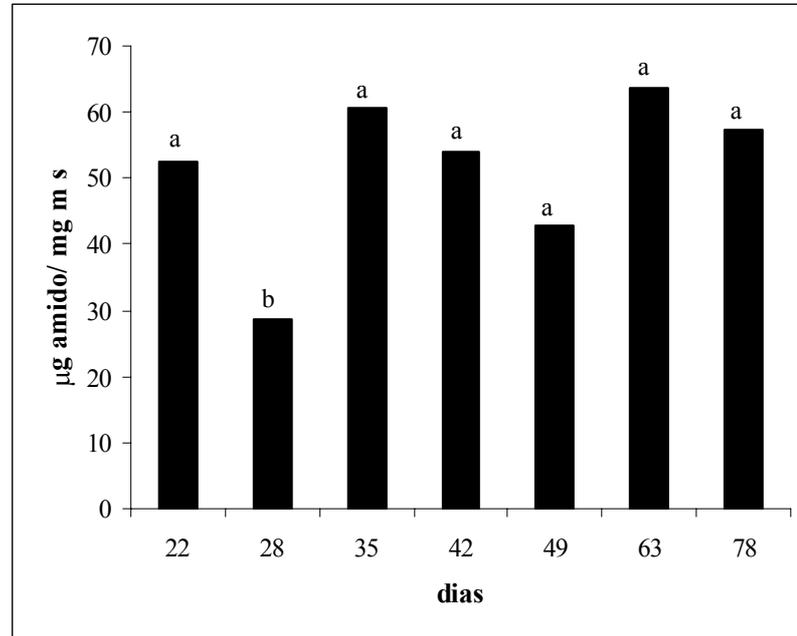


Figura 9. Teor de amido ($\mu\text{g} / \text{mg}$ massa seca) nas **raízes** ao longo do experimento. Letras minúsculas indicam diferença significativa em ANOVA, $P < 0,05$.

Em relação aos caules das plântulas (Figura 10), os teores de glucose, frutose e sacarose mantiveram-se mais elevados até os 28 dias, sugerindo que inicialmente as plântulas possam estar utilizando açúcares provenientes dos cotilédones para o alongamento do órgão. A partir dos 35 dias, os valores decaem significativamente mantendo-se constantes até o final do experimento.

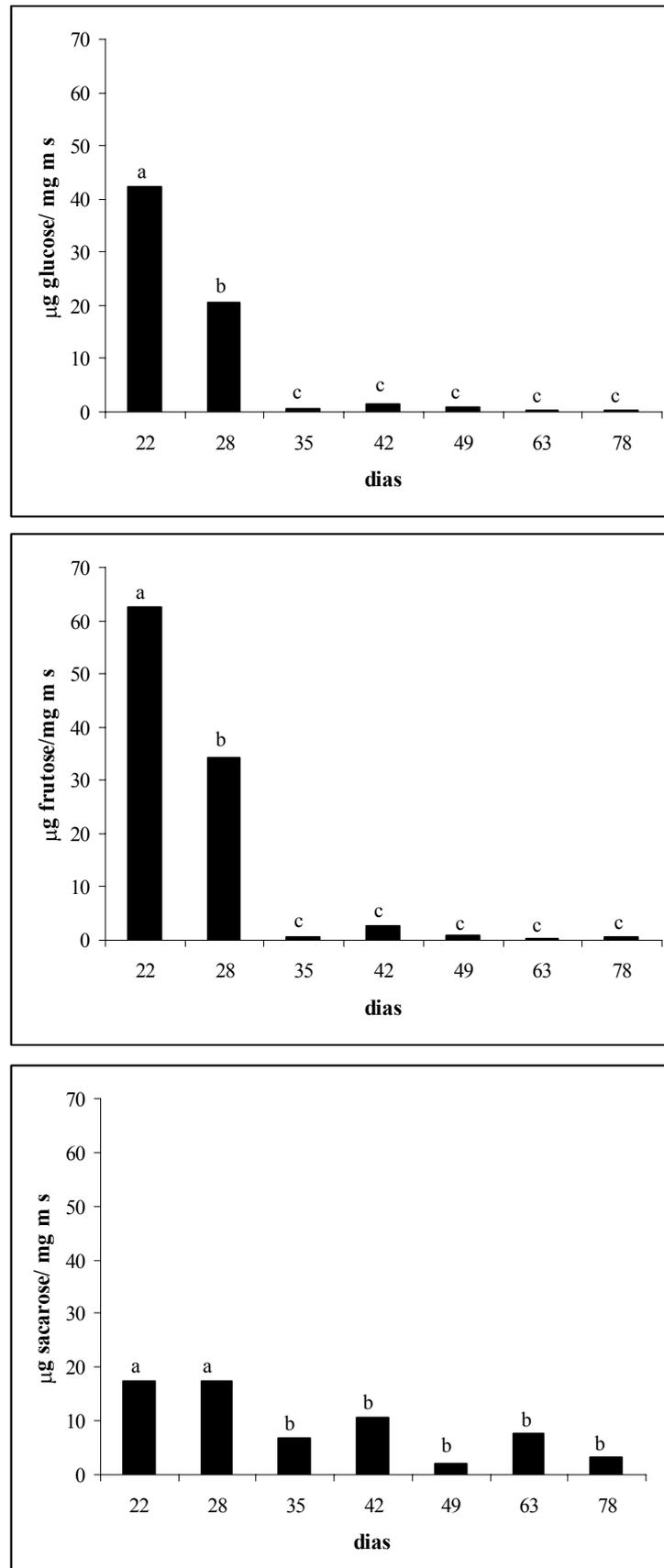


Figura 10. Análise de glucose, frutose e sacarose por cromatografia de troca aniônica (HPAEC/PAD) nos **caules** ao longo do experimento ($\mu\text{g/mg}$ de massa seca). Letras minúsculas indicam diferença significativa entre as datas de coleta em ANOVA, $P < 0.05$.

O caule apresentou os maiores teores de amido (Figura 11) quando comparado aos outros órgãos da plântula (cerca de 4 vezes mais amidos que as raízes e 24 vezes mais amido que os cotilédones).

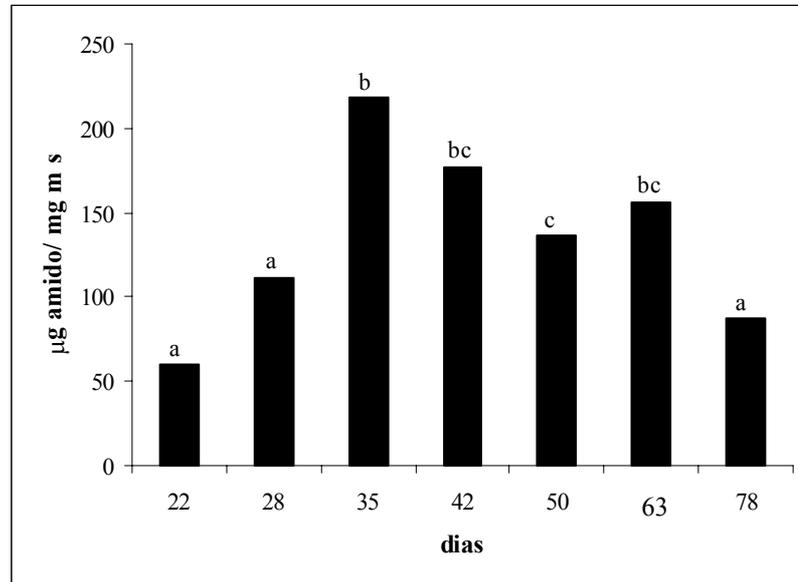


Figura 11. Teor de amido (μg / mg massa seca) nos **caules** ao longo do experimento. Letras minúsculas indicam diferença significativa em ANOVA, $P < 0,05$.

As folhas apresentaram maiores conteúdos de monossacarídeos até os 35 dias e a partir dos 42 dias os valores decaíram gradualmente até o final do experimento. Um pico máximo de sacarose ocorreu aos 42 dias, justamente quando os teores de monossacarídeos passam a decair (Figura 12). A quantidade de amido nas folhas foi insignificante ao longo do experimento, em torno de $0,05 \mu\text{g}$ amido/ mg de massa seca foliar (dados não mostrados).

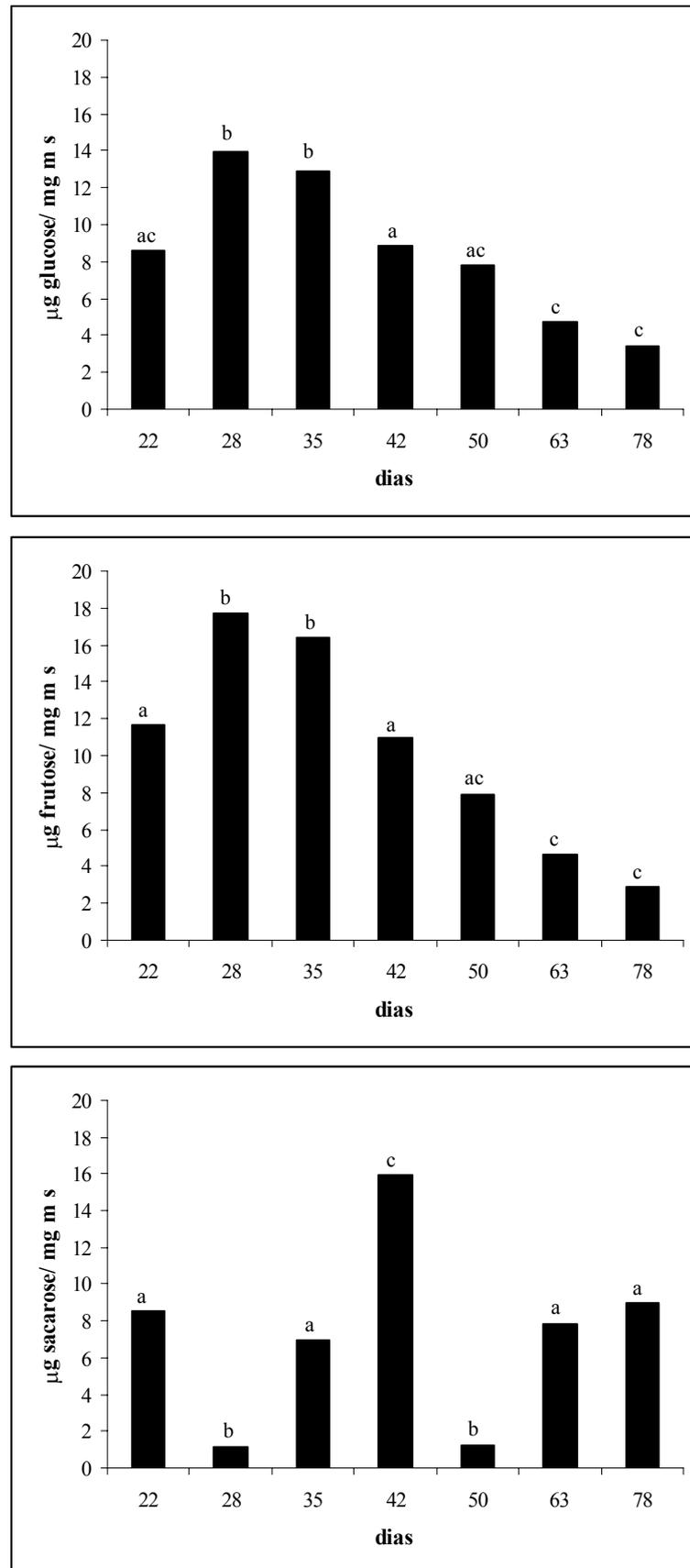


Figura 12. Análise de glucose, frutose e sacarose por cromatografia de troca aniônica (HPAEC/PAD) nas **folhas** ao longo do experimento ($\mu\text{g/mg}$ de massa seca). Letras minúsculas indicam diferença significativa entre as datas de coleta em ANOVA, $P < 0.05$.

Transporte no xilema

No perfil de compostos nitrogenados na seiva do xilema, ácido aspártico e asparagina são os aminoácidos que mais contribuem com o transporte de nitrogênio na plântula (Figura 13 A). Inicialmente, o transporte de nitrogênio é originado das proteínas de reserva dos cotilédones (cerca de 9% da massa seca), sendo que a arginina apresenta contribuição relevante no transporte durante o período de mobilização de reservas cotiledonares, a partir dos 35 dias, e voltando a decair após a mobilização (Figura 13 B).

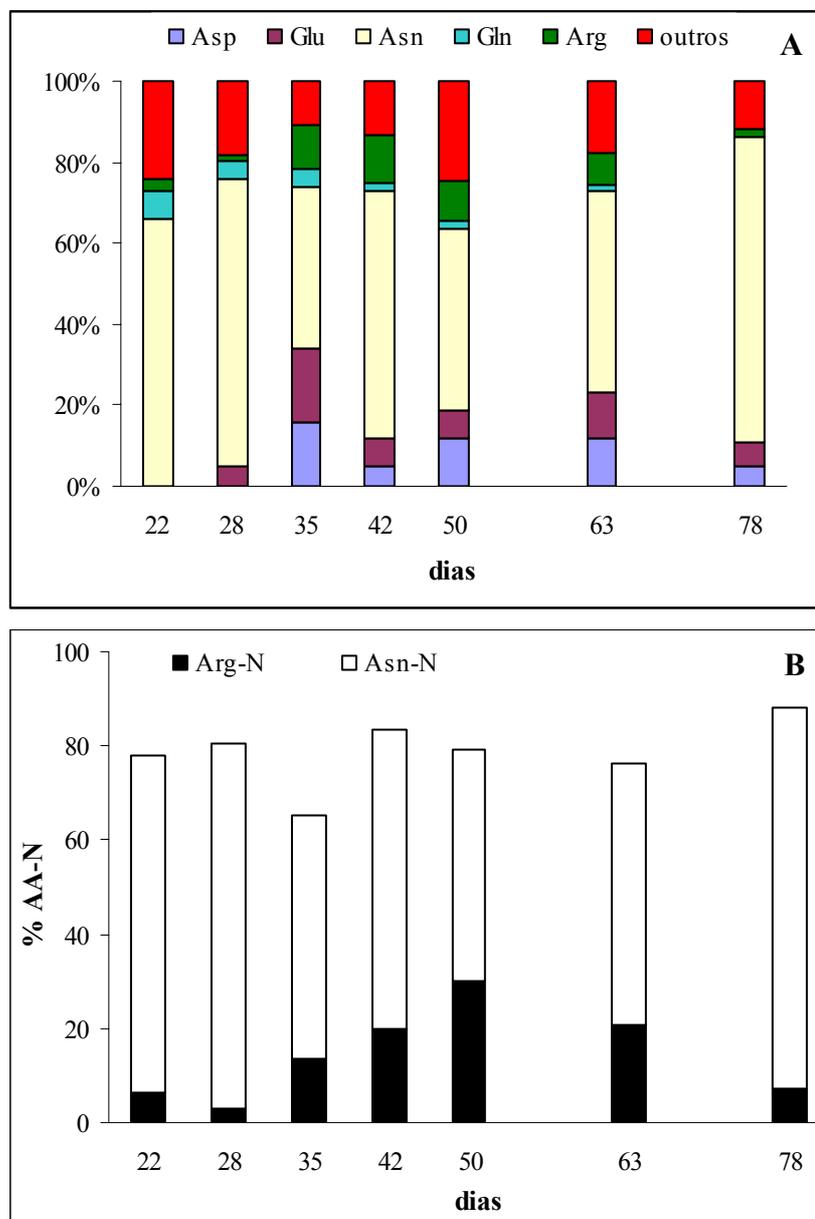


Figura 13. A- Perfil de aminoácidos presentes na seiva do xilema e B - Composição do transporte de aminoácidos na seiva do xilema em *Hymenaea courbaril* ao longo de 78 dias.

Quanto ao conteúdo de carboidratos na seiva do xilema, aos 28 dias ocorre um aumento significativo nos teores de glucose, frutose e sacarose, seguido de uma queda brusca. No decorrer do experimento, as concentrações desses compostos se mantiveram estáveis. A sacarose é a principal molécula de carbono constituinte da seiva do xilema em *H. courbaril* var. *stilbocarpa* (Figura 14).

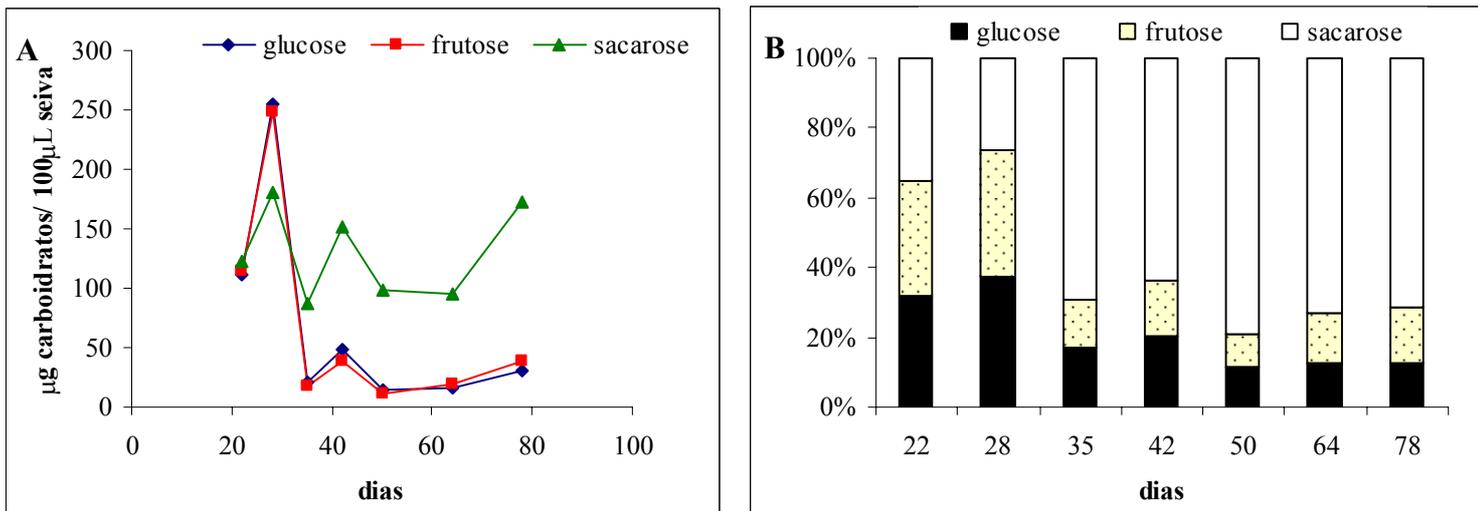


Figura 14. Conteúdo de carboidratos na seiva do xilema de *Hymenaea courbaril* em valores absolutos (A) e porcentagem (B).

Espectrometria de massas e fracionamento isotópico de ^{15}N

A análise por espectrometria de massas sugere que o processo de mobilização de reservas de nitrogênio, do ponto de vista relativo, não é claro nos cotilédones, pois a concentração deste elemento se mantém estável (cerca de 1% do tecido) ao longo do processo de germinação da semente e mobilização da reserva do polissacarídeo xiloglucano durante o estabelecimento da plântula (Figura 15 A). Entretanto, há uma indicação de maior concentração relativa de nitrogênio ou menor concentração de carbono aos 28 dias, visto que a relação C/N decresce após o período que coincide com o início da mobilização de proteínas e do carboidrato de reserva.

O conteúdo total de carbono nos cotilédones (Figura 15 B) foi determinado pela multiplicação da porcentagem de C nos órgãos e a massa seca dos mesmos na data de coleta. Houve um decréscimo contínuo da quantidade de carbono dos cotilédones ao longo do experimento, atingindo valores cerca de oito vezes menores do que o suprimento inicial de carbono originado das plantas mãe, composto principalmente pelo xiloglucano.

Também foi possível observar a mobilização de N dos corpos protéicos de reserva dos cotilédones (Figura 15 C), sendo que o conteúdo total de N decresce gradualmente, atingindo valores cerca de 5 vezes menores do que o suprimento inicial do órgão.

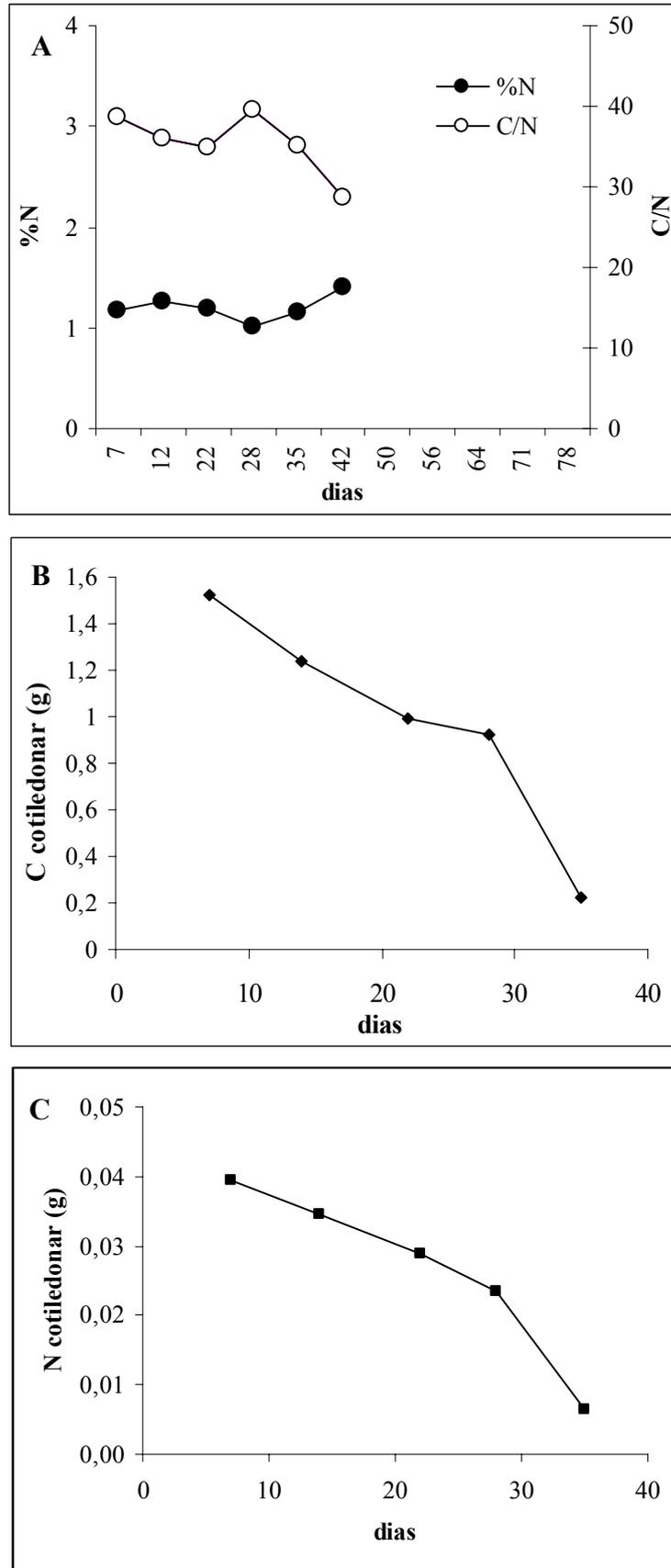


Figura 15. A – Análise por espectrometria de massas, B – Conteúdo total de C nos cotilédones e C – Conteúdo total de N nos cotilédones de *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*.

No caule, a concentração de nitrogênio decresce ao longo do desenvolvimento, apontando que o desenvolvimento produz uma maior quantidade relativa de tecido estrutural (dados não mostrados).

Já nas folhas a espectrometria de massas (Figura 16 A), revela duas situações distintas: as duas primeiras coletas estão representadas exclusivamente por eófilos, que apresentaram uma maior concentração de nitrogênio (cerca de 3% do tecido). Após esse período, a concentração de nitrogênio decresce e se mantém estável ao longo do desenvolvimento da plântula (cerca de 2%).

Também foi determinado o conteúdo total de N foliar (Figura 16 B), apontando um incremento contínuo deste elemento nas folhas, que atinge um máximo de 0,46g aos 64 dias de experimento.

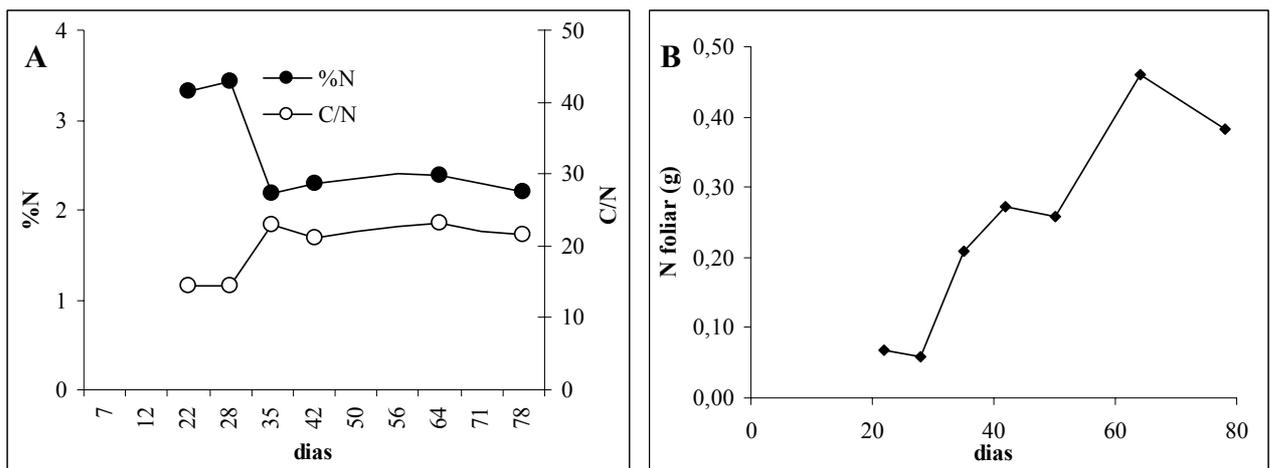


Figura 16. A - Análise por espectrometria de massas e B - conteúdo de nitrogênio no tecido (%) em folhas de *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*.

Em relação ao fracionamento isotópico de nitrogênio (Figura 17), os dados demonstram que existe aquisição de nitrogênio “novo” a partir da assimilação de nitrogênio inorgânico na forma de amônio pelas raízes aos 64 dias, quando os valores de delta decaem significativamente. O nitrogênio oriundo da reserva materna apresenta $\delta^{15}\text{N} = +6$, considerado nitrogênio altamente metabolizado.

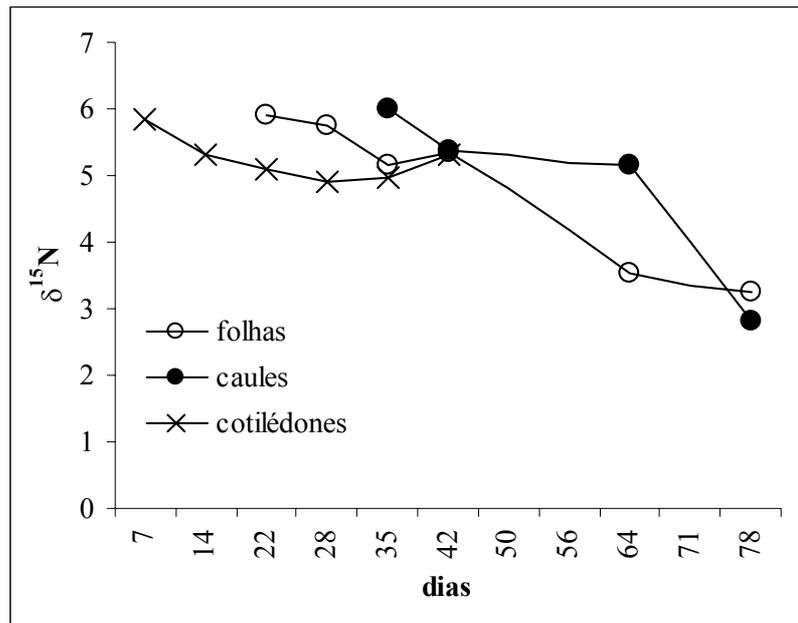


Figura 17. Fracionamento isotópico de nitrogênio em cotilédones, caules e folhas de *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* ao longo do estabelecimento das plântulas.

EXPERIMENTO 2- INDIVÍDUOS JOVENS E ADULTOS

Análises de solo

As análises de solo (Tabela 2) revelaram que o pH médio dos solos onde encontram-se os indivíduos jovens e adultos é 4,5 e o conteúdo de nitrogênio total médio é igual a 0,14%. Os solos apresentam conteúdo de matéria orgânica relativamente alto e o volume de bases indica que de modo geral são solos mesotróficos.

Tabela 2. Análise de solo onde encontram-se indivíduos jovens (J) e adultos (A) de *H. courbaril*. M.O.= matéria orgânica, P = fósforo, K = potássio, Ca = cálcio, Mg = magnésio, H + Al = alumínio, SB = soma de bases, T = capacidade de troca catiônica, V = volume de bases, N = nitrogênio total, desv. pad = desvio padrão.

| amostra | pH | M.O. | P | K | Ca | Mg | H + Al | SB | T | V | N |
|------------|-------------------|--------------------|---------------------|-----------------------|-----------|------------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
| | CaCl ₂ | g dm ⁻³ | mg dm ⁻³ | mmol dm ⁻³ | | | | | | % | |
| A 1 | 4 | 48 | 4 | 4 | 15 | 12 | 88 | 31 | 119 | 26 | 0,17 |
| A 2 | 4,9 | 45 | 12 | 1 | 57 | 15 | 42 | 73 | 115 | 62 | 0,13 |
| J 1 | 5,3 | 42 | 3,3 | 2 | 71 | 17 | 34 | 90 | 124 | 73 | 0,13 |
| J 2 | 4 | 39 | 6 | 1 | 24 | 8 | 80 | 33 | 113 | 29 | 0,17 |
| J 3 | 4,3 | 26 | 3 | 2 | 19 | 6 | 42 | 27 | 68,7 | 39 | 0,08 |
| média | | 40 | 5,7 | 2 | 37 | 12 | 57,2 | 51 | 108 | 46 | 0,14 |
| desv. pad. | | 8,5 | 3,7 | 1 | 25 | 4,6 | 24,8 | 29 | 22,4 | 21 | 0,04 |

Análises em folhas de *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*

Em relação à assimilação de CO₂ (Figura 18) em folhas de *Hymenaea courbaril*, os menores valores foram obtidos no mês de agosto/05 para os indivíduos adultos (6 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹) e no mês de outubro/05 para jovens (5,5 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹). Em agosto observou-se a queda acentuada de folhas e em outubro iniciou-se a expansão de novas folhas, ou seja, época

de reconstrução da copa após a senescência. *H. courbaril* é uma espécie tropical semi-decídua, que perde tecido fotossintético na estação seca. A partir de dezembro/05, os valores de assimilação chegam a $10\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e se mantiveram estáveis até abril/06, sendo similares para jovens e adultos.

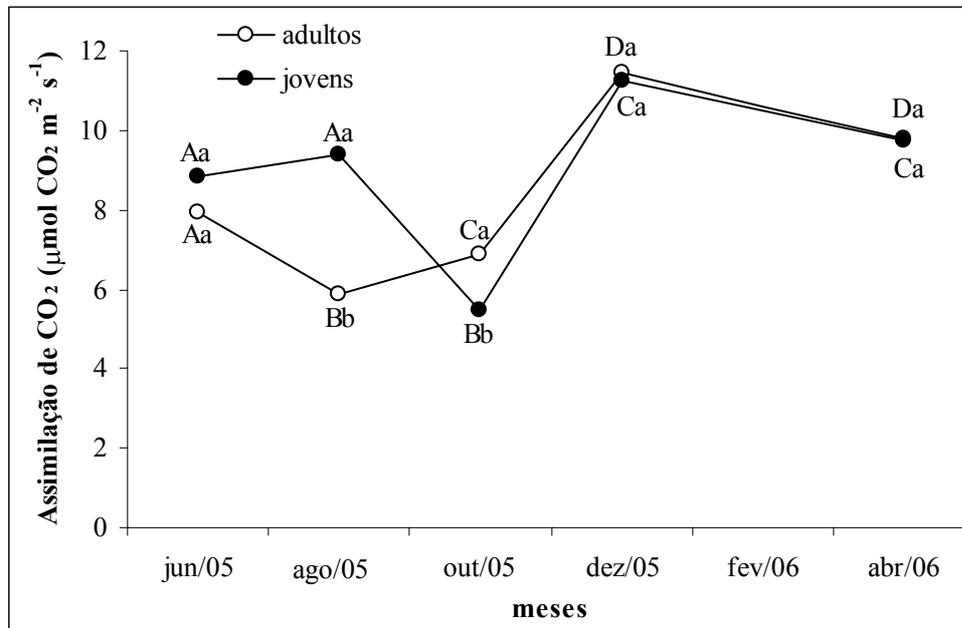


Figura 18. Assimilação fotossintética das plantas jovens (N = 6) e adultas (N = 4) de *H. courbaril* ao longo do período de experimento. Letras diferentes indicam diferença para ANOVA e Teste T, $P < 0,05$; letras maiúsculas indicam diferença entre os indivíduos jovens e adultos em um mesmo período e letras minúsculas indicam diferença entre os meses de coleta.

A análise de carboidratos solúveis em folhas de indivíduos jovens e adultos de *H. courbaril* (Figura 19) mostrou que durante todo o período de estudo os monossacarídeos glucose e frutose estão presentes em menores quantidades que a sacarose, sendo as maiores concentrações encontradas entre junho e outubro/05. A sacarose aparece presente em maiores teores em junho e agosto/05, época em que a senescência foliar foi observada, sendo que após este período ocorre uma queda significativa deste carboidrato, que permanece em concentrações inferiores a $20 \mu\text{g}/\text{mg}$ massa seca até abril/06.

Os açúcares álcoois apresentaram um pico significativo nos cromatogramas, correspondendo ao tempo de retenção do mio-inositol. As concentrações destes açúcares permaneceram constantes ao longo do período de estudo.

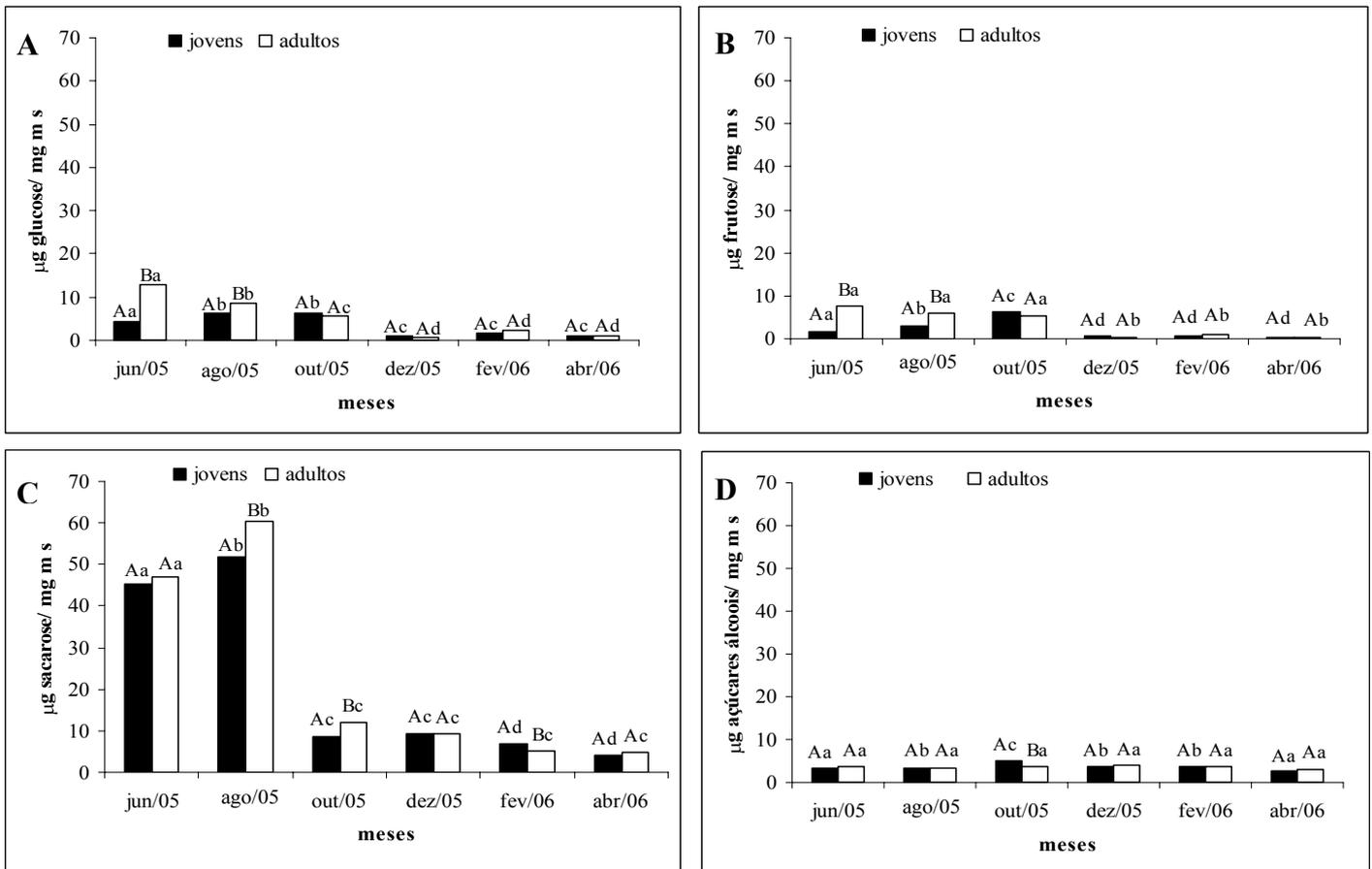


Figura 19. Análise qualitativa de carboidratos solúveis por HPAC-PAD em **folhas** de indivíduos jovens e adultos de *H. courbaril*: A – glucose, B – frutose, C – sacarose e D – açúcares álcoois. Letras diferentes indicam diferença significativa em ANOVA e Teste T, $P < 0,05$; letras maiúsculas indicam diferença entre os indivíduos jovens e adultos e letras minúsculas indicam diferença entre os meses de coleta.

Ao observar a razão sacarose/monossacarídeos de folhas de *H. courbaril* (Tabela 3) é possível perceber uma queda gradativa da razão até o mês de outubro, após o período de deciduidade e durante a expansão foliar. Em dezembro, no auge da estação de crescimento, os valores aumentaram significativamente, marcando uma transição funcional. Este resultado, juntamente com a assimilação fotossintética (Figura 18) sugerem que neste mês as folhas formadas passam a não depender de sacarose externa, não mais configurando órgãos dreno e constituindo tecidos capazes de produzir fotoassimilados em concentrações suficientes para sua própria manutenção e para exportação de carboidratos.

Tabela 3. Razão sacarose/monossacarídeos em **folhas** de indivíduos jovens e adultos de *H. courbaril*.

| mês | S/M | |
|--------|--------|---------|
| | Jovens | Adultos |
| jun/05 | 7,58 | 2,31 |
| ago/05 | 5,60 | 4,11 |
| out/05 | 0,67 | 1,09 |
| dez/05 | 6,68 | 11,50 |
| fev/06 | 2,87 | 1,41 |
| abr/06 | 2,88 | 4,47 |

A quantificação de amido nas folhas de indivíduos jovens e adultos de *H. courbaril* (Figura 20) indica um aumento expressivo nos meses de outubro e dezembro/05 em indivíduos jovens, atingindo cerca de 15 μg de amido/ mg de massa seca de folha e coincidindo com a estação de crescimento. Após esse período os valores decaíram significativamente, atingindo menores valores no mês de fevereiro/06.

Em indivíduos adultos o teor máximo de amido foi encontrado no mês de agosto/05 e nos meses seguintes sempre os valores encontrados nos indivíduos jovens foram superiores aos encontrados em indivíduos adultos.

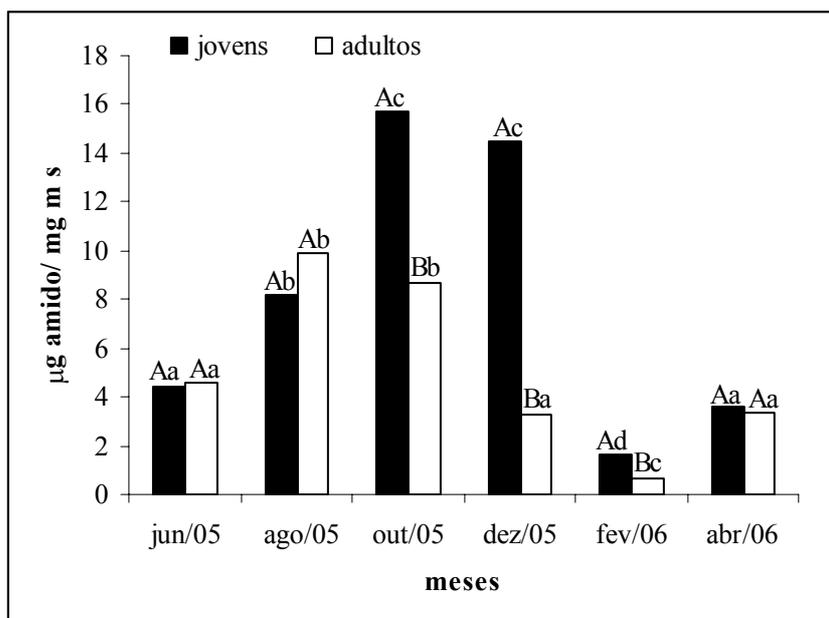


Figura 20. Teor de amido em **folhas** de indivíduos jovens e adultos de *H. courbaril* no período de junho/05 a abril/06. Letras diferentes indicam diferença significativa em ANOVA e Teste T, $P < 0,05$; letras maiúsculas indicam diferença entre os indivíduos jovens e adultos e letras minúsculas indicam diferença entre os meses de coleta.

A análise do conteúdo total de carbono e nitrogênio nas folhas e o fracionamento isotópico (Figura 21) indica uma queda na razão C/N no mês de outubro/05, como consequência do aumento de concentração de N foliar (figura 21 B). Após este período, a razão volta a aumentar, atingindo valores similares ao de junho/2005. O mesmo acontece com o conteúdo de N foliar, que após aumento em outubro/05 volta a valores similares aos meses que antecederam o período de mobilização para a folha. A assinatura isotópica da folha modifica-se conforme a origem do nitrogênio utilizado no metabolismo foliar, podendo indicar também a transição fonte-dreno. Entre agosto e dezembro/2005 o sinal torna-se mais positivo (de 0,5 a 2,2), o que reflete provavelmente a utilização de nitrogênio metabolizado das reservas estocadas durante o período de inverno.

A razão isotópica de carbono também evidencia uma diferenciação no metabolismo de assimilação de C, sendo que durante o período de reconstrução da copa os valores se tornam menos negativos. A porcentagem de ^{13}C também sofre alteração no mesmo mês (outubro/05).

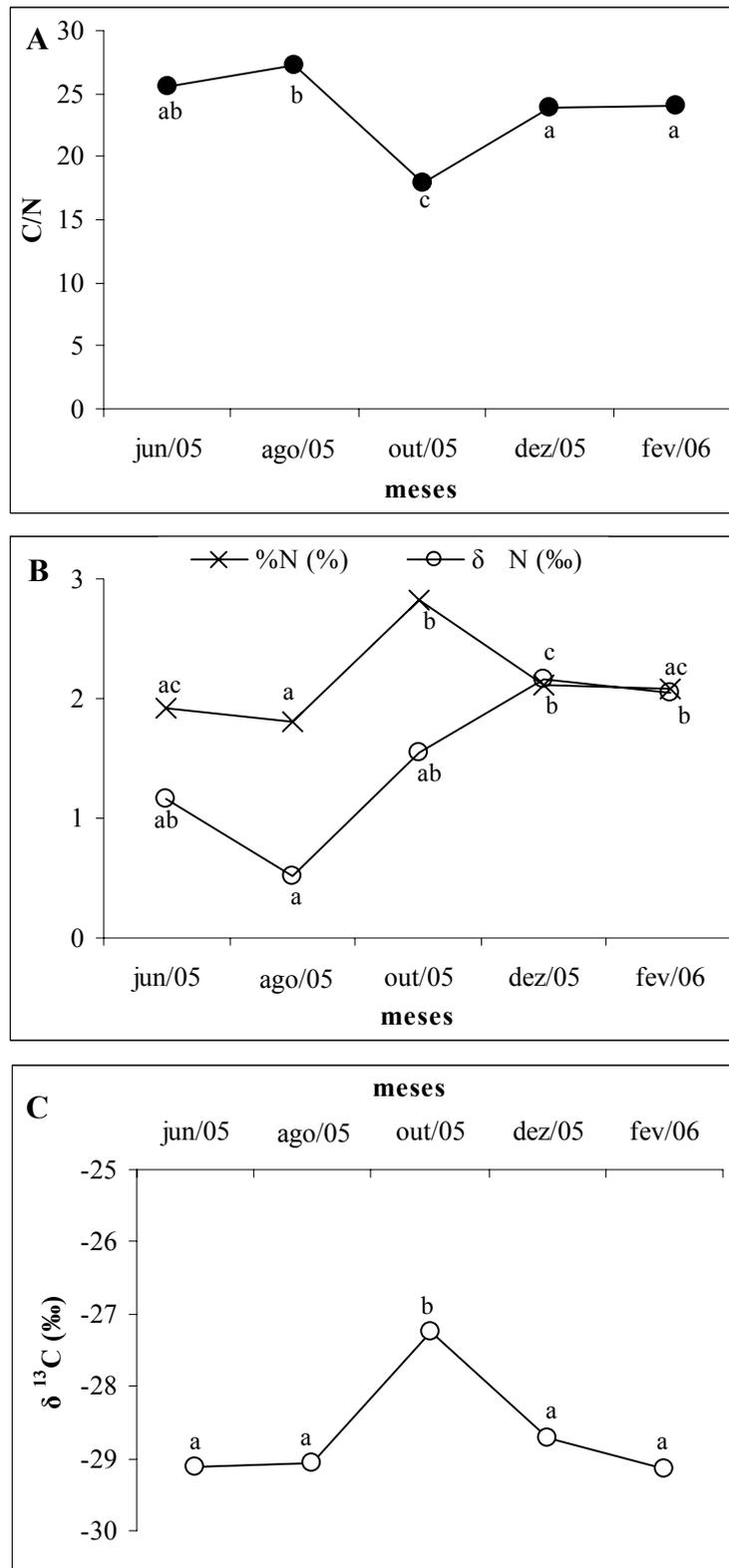


Figura 21. A – Razão C/N, B – fracionamento isotópico do $\delta^{15}\text{N}$ e C – fracionamento isotópico do $\delta^{13}\text{C}$ em **folhas** de *H. courbaril*. Letras diferentes indicam diferença significativa em ANOVA $< 0,05$ entre os meses de coleta.

Anatomia dos ramos de *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*

Para as análises bioquímicas nos caules, foram selecionados dois tecidos de interesse localizados na casca: córtex e floema + fibras.

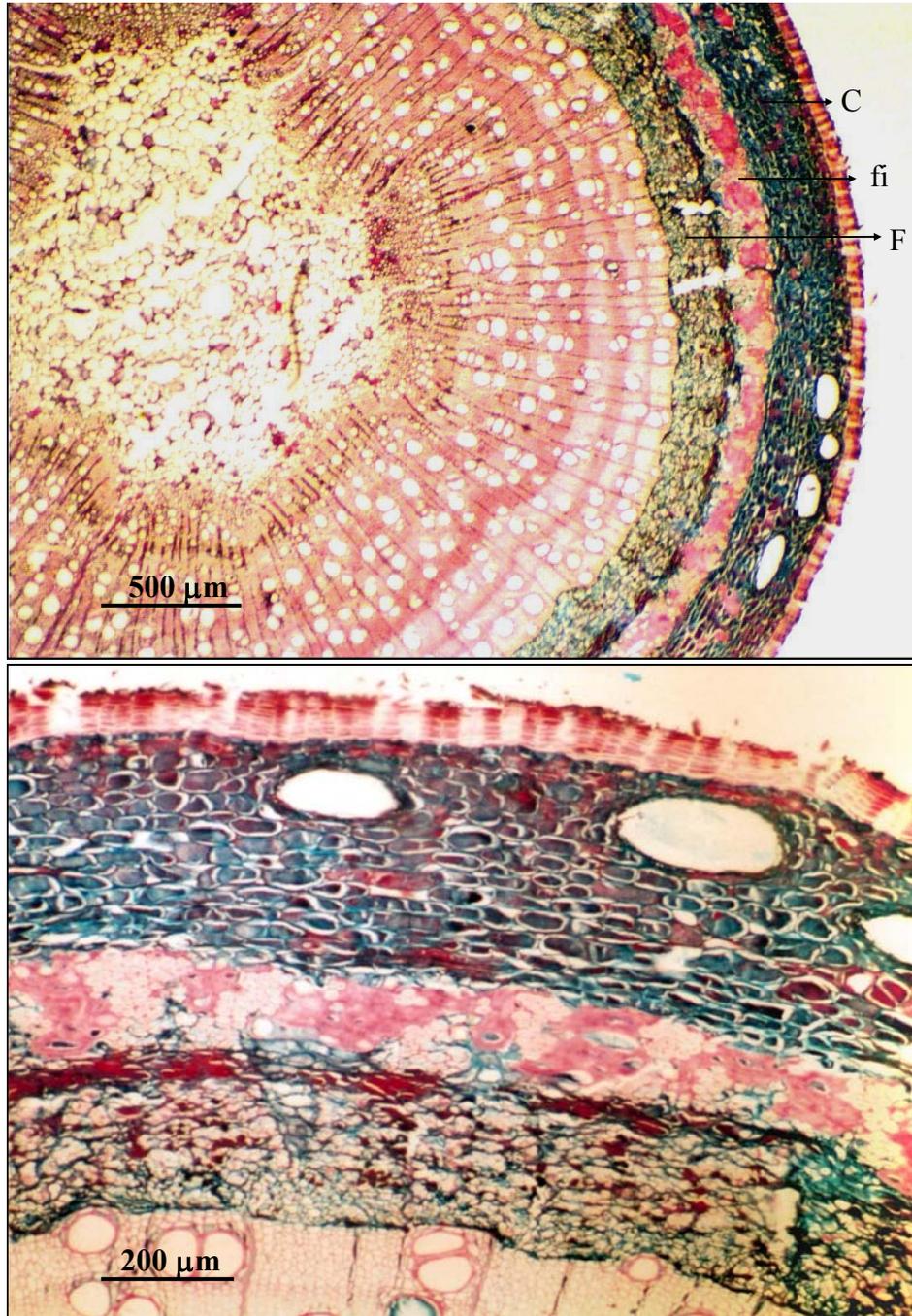


Figura 22. Cortes anatômicos de **ramos** de indivíduo adulto de *H. courbaril* var. *stilbocarpa*. C = córtex, fi = fibras e F = floema.

Análises bioquímicas em caules de *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*

A análise de carboidratos solúveis no caule (Figura 23) revelou comportamento semelhante para indivíduos jovens e adultos e os resultados mostrados são médias do conjunto dados obtidos. O córtex e floema apresentaram valores semelhantes para os níveis de glucose, frutose e açúcares álcoois. Assim como nas folhas, os níveis de sacarose atingem um pico máximo no mês de agosto (15 ug/mg massa seca no córtex e 27ug/mg massa seca no floema) e decrescem em outubro, permanecendo constantes até o fim do período de estudo. Observou-se uma diferença significativa em relação aos teores de sacarose, mais elevados no floema que no córtex (cerca de duas vezes mais).

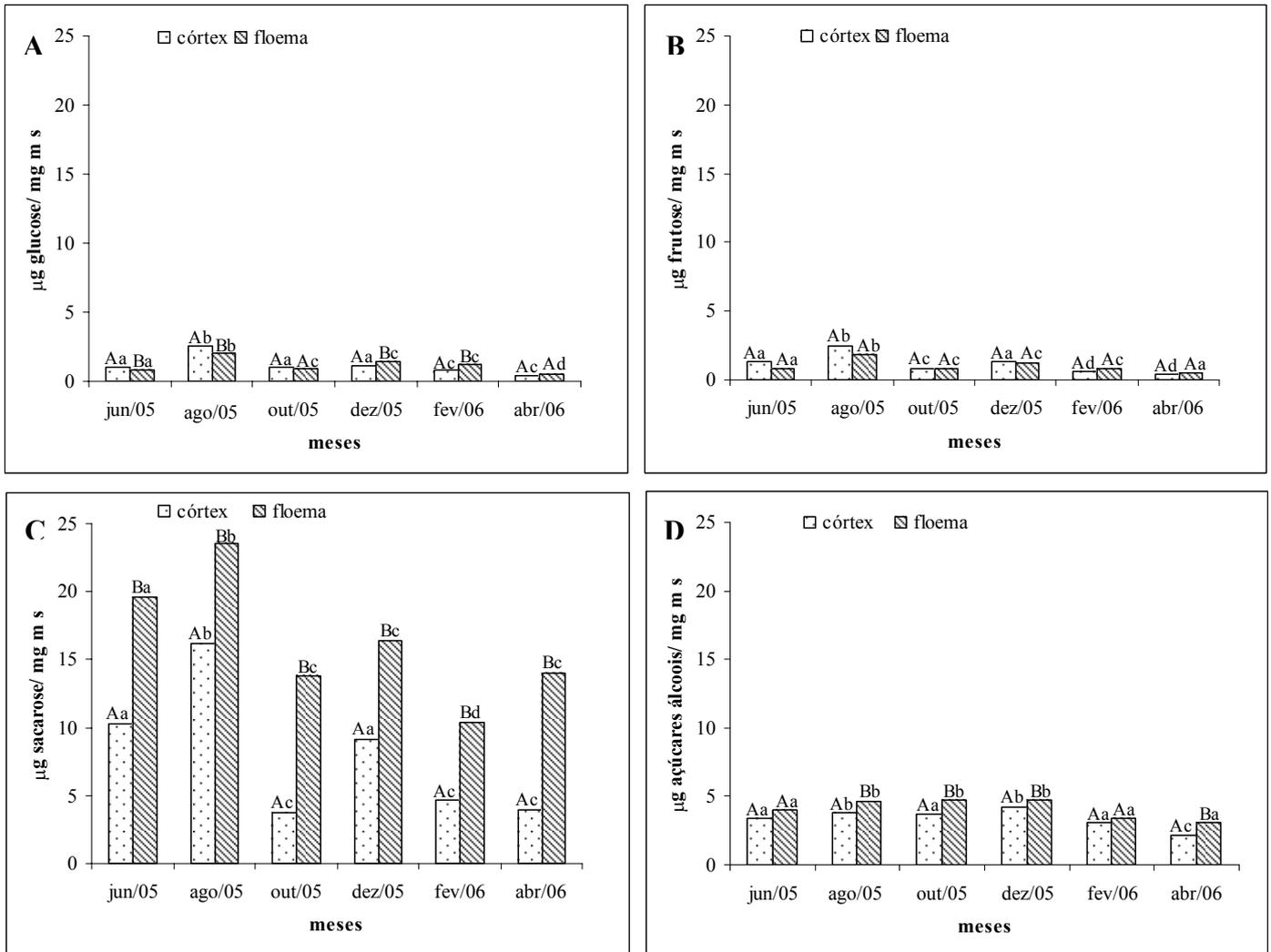


Figura 23. Análise de carboidratos solúveis por HPAEC-PAD nos caules de indivíduos jovens e adultos de *H. courbaril* em diferentes tecidos: A – glucose, B – frutose, C – sacarose e D – açúcares álcoois. floema. Letras diferentes indicam diferença significativa em ANOVA e Teste T, $P < 0,05$; letras maiúsculas indicam análise entre os tecidos do ramo letras minúsculas indicam diferença entre os meses de coleta num mesmo tecido.

Os teores de amido no córtex caulinar (Figura 24) foram significativamente maiores no mês de agosto/05, período que coincide com a senescência foliar sazonal. Os valores permaneceram mais elevados em indivíduos adultos, na maioria das datas de coleta. Por ser um composto exclusivamente de reserva, os resultados confirmam que o córtex é o tecido caulinar que mais contribui para o armazenamento de carboidratos.

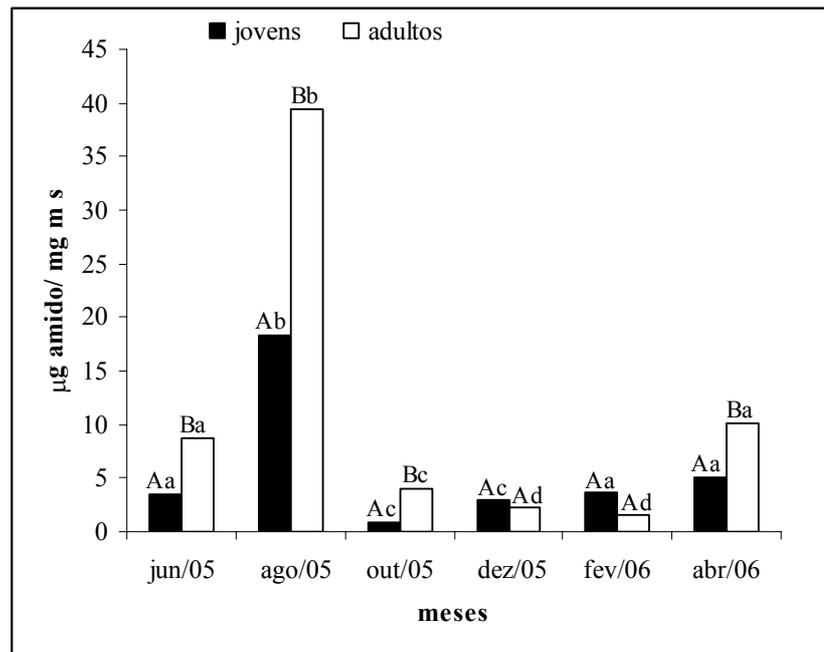


Figura 24. Teor de amido no **córtex** de *H. courbaril*: A – indivíduos jovens e B – indivíduos adultos. Letras diferentes indicam diferença significativa em ANOVA e Teste-T, $P < 0,05$; letras maiúsculas indicam análise entre os tecidos e letras minúsculas indicam diferença entre os meses de coleta.

Análises bioquímicas na seiva do xilema de *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*

O perfil de compostos nitrogenados na seiva do xilema de indivíduos jovens e adultos de *H. courbaril* (Figura 25) mostrou a presença dos aminoácidos ácido aspártico, ácido glutâmico, asparagina e arginina. Em indivíduos jovens ainda observou-se traços de glutamina. O transporte de N em indivíduos jovens e adultos é realizado pelos aminoácidos ácido aspártico/asparagina, como também já observado em plântulas.

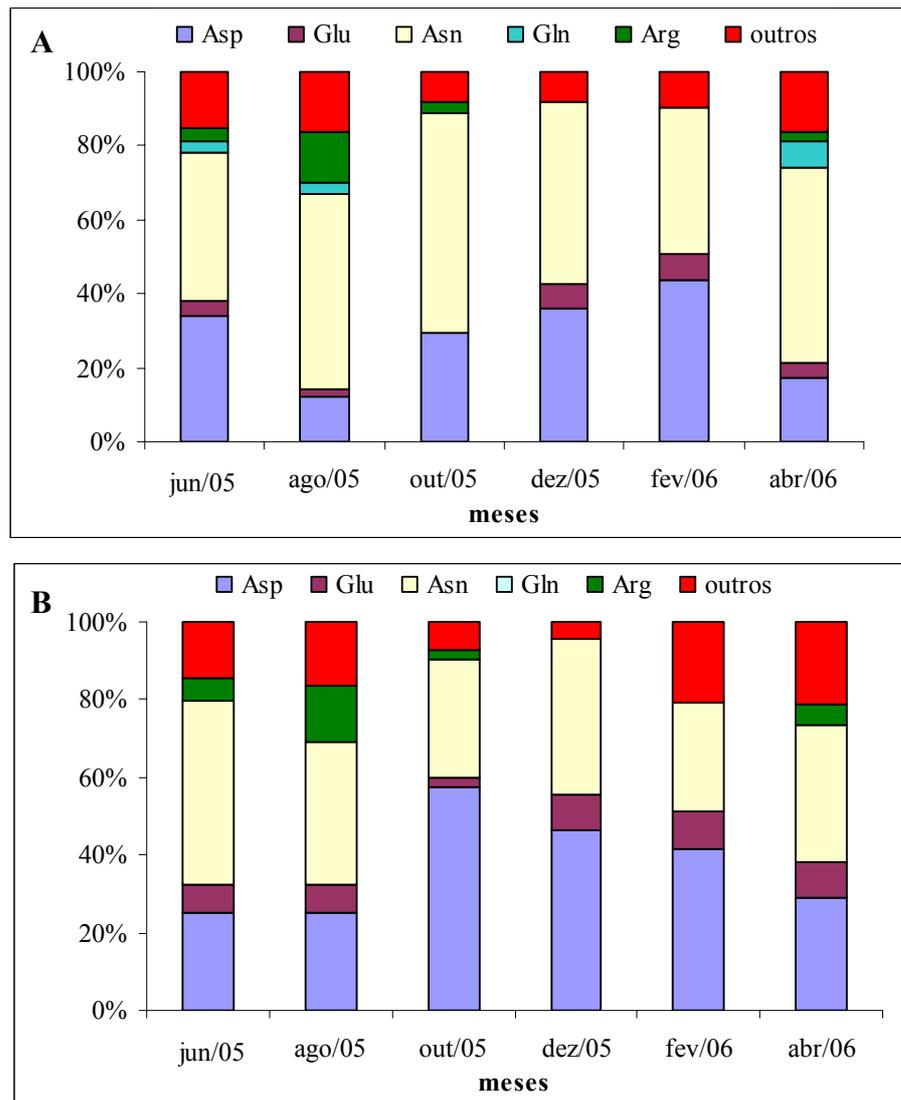


Figura 25. Perfil de aminoácidos presentes na seiva do xilema ao longo das estações do ano em indivíduos jovens (A) e adultos (B) de *H. courbaril*.

A porcentagem de nitrogênio transportado por cada aminoácido (Figura 26) indicou que a arginina começa a ser estocada no outono e inverno (junho a agosto). Durante o início da estação de crescimento (outubro a dezembro), os níveis de arginina decaem e em abril/06 a planta voltou a estocar este aminoácido.

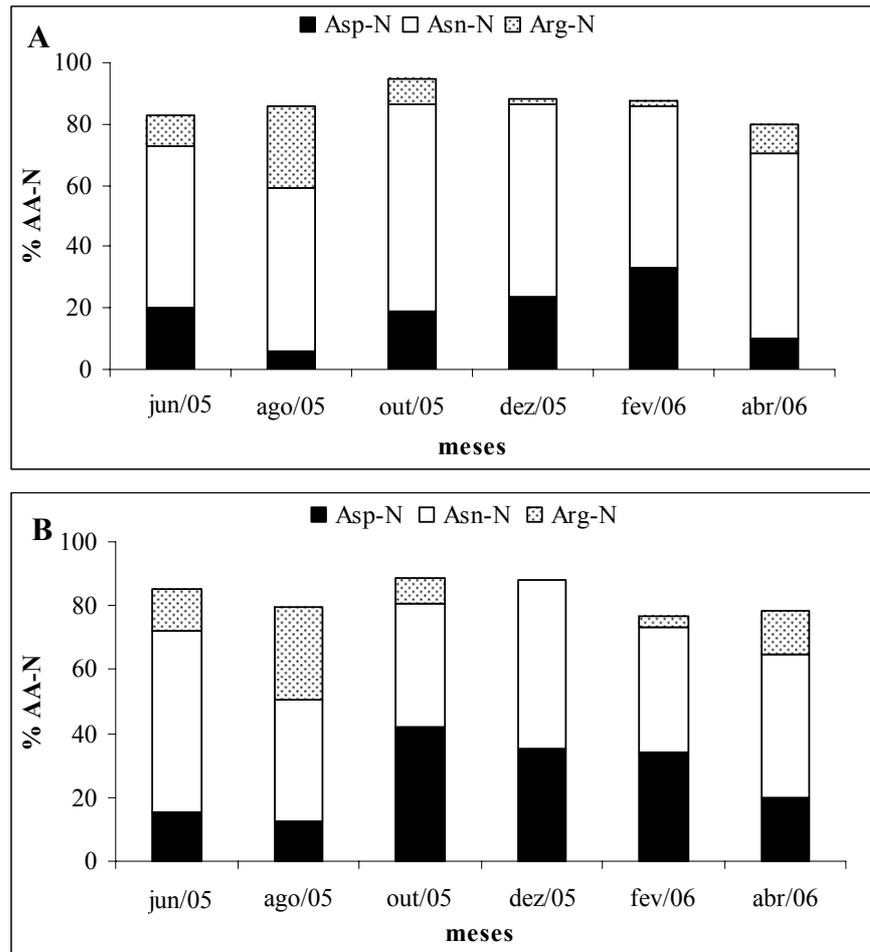


Figura 26. Porcentagem do transporte de nitrogênio em aminoácidos na seiva do xilema de indivíduos jovens (A) e adultos (B) de *H. courbaril*.

A análise qualitativa de carboidratos na seiva do xilema de indivíduos jovens e adultos de *H. courbaril* (Figura 27) mostrou que os monossacarídeos glucose e frutose se mantêm baixos (em torno de 50 $\mu\text{g/ml}$ de seiva) de junho a outubro/05. De dezembro/05 a abril/06, o teor de monossacarídeos aumenta cerca de 4 vezes. Os níveis de sacarose sofrem decréscimo no mês de outubro, como também observado em folhas (Figura 19) e tecidos caulinares (Figura 23).

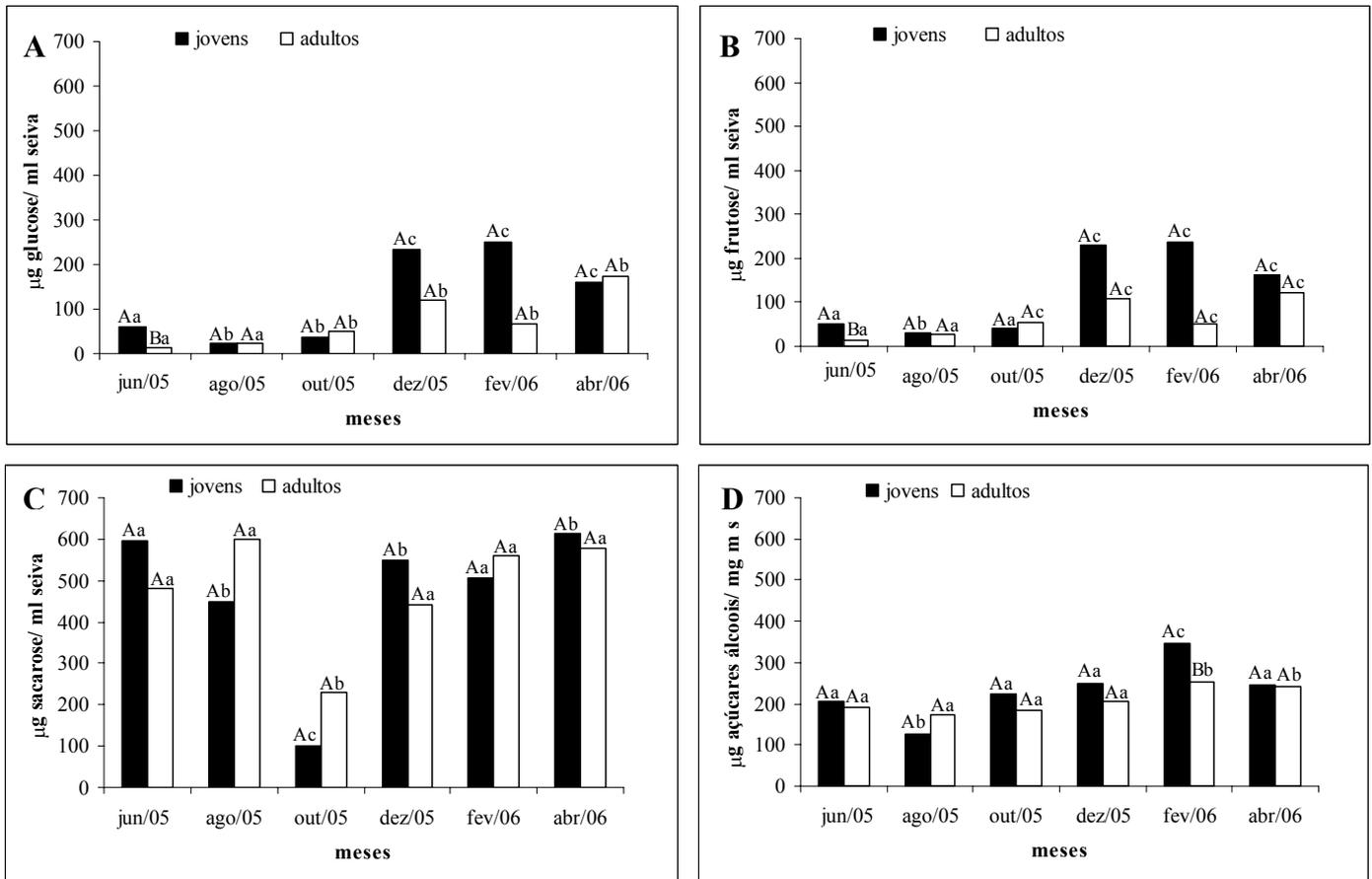


Figura 27. Análise de carboidratos presentes na seiva do xilema de indivíduos jovens e adultos de *H. courbaril* ao longo do período de coleta (junho/2005 a abril/2006). A – glucose, B – frutose, C – sacarose e D - açúcares álcoois. Letras diferentes indicam diferença significativa em ANOVA e Teste T, $P < 0,05$; letras maiúsculas indicam análise entre os indivíduos jovens e adultos e letras minúsculas indicam diferença entre os meses de coleta.

A razão sacarose/monossacarídeos na seiva do xilema (Tabela 4) mostra que na estação de crescimento (outubro), há uma grande alteração na razão, reforçando a idéia de que neste período a planta passa por profundas alterações no metabolismo de carboidratos.

Tabela 4. Razão sacarose/monossacarídeos na seiva do xilema de indivíduos jovens e adultos de *H. courbaril*.

| mês | S/M | |
|--------|--------|---------|
| | Jovens | Adultos |
| jun/05 | 5,40 | 16,83 |
| ago/05 | 8,26 | 11,66 |
| out/05 | 1,29 | 2,24 |
| dez/05 | 1,19 | 1,94 |
| fev/06 | 1,04 | 4,71 |
| abr/06 | 1,90 | 1,97 |

DISCUSSÃO

Em relação ao estabelecimento de plântulas de *H. courbaril*, Tiné *et al.* (2000) demonstraram que a mobilização do polissacarídeo de reserva de parede celular xiloglucano encontrado nos cotilédones ocorre após a germinação e sua degradação é concomitante com o desenvolvimento da plântula. Santos & Buckeridge (2004) demonstraram que a reserva de xiloglucano torna-se importante somente a partir do início do desenvolvimento dos eófilos, direcionando os produtos de sua degradação para a parte aérea, até o término da expansão dos folíolos do primeiro metáfilo. Santos & Buckeridge (2004) e também Martins (2004 – dados não publicados) realizaram experimentos com plântulas de jatobá retirando total e/ou parcialmente os cotilédones, a fim de descrever a importância da reserva cotiledonar para o estabelecimento da espécie. Nestes trabalhos, plântulas sem cotilédones apresentaram crescimento reduzido em altura e área foliar, indicando que a mobilização do xiloglucano está altamente relacionada com o crescimento e desenvolvimento da parte aérea. Os cotilédones favorecem maior sucesso na competição durante o estabelecimento da plântula, devido ao maior tamanho e maior capacidade de enfrentar situações adversas por possuir reservas.

Os resultados de massa seca (Figura 4) e razão raiz: parte aérea (Figura 5) confirmaram as observações de Santos & Buckeridge (2004), que ao utilizarem injeção de sacarose radioativa nos cotilédones durante a mobilização do xiloglucano, demonstraram a forte tendência de alocação para a parte aérea. Entretanto, Paz (2003) realizou um estudo em diferentes sítios florestais neotropicais com diversas espécies de plântulas jovens, indicando que espécies que possuem cotilédones de reserva tendem a alocar mais nas raízes do que as espécies que apresentam cotilédones fotossintetizantes. Porém seus resultados foram obtidos a partir de plântulas que possuíam folhas já formadas e não dependiam apenas dos recursos dos cotilédones.

Durante o período de crescimento inicial das plântulas é extremamente importante o desenvolvimento das folhas para o estabelecimento da fotossíntese até atingir a fase autotrófica, marcando a transição fonte-dreno (Buckeridge *et al.*, 2004; Rose & Poorter, 2003). Aidar *et al.* (2002) e Santos & Buckeridge (2004) ao realizarem estudos com a mesma espécie encontraram valores semelhantes para a razão raiz: parte aérea, sendo esperada a redução da razão no período de mobilização das reservas cotiledonares, como acontece por volta dos 35 dias de experimento.

Na análise de carboidratos nos cotilédones (Figura 6) verificou-se um aumento gradativo nos teores de monossacarídeos (glucose e frutose) enquanto os teores de sacarose estavam presentes em quantidades variáveis (entre 5 e 12 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de massa seca cotiledonar) e aos 22 dias ocorreu um pico máximo de sacarose, em virtude do início da mobilização do polissacarídeo de reserva (xiloglucano). Acredita-se que nesta espécie ocorra um mecanismo simplástico de carregamento do floema para o transporte de carboidratos para o eixo embrionário durante a degradação do xiloglucano, devido à ausência de outros oligossacarídeos nos cotilédones além da sacarose, sendo esta a molécula transportada (Tiné, 1997). A alta taxa de mobilização propicia o acúmulo de amido transitório (Figura 7) dos 22 aos 35 dias, que pode estar funcionando como um “tampão” de carboidratos, evitando aumento excessivo da concentração citoplasmática de monossacarídeos (Tiné, 1997; Santos *et al.*, 2004).

Nas raízes (Figura 8), os maiores teores de carboidratos solúveis encontrados dos 22 aos 35 dias e altos níveis de amido sugerem um armazenamento de açúcares para manutenção do desenvolvimento e metabolismo radicular, sendo estes órgãos totalmente dependentes de fontes de carbono externas. Inicialmente, o amido é originado do transporte de monossacarídeos da reserva germinativa, e posteriormente originado a partir de sacarose oriunda da reserva pós-germinativa, o xiloglucano.

Comparativamente, o caule parece ser o órgão da plântula com maior especialização para armazenamento de amido transitório (Figura 11) e parece acumular esta função ao mesmo tempo em que transporta os produtos da degradação das reservas cotiledonares e posteriormente os fotoassimilados. O amido está envolvido em diversos processos na planta, como por exemplo manter um suprimento contínuo de C para os tecidos drenos durante o ciclo diurno (Geiger *et al.*, 2000).

As elevadas concentrações de monossacarídeos e sacarose nas folhas permitem inferir que até os 42 dias estes são órgãos drenos de carbono (Figura 12). Os tecidos drenos são dependentes de sacarose importada para conduzir o metabolismo e de esqueletos carbônicos para interconversões metabólicas e processos de biossíntese (Foyer & Paul, 2001). Após esse período, ocorreu uma diminuição nos teores de glucose, frutose e sacarose indicando que as folhas passaram a ser um órgão fonte de carbono, que tende a exportar sacarose produzida a partir da fotossíntese, não acumulando carboidratos na forma de amido. Quando a quantidade de carbono acumulada pela fotossíntese é superior à requerida para a respiração e crescimento, um balanço positivo de carbono é alcançado pela folha (Roberts *et al.*, 1997). A transição fonte-dreno em folhas exige a aquisição de maquinaria fotossintética funcional, alterações nas enzimas do metabolismo de carboidratos e mudanças associadas ao comportamento de importação e exportação (Paul & Foyer, 2001). Isto representa um enorme investimento de recursos, compensado quando os fotoassimilados passam a ser transportados para outras partes da plântula (drenos), suprimindo a demanda de carbono (Paul & Foyer, 2001).

O transporte de nitrogênio na seiva do xilema nesta espécie é realizado pelo aminoácido ácido aspártico e a amida asparagina (Figura 13 A). Em leguminosas, a asparagina é o principal produto de assimilação de nitrogênio e o mais importante aminoácido exportado da raiz para a parte aérea via xilema (Atkins *et al.*, 1975). A asparagina é o composto que possui razão C/N elevada (= 2), altamente solúvel e com grande estabilidade e mobilidade nos fluídos fisiológicos, podendo ser considerada uma molécula orgânica ideal

para o transporte e acúmulo de nitrogênio. Uma vez que a asparagina alcança o tecido dreno de nitrogênio, esta pode ser estocada (por um curto ou longo período), convertida em outros aminoácidos pelas reações de transaminação ou quebrada em aspartato podendo originar amônia.

O xilema transporta uma maior quantidade de arginina enquanto há mobilização de reservas cotiledonares (Figura 13 B) e após o período de mobilização ocorre uma mudança na composição da seiva com o predomínio de asparagina, aminoácido típico de transporte em diversas plantas, inclusive leguminosas, como apontado acima. Schmidt & Stewart (1998) sugerem que a significância de arginina como constituinte da seiva do xilema compreende nitrogênio transportado e remobilizado dos sítios de estocagem na planta. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que a arginina é um indicador da mobilização das proteínas dos cotilédones. Além disso, a arginina possui uma baixa razão C/N (=1,5), sendo um composto eficiente para o transporte de compostos nitrogenados (Schmidt & Stewart, 1998).

As concentrações mais altas de carboidratos solúveis na seiva do xilema (Figura 14) ocorreram durante o período em que as plântulas ainda apresentavam dependência da mobilização das reservas. Estudos abordando a abundância de carboidratos na seiva do xilema demonstraram que o xilema pode ter o potencial para fornecer altas concentrações de carboidratos solúveis durante períodos de limitação da fotossíntese (Heizmann *et al.*, 2001). Os resultados encontrados são consistentes com a presença de grandes quantidades de carbono móvel (sacarose) nesse tecido vascular e corroboram as observações apresentadas acima para os carboidratos.

A partir da espectrometria de massas foi possível confirmar a mobilização de reservas de carbono (provavelmente xiloglucano) nos cotilédones (Figura 15 B) conforme previamente descrito por Tiné *et al.* (2000), Santos & Buckeridge (2004) e Santos *et al.* (2004). Houve um decréscimo contínuo da quantidade de carbono dos cotilédones ao longo do experimento,

atingindo valores oito vezes menores do que o suprimento inicial de carbono originado das plantas mãe, indicando a mobilização do xiloglucano. Neste trabalho é feita, pela primeira vez, a observação da mobilização das reservas de N dos cotilédones (Figura 15 C) para as as folhas de jatobá (Figura 16 B). Foi observado um incremento contínuo de nitrogênio nas folhas, atingindo um máximo de 0,46 g aos 64 dias de experimento.

O fracionamento isotópico de ^{15}N (Figura 17) indicou uma queda nos valores foliares a partir dos 42 dias, sugerindo que outra fonte de nitrogênio passa a ter importância maior do que a fonte oferecida pela mobilização das reservas do cotilédone ($\delta^{15}\text{N} = 6$). Coincidentemente, a concentração de N foliar (Figura 16 B) não aumenta no período que compreende o fim da mobilização das reservas (entre 42-50 dias). Em seguida, há uma elevação no conteúdo total de N foliar, com estabilização da concentração como resultado do crescimento da área foliar total, que é suportado através de aquisição de novo nitrogênio do solo na forma de amônio, não mais dependendo da fonte de reserva estocada no cotilédone.

Em indivíduos jovens e adultos, a análise do conteúdo de carboidratos solúveis nas folhas (Figura 19) revelou maiores teores de monossacarídeos no período de agosto a outubro/05. Maiores teores de sacarose também foram encontrados nos meses de junho e ago/05, que pode estar associado ao mecanismo de remobilização de nutrientes, visto que neste mês as folhas estavam senescentes e a sacarose é a principal forma de exportação de carboidratos em plantas. A senescência representa o estágio final de desenvolvimento foliar e é caracterizada pela transição de nutrientes assimilados para nutrientes remobilizados (Feller & Fisher, 1994; Masclaux *et al.*, 2000; Hortensteiner & Feller, 2002).

Uma resposta à variações temporais na disponibilidade de recursos é a aquisição de nutrientes quando estes estão disponíveis em grandes quantidades e posteriormente armazenamento até os mesmos serem necessários. Espécies tropicais decíduas acumulam carbono quando a copa está completa e os direcionam das reservas de carboidratos para suprir

custos respiratórios e para a manutenção de novas folhas (Newell & Mulkey, 2002). A queda dos valores em outubro deve-se provavelmente à utilização destes compostos para a reconstrução da copa e expansão das folhas durante a estação de crescimento. As folhas expandem para captar luz e CO₂ para a fotossíntese como consequência do estabelecimento da evapotranspiração, que controla a temperatura foliar e a assimilação e transporte de nutrientes (Foyer & Paul, 2001).

A posterior redução do teor de sacarose (outubro) pode estar associada à inversão da relação das folhas com os ramos, pois quando a área foliar volta a crescer, os ramos passam a ser fontes de carbono através da mobilização das reservas armazenadas durante o período de crescimento e senescência foliar (Wingler *et al.*, 2006).

A dinâmica dos valores ao longo dos meses sugere um processo cíclico que atinge valores máximos durante o período de senescência, decrescendo em seguida até atingir os valores mínimos durante o verão, no período de crescimento máximo. Nos meses seguintes inicia-se um aumento gradual até atingir os valores máximos, fechando o ciclo.

As plantas são constituídas de órgãos autotróficos (fontes), que produzem açúcares e aminoácidos a partir da fotossíntese e assimilação de nitrogênio (inorgânico e/ou orgânico), e órgãos heterotróficos (drenos) que consomem estes produtos para crescimento, reserva e reprodução. Embora alguns órgãos sejam tipicamente drenos (flores e frutos, por exemplo), enquanto outros são tipicamente fontes (folhas maduras), vários órgãos passam por uma transição ao longo do seu ciclo de vida (Foyer & Paul, 2001).

Teores elevados de amido nas folhas de indivíduos jovens nos meses de outubro e dezembro/05 (Figura 20) coincidem com o decréscimo dos níveis de carboidratos solúveis (principalmente a sacarose) na estação de crescimento. Em dezembro a assimilação fotossintética (Figura 18) aumenta significativamente, o que também pode contribuir para o acúmulo de amido transitório já que em algumas plantas cerca de 50% do carbono assimilado pode ser estocado como amido e remobilizado posteriormente (Zeeman *et al.*, 2004).

A assinatura isotópica de ^{15}N das folhas (Figura 21 B) modifica-se conforme a origem do nitrogênio utilizado no metabolismo foliar (N assimilado ou N remobilizado), marcando a influência da sazonalidade e podendo indicar também a transição fonte-dreno no período que compreende a reconstrução da copa após a senescência e a maturação das novas folhas.

Também é evidenciada uma diferenciação no metabolismo de assimilação de C a partir da razão isotópica de carbono (Figura 21 C), sendo que durante o período de expansão foliar os valores se tornam menos negativos, sugerindo que as folhas estão de estômatos mais fechados, com menor taxa de trocas gasosas e realizando menos fotossíntese (Figuras 18).

Nos caules, a diferença no conteúdo de sacarose entre córtex e floema (Figura 23) pode estar relacionada ao fato do floema ser um tecido especializado na condução de carboidratos e a sacarose ser o componente principal deste tecido, compreendendo cerca de 90% dos sólidos do floema (Marschner, 1997).

Os teores de açúcares álcoois foi semelhante em folhas e caules (Figuras 19 D e 23 D), em torno de 4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ massa seca de tecido. A maioria destes compostos possui função fisiológica similar à sacarose e um fato importante é a capacidade de síntese e degradação destes compostos ser compartimentada em diferentes tecidos, ocasionando conseqüências diretas na capacidade de acumulação. Além disso, alguns açúcares álcoois apesar de não se comportarem como carboidratos típicos de reserva podem exibir variações sazonais significativas (Moing, 2000). Teo *et al.* (2006) realizaram um trabalho com macieiras silenciando a síntese de sorbitol na folha através de plantas transgênicas e verificaram alterações na partição de carbono a longa distância (aumento de sacarose) e na composição da distribuição de carbono no fruto, indicando a importância do sorbitol no metabolismo de frutos de maçã.

As variações encontradas na composição da seiva do xilema demonstram a influência da sazonalidade no transporte de compostos nitrogenados (Figuras 25 e 26) e de carboidratos (Figura 27). No período de seca (junho e agosto/05) a contribuição da arginina é

consideravelmente mais significativa do que no período de chuva (dezembro/05 e fevereiro/06). Segundo Millard *et al.* (2006), as variações podem ocorrer devido a dois fatores: remobilização de N e diluição da seiva como resultado do aumento das taxas respiratórias enquanto as folhas crescem.

Schmidt & Stewart (1998) sugerem que a presença de arginina como importante constituinte da seiva do xilema compreende preferencialmente nitrogênio remobilizado dos sítios de proteínas de reserva vegetativa estocados na planta. Apesar das plantas sintetizarem *de novo* todos os aminoácidos, uma porção substancial de novas proteínas são derivadas de aminoácidos reciclados (Vierstra, 1996).

Durante o início da estação de crescimento (outubro a dezembro), os níveis de arginina decaem devido à remobilização interna e uso de N em tecidos em crescimento ativo. A partir do outono (abril), a planta voltou a estocar este aminoácido como estratégia para garantir o suprimento de N para a próxima estação de crescimento, fechando o ciclo. A habilidade das plantas para estocar e redistribuir nitrogênio é essencial para a economia deste nutriente, considerado um fator limitante para o crescimento e desenvolvimento vegetal (Cooke & Weich, 2005; Cantón *et al.*, 2005). Milla *et al.* (2005) realizaram um estudo com espécies sempre-verdes do Mediterrâneo e verificaram que a remobilização de nutrientes não possui relação direta com a necessidade de órgãos reprodutivos, sendo mais dependente da cronologia das folhas devido ao fato da senescência foliar ser o principal mecanismo de redistribuição de N nos ramos.

As plantas utilizam um número limitado de compostos para transporte e reserva de N. Em leguminosas, a forma predominante é a asparagina, componente encarregado do transporte, e a arginina, aminoácido mais frequentemente encontrado após a mobilização de proteínas de reserva (Mifflin & Lea, 1977). A asparagina parece ter papel importante no transporte a curtas distâncias, enquanto a arginina atua mais no transporte a longas distâncias e como composto que estoca N após a estação do inverno, tanto na forma de aminoácido livre

como cadeias polipeptídicas (Tromp & Ova, 1973). Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que a arginina é um indicador da remobilização de reservas de N não apenas em plântulas, mas também em indivíduos jovens e adultos de jatobá.

Aidar *et al.* (2003) verificaram que espécies tardias na sucessão ecológica transportam nitrogênio na forma de arginina durante o inverno, indicando mobilização de reserva de N, corroborando os resultados obtidos por Schmidt & Stuart (1998). O conteúdo de nitrogênio transportado nesse aminoácido chega a contribuir com até 67% do total de nitrogênio transportado na seiva do xilema.

A significância de possuir reservas de N se dá na conservação interna deste elemento e sua reutilização para um novo período de crescimento. (Bausenwein *et al.*, 2001). Os três principais tipos de compostos nitrogenados que podem ser armazenados em plantas são nitratos, aminoácidos livres/amidas e proteínas (Millard, 1988). Ao estocar nitrogênio, um ou dois tipos de aminoácidos/amidas com alta razão N:C normalmente predominam, sendo os mais comuns asparagina, glutamina e arginina (Sagisaka, 1987; Nordin & Nasholm, 1997; Bausenwein *et al.*, 2001).

A razão sacarose/monossacarídeos na seiva do xilema (Tabela 4) reforça a idéia de que durante a estação de crescimento a planta passa por profundas alterações no metabolismo de carboidratos, sendo nessa fase um dreno de carbono, e durante o outono e inverno um órgão fonte, exportando mais sacarose provavelmente para estocagem como reserva no caule.

Durante o ciclo de vida de uma planta, o desenvolvimento pode ser reconhecido principalmente como uma alteração no número de órgãos da planta ao invés do tamanho. O processo de desenvolvimento de uma planta ocorre via mudanças no número de folhas, flores e ramos. Assim, o crescimento da planta não é somente uma progressão do aumento da biomassa, mas também um processo que envolve mudanças no número de partes da planta (Porter, 1983).

A arquitetura da planta é resultado das atividades dos meristemas apicais, aéreos e subterrâneos (Hallé, 1971). Na maioria das árvores dicotiledôneas, principalmente as espécies de dossel, a arquitetura fundamental da planta é repetida e como resultado deste processo a árvore pode ser considerada uma “colônia”. A maioria das árvores das florestas tropicais são colônias e seus elementos individuais não são os ramos, mas as unidades arquitetônicas (Hallé, 1995). O processo de repetição ocorre ao longo do desenvolvimento da planta (Hallé, 1996; López *et al.*, 2001).

Muitas plantas superiores são compostas por unidades estruturais e funcionais repetitivas (módulos) produzidas durante a ontogenia (White, 1979; Preston & Ackerly, 2004), ou seja, as plantas adultas podem ser consideradas ampliações, em número de módulos, das plantas jovens (Hallé, 1986; López *et al.*, 2001). O tipo de módulo produzido (vegetativo ou reprodutivo) afeta tanto a performance biológica como o potencial de crescimento futuro da planta. (Geber, 1990; Watson *et al.*, 1997; Huber *et al.*, 1999; López *et al.*, 2001). Os módulos apresentam propriedades demográficas pois cada um deles nasce, amadurece, senesce e morre. O ciclo e a história de vida do módulo pode ser totalmente independente do desenvolvimento da planta como um todo, e ocorrem normalmente em escala de tempo menores que a progressão ontogenética da planta.

Como reflexo da “modularidade”, existe uma estratégia diferenciada de investimento durante o crescimento, dependendo da idade das plantas individuais: predomínio de crescimento vegetativo em plantas jovens e floração em plantas adultas (López *et al.*, 2001). Lovett Doust (1989) coloca que a transição da estratégia vegetativa para reprodutiva é uma consequência do tamanho da planta: a reprodução precoce reduz a sobrevivência e a fertilidade da planta, causando seleção a favor do crescimento vegetativo em plantas jovens e alto esforço reprodutivo em plantas adultas.

A maioria das pesquisas sobre a plasticidade das plantas até o presente ignora o fato de que são os módulos, e não o indivíduo, que respondem aos sinais ambientais, podendo ser

esta resposta autônoma ou integrada. Kroon *et al.* (2005) sugerem que o crescimento, desenvolvimento e as alterações induzidas pelo ambiente acontecem a nível modular.

Muitos são os estudos que buscam uma melhor compreensão sobre os modelos de arquitetura em plantas. Este trabalho contribui nesta direção, pois demonstra que os metabolismos de carbono e nitrogênio são similares em plântulas e indivíduos adultos de *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*, indicando que o conceito de crescimento modular pode ser aplicado nesta espécie ao longo do seu ciclo de vida, ao menos em relação aos processos e padrões dos metabolismos aqui estudados.

CONCLUSÕES

Os resultados apresentados confirmam que o fluxo principal de carbono em plântulas de *H. courbaril* var. *stilbocarpa* durante o desenvolvimento é entre os cotilédones e a parte aérea.

O transporte de nitrogênio oriundo da degradação dos corpos protéicos em plântulas de jatobá é realizado principalmente pelo aminoácido arginina, podendo ser utilizado como um indicador de mobilização da reserva de nitrogênio dos cotilédones. O transporte de nitrogênio na seiva é realizado principalmente pelo ácido aspártico e asparagina.

Em indivíduos jovens e adultos de *Hymenaea courbaril* ocorreu uma mudança drástica no comportamento de diversos parâmetros analisados (assimilação fotossintética, conteúdo de carboidratos totais e análise qualitativa de carboidratos de folhas e tecidos caulinares) no mês de outubro/05, época em que folhas jovens estão se expandindo após a senescência no inverno.

A sacarose é o principal composto utilizado para o transporte de carbono e a razão S/M pode ser utilizada como um indicador da transição fonte/dreno em tecidos da espécie.

O córtex dos ramos foi caracterizado como o tecido de estocagem da reserva sazonal de carboidratos, sendo o amido o principal composto de reserva.

Açúcares álcoois apresentaram um comportamento relativamente constante ao longo do ano em plantas jovens e adultas, configurando compostos que apresentam razoável contribuição para o transporte de carbono na planta.

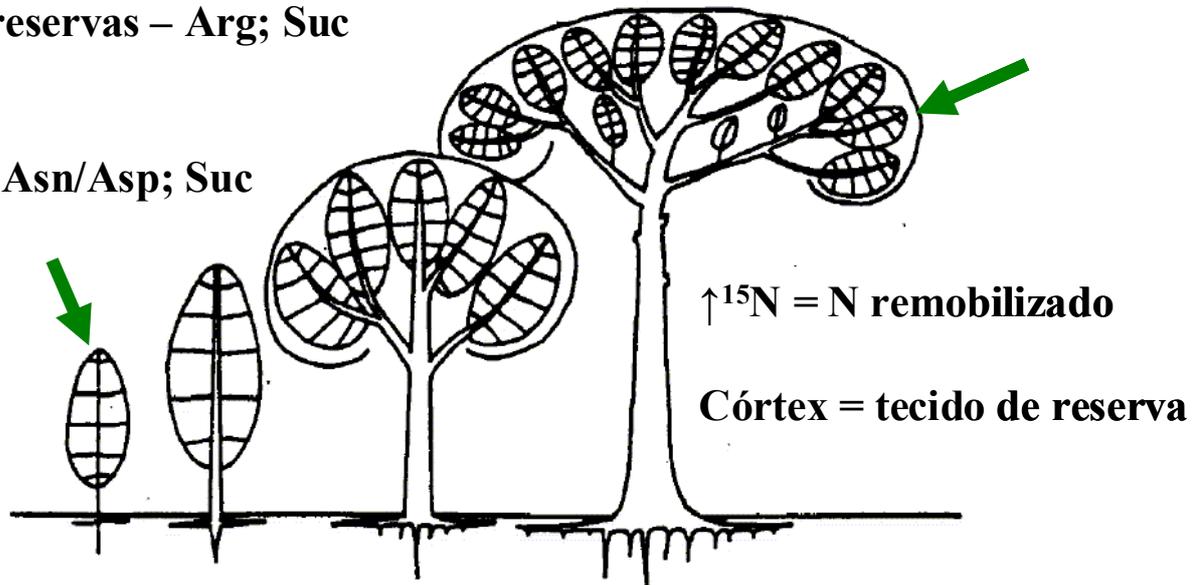
O aminoácido arginina é um indicador de mobilização de reservas sazonais em indivíduos jovens e adultos.

Os resultados obtidos indicam que do ponto de vista do uso de reservas de carbono e nitrogênio, plântulas e ramos na copa de indivíduos jovens e adultos de *Hymenaea courbaril*

var. *stilbocarpa* são muito semelhantes, sugerindo que a unidade modular que estrutura o crescimento do indivíduo é funcional e estruturalmente muito similar a uma plântula.

Mobilização reservas – Arg; Suc

Transporte – Asn/Asp; Suc



Metabolismo estabelecimento plântulas = Metabolismo sazonal nos ramos

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aidar, M.P.M., Martinez, C.A.; Costa, P.M.F.; Dietrich, S.M.C. & Buckeridge, M. S.

2002. Effect of atmospheric CO₂ enrichment on the establishment of seedlings of jatobá, *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae, Cesalpinoideae). *Biota Neotropica* 2 (n1): www.biotaneotropica.org.br.

Aidar, M.P.M.; Schmidt, S.; Moss, G.; Stewart, G. & Joly, C. A. 2003. Nitrogen use

strategies of neotropical rainforest trees in threatened Atlantic Forest. *Plant, Cell and Environment* 26: 389-399.

Amaral, L.I.V.; Costa, P.M.; Aidar, M.P.M.; Gaspar, M. & Buckeridge, M.S. 2006.

Método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em diferentes materiais vegetais. *Hoenea*, In Press.

Atkins, C.A.; Pate, J. S. & Sharkey, P. J. 1975. Asparagine metabolism – Key to the

nitrogen nutrition of developing legume seeds. *Plant Physiology* 56: 807-812.

Avice, J.C.; Le Dily, F.; Goulas, E.; Noquet, C.; Meuriot, F.; Volenec, J.J.; Cunningham,

S.M.; Sors, T.G.; Dhont, C.; Castonguay, Y.; Nadeau, P.; Bélanger, G.; Chalifour,

F.P. & Ourry, A. 2003. Vegetative storage proteins in overwintering storage organs of forage legumes: roles and regulation. *Canadian Journal of Botany* 81: 1198-1212.

Baier, M.; Hemmann, G.; Holman, R.; Corke, F.; Card, R.; Smith, C.; Rook, F.&

Bevan, M. W. 2004. Characterization of mutants in *Arabidopsis* showing increased sugar-

specific gene expression, growth, and developmental responses. *Plant Physiology* 134: 81-91.

Batley, N. 2000. Aspects of sasonality. *Journal of Experimental Botany* 51: 1769-1780.

Bausenwein, U.; Millard, P.; Thornton, B. & Raven, J.A. 2001. Seasonal nitrogen storage and remobilization in the forb *Rumex acetosa*. *Functional Ecology* 15: 370-377.

Bloom, A. J., Chapin, F. S. & Mooney, H. A. 1985. Resource limitation in plants - An economic analogy. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16: 363-392.

Buckeridge, M.S.; Aidar, M.P.M.; Santos, H.P. & Tiné, M.A. 2004. Acúmulo de Reservas. In: *Germinação - do básico ao aplicado*. Alfredo Gui Ferreira & Fabian Borgheti (Eds.). Artmed, Porto Alegre pp.31-50.

Buckeridge, M.S.; Aidar, M.P.M.; Santos, H.P.; Tiné, M. A. S. 2004. Mobilização de reservas. In : Ferreira, A.G. & Borghetti F. *Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed, pp. 163-185.

Cantón, F.R.; Suárez, M.F. & Cánovas, F. M. 2005. Molecular aspects of nitrogen mobilization and recycling in trees. *Photosynthesis Research* 83: 265-278.

Chapin,F.S. I; Schulze, E.D. & Mooney, H.A. 1990. The ecology and economics of storage in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21: 423-447.

- Chapin, F.S.; Autumm, K. & Pugnaire, F.**1993. Evolution of suites of traits in response to environment stress. *American Naturalist* 142 (supplement): 78-92.
- Cherbuy, B., Joffre, R., Gillon, D. & Rambal, S.** 2001. Internal remobilization of carbohydrates, lipids, nitrogen and phosphorus in the Mediterranean evergreen oak *Quercus ilex*. *Tree Physiology* 21: 9-17.
- Cooke, J.E.K. & Weich, M.** 2005. Nitrogen storage and seasonal nitrogen cycling in *Populus*: bridging molecular physiology and ecophysiology. *New Phytologist* 167: 19-30.
- Crawford, N.M. & Glass, A.D.M.** 1998. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends Plant Science* 3:389-395.
- Cruz, J. A.; Avenson, T. J., Kanazawa, A.; Takizawa ,K.; Edwards, G. E. & Kramer, D. M.** 2004. Plasticity in light reactions of photosynthesis for energy production and photoprotection. *Journal of Experimental Botany* 56: 395-406.
- Dubois, M.; Gilles, A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A. & Smith, F.** 1956. Colorimetric method of determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-355.
- Epstein, E.** 1972. *Mineral nutrition of plants: Principles and perspectives*. John Wiley & Sons, New York, 412p.
- Feller, U. & Fisher, A.** 1994. Nitrogen metabolism in senescing leaves. *Critical Reviews in Plant Science* 13: 241-273.

- Ferrario-Méry, S.; Besinb, E.; Pichonc, O.; Meyera ,C. & Hodgesb, M.** 2006. The regulatory PII protein controls arginine biosynthesis in Arabidopsis. *FEBS Letters* 580: 2015-2020.
- Fischer, W.N.; André, B.; Rentsch, D.; Krolkiewicz, S.; Tegeder, M.; Breitzkreuz, K. & Frommer, W. B.** 1998. Amino acid transport in plants. *Trends in Plant Science* 3: 188-195.
- Foyer, C.H. & Paul, M.J.** 2001. Source-sink relationships. *Encyclopedia Of Life Sciences*: www.els.net.
- Frak, E., Millard, P., Le Roux, X., Guillaumie, S. & Wendler, R.** 2002. Coupling sap flow velocity and amino acid concentrations as an alternative method to ¹⁵N labeling for quantifying nitrogen remobilization by walnut trees. *Plant Physiology* 130: 1043–1053.
- Geber M.A.** 1990. The cost of meristem limitation in *Polygonum arenastrum*: negative genetic correlations between fecundity and growth. *Evolution* 44: 799–819.
- Geiger, D. R. & Servaites, J. C.** 1994. Diurnal regulation of photosynthetic carbon metabolism in C₃ plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 235-256.
- Geiger, D.R.; Servaites, J.C. & Fuchs, M.A.** 2000. Role of starch in carbon translocation and partitioning at the plant level. *Australian Journal of Plant Physiology* 27: 571-582.

- Haddad, C.R.B., Lemos, D.P. & Mazzafera, P.** 2004. Leaf life span and nitrogen in semideciduous forest tree species (*Croton priscus* and *Hymenaea courbaril*) Scientia Agrícola, Piracicaba-SP, 61: 462-465.
- Hallé, F.** 1971. Architecture and growth of tropical trees exemplified by the Euphorbiaceae. Biotropica 3: 56-62.
- Hallé F.** 1986. Modular growth in seed plants. Philosophical Transaction of the Royal Society of London B 313: 77-87.
- Hallé, F.** 1995. Canopy architecture in tropical trees: a pictorial approach. In: Lowman, M.D. & Nadkarni, N. M. (eds). Forest canopies. Academic Press: San Diego, pp. 27-44.
- Heizmann, U.; Kreuzwieser, J.; Schnitzler, J.P.; Brueggemann, N. & Rennenberg, H.** 2001. Assimilate transport in the xylem sap of pedunculate oak (*Quercus robur*) saplings. Plant Biology 3: 132-138.
- Hortensteiner, S. & Feller, U.** 2002. Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. Journal of Experimental Botany 53: 927-937.
- Huber, H.; Lukács, S. & Watson, M.A.** 1999. Spatial structure of stoloniferous herbs: an interplay between structural blue-print, ontogeny and phenotypic plasticity. Plant Ecology 141: 107-115.

- Jarret, H.W.; Cooksy, K.D.; Ellis, B.; Anderson, J.M.** 1986. The separation of o-phthaldehyde derivatives of amino acids by reversed-phase chromatography on octylsilica columns. *Analytical Biochemistry* 153: 189-198.
- Kraus, J. E. & Arduin, M.** 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Edur (Editora Univ. Rural) Seropédica, Rio de Janeiro.
- Kroon, H.; Huber, H.; Stuefer, J.F. & van Groenendael, J. M.** 2005. A modular concept of phenotypic plasticity in plants. *New Phytologist* 166: 73-82.
- Lam, H.M.; Chiao, Y.A.; Li, M.W.; Yung, Y.K. & Ji, S.** 2006. Putative nitrogen sensing systems in higher plants. *Journal of Integrative Plant Biology* 48: 873-888.
- Lee, Y.T. & Langenheim, J.H.** 1975. Systematics of the genus *Hymenaea* (Leguminosae: Caesalpinioideae, Detarieae) University of California. Publication in Botany 69, 190 p.
- Li, B., Servaites, J. C. & Geiger, D. R.** 1992 a. Characterization and subcellular localization of debranching enzyme and endoamylase from leaves of sugar beet. *Plant Physiology* 98: 1277-1284.
- Lloyd, J. C. & Zakhleniuk, O. V.** 2004. Responses of primary and second metabolism to sugar accumulation revealed by microarray expression analysis of the *Arabidopsis* mutant *pho3*. *Journal of Experimental Botany* 55: 1221-1230.

- López, F.; Fungairiño, S.; de las Heras, P.; Serrano, J. & Acosta, F.** 2001. Age changes in the vegetative vs. reproductive allocation by module demographic strategies in a perennial plant. *Plant Ecology* 157: 13-21.
- Lovett Doust, J.** 1989. Plant reproductive strategies and resources allocation. *Trends in Ecology and Evolution* 4: 230–234.
- Marschner, H.** 1997. Mineral nutrition of higher plants. Londres: Academic Press, 649p.
- Martin, C. & Smith, A. M.** 1995. Starch biosynthesis. *The Plant cell* 7: 971-985.
- Martins, M.C.M.** 2004. Antocianinas foliares como indicadores de mobilização cotiledonar durante o desenvolvimento de plântulas de *Hymenaea courbaril* L. Universidade Metodista de São Paulo, São Bernardo do Campo-SP.
- Masclaux, C.; Valadier, M.H.; Brugière, N. Morot-Gaudry, J.F. & Hirel, B.** 2000. Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta* 211: 510-518.
- Melis, A.** 1999. Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage in vivo? *Trends in Plant Science* 4 (4): 130-135.
- Micallef, B.J. & Shelp, B.J.** 1989. Arginine metabolism in developing soybean cotyledons I - Relationship to nitrogen nutrition. *Plant Physiology* 90: 624-630.

- Miflin, B.J. & Lea, P.J.** 1977. Amino acid metabolism. Annual Review of Plant Physiology 28: 299-329.
- Milla, R.; Castro-Díez, P.; Maestro-Martínez, M. & Montserrat-Martí, G.** 2005. Relationships between phenology and the remobilization of nitrogen, phosphorous and potassium in branches of eight Mediterranean evergreens. New Phytologist 168: 167-178.
- Millard, P.** 1988. The accumulation and storage of nitrogen by herbaceous plants. Plant, Cell and Environment 11: 1-8.
- Millard, P.; Wendler, R.; Grassi, G.; Grelet, G-A. & Tagliavini, M.** 2006. Translocation of nitrogen in the xylem of field-grown cherry and poplar trees during remobilization. Tree Physiology 26: 527-536.
- Moing, A.** 2000. Sugar alcohols as carbohydrate reserves in some higher plants. In: Gupta, A.K. & Kaur, N. Carbohydrate reserves in plants – synthesis and regulation, Publishers Elsevier Science: The Netherlands, 2000, pp. 337-358.
- Moreno, J. & Garcia-Martinez, J.L.** 1983. Seasonal variation of nitrogenous compounds in the xylem sap of *Citrus*. Physiologia Plantarum 59: 669-675.
- Newell, E.A. & Mulkey, S.S.** 2002. Seasonal patterns of carbohydrate storage in four tropical tree species. Oecologia 131 : 333-342.
- Nordin, A. & Nasholm, T.** 1997. Nitrogen storage forms in nine boreal understory plant species. Oecologia 110: 487-492.

- Oaks, A.** 1994. Primary nitrogen assimilation in higher plants and its regulation. *Canadian Journal of Botany* 72: 739-746.
- Pate, J. S.** 1980. Transport and partitioning of nitrogenous solutes. *Annual Review of Plant Physiology* 33: 313-340.
- Paul, M.J. & Foyer, C. H.** 2001. Sink regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 52: 1383-1400.
- Paul, M.J. & Pellny, T.K.** 2003 Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *Journal of Experimental Botany* 54: 539-547.
- Paz, H.** 2003. Root/Shoot allocation and root architecture in seedlings: variation among forest sites, microhabitats and ecological groups. *Biotropica* 35: 318-332.
- Pimentel, C.** 1998. *Metabolismo de carbono na agricultura tropical*. Seropédica: Edur, 159 p.
- Porter, J. R.** 1983. A modular approach to analysis of plant growth. *New Phytologist* 94: 183-190.
- Preston, K.A. & Ackerly, D.D.** 2004. Allometry and evolution in modular organisms. In: Pigliucci, M. & Preston, K.A. (eds.). *Modularity and Phenotypic Complexity*. Oxford, UK: Oxford University Press, pp.80–106.

- Richter, H. G.** 1981. Anatomie des sekundären Xylems und der Rinde der Lauraceae. Sonderbande des Naturwiss. Vereins Hamburg 5. Verlag Paul Parey: Hamburg & Berlin, 148p.
- Roberts, G.; Cruz, S. S.; Roberts, I. M.; Prior D.A.M.; Turgeon, R.; & Oparka, K.J.** 1997. Phloem unloading in sink leaves of *Nicotiana benthamiana*: comparison of a fluorescent solute with a fluorescent virus. *Plant Cell* 9: 1381-1396.
- Rolland, F.; Moore, B. & Sheen, J.** 2002. Sugar Sensing and Signaling in Plants. *The Plant Cell*, S185–S205, Supplement.
- Rose, S. & Poorter, L.** 2003. The importance of seed mass for early regeneration in tropical forest: a review. In: H. ter Steege (ed.). Long term changes in tropical tree diversity: studies from the Guiana Shield, Africa, Borneo and Melanesia. Tropembos Series 22. Tropembos International, Wageningen, pp. 19-35.
- Sagisaka, S.** 1987. Amino-acid pools in herbaceous plants at the wintering stage and at the beginning of growth. *Plant and Cell Physiology* 28: 171-178.
- Sajo, M. G. & Castro, N. M.** 2003. Caule. In: Anatomia Vegetal, Apuzzato-da-Glória, B. & Carmello-Guerreiro, S. M. Universidade Federal de Viçosa, 438 p.
- Santos, H.P.** 2002. Importância ecofisiológica da reserva de xiloglucano e o controle de sua mobilização em cotilédones de *Hymenaea courbaril* L. Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.

- Santos, H.P. & Buckeridge, M.S.** 2004. The role of the storage carbon of cotyledons in the establishment of seedlings of *Hymenaea courbaril* under different light conditions. *Annals of Botany* 94: 819-830.
- Santos, H.P.; Purgatto, E.; Mercier, H. & Buckeridge, M.S.** 2004. The Control of Storage Xyloglucan Mobilisation in Cotyledons of *Hymenaea courbaril* L. *Plant Physiology* 135 : 287-299.
- Schmidt, S. & Stewart, G.R.** 1998. Transport, storage and mobilization of nitrogen by trees and shrubs in the wet/dry tropics of northern Australia. *Tree Physiology* 18 : 403-410.
- Sharkey, T. D.** 1985. Photosynthesis in intact leaves of C₃ plants: physics, physiology and rate limitations. *The Botanical Review* 51: 53-105.
- Shipley, B. & Meziane, D.** 2002. The balanced-growth hypothesis and the allometry of leaf and root biomass allocation. *Functional Ecology* 16 (3) : 326-331.
- Sodek, L.** 2004. Metabolismo do nitrogênio. In: Gilberto Barbante Kerbauy. *Fisiologia Vegetal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp. 94 – 113.
- Stanley, D.; Fitzgerald, A.M; Farnden, J. K.F.& McRae, E. A.** 2002. Characterization of putative amylases from apple (*Malus domestica*) and *Arabidopsis thaliana*. *Biologia* 57: 137-148.

- Stewart, G. R.; Schmidt, S.; Handley, L. L.; Turnbull, M. H.; Erskine, P. D.; Joly, C. A.** 1995. ^{15}N natural abundance of vascular rainforest epiphytes: implications for nitrogen source and acquisition. *Plant, Cell and Environment* 18 : 85-90.
- Stitt, M.; Muller, C.; Matt, P.; Gibon, Y.; Carillo, P.; Marcuende, R.; Scheible, W.R. & Krapp, A.** 2002. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *Journal of Experimental Botany* 53: 959-970.
- Taiz, L. & Zeiger, E.** 2004. *Fisiologia Vegetal*. Porto Alegre: Artmed, 3.ed., 719 p.
- Teo, G.; Suzuki, Y.; Uratsu, S. L.; Lampinen, B.; Ormonde, N.; Hu, W. K. ; DeJong, T.M. & Dandekar, A.M.** 2006. Silencing leaf sorbitol synthesis alters long-distance partitioning and apple fruit quality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 18842-18847.
- Tiné, M.A.S.** 1997. Mobilização de xiloglucano de reserva em sementes de *Hymenaea courbaril* L. Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
- Tiné, M.A.S.; Cortelazzo, A.L. & Buckeridge, M.S.** 2000. Xyloglucan mobilisation in cotyledons of developing plantlets of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Plant Science* 154 : 117-126.
- Tood, C.D.; Cooke, J.E.K.; Mulle, R.T. & Gifford, D. J.** 2001. Regulation of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) arginase in developing seedling tissue during germination and post-germinative growth. *Plant Molecular Biology* 45: 555-565.

- Tromp, P.J.& Ovaa, J.C.** 1973. Spring mobilization of protein nitrogen in apple bark. *Physiologia Plantarum* 29: 1-5.
- Vierstra, R.D.** 1996. Proteolysis in plants: mechanisms and functions. *Plant Molecular Biology* 32: 275-302.
- Vitousek, P.M. & Howarth, R.W.** 1991. Nitrogen limitation on land and sea: how can it occur? *Biogeochemistry* 13:87-115.
- Warren, C.R.** 2006. Potential organic and inorganic N uptake by six Eucalyptus species. *Functional Plant Biology* 33: 653-660.
- Watson, M.A.; Hay, M.J.M. & Newton, P.C.D.** 1997. Developmental phenology and the timing of determination of shoot bud fates: ways in which the developmental program modulates fitness in clonal plants. In: de Kroon, H. & van Groenendael, J.(eds), Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, pp. 31-53.
- White, J.** 1979. The plant as a metapopulation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 10: 109-145.
- Wingler, A.; Purdy, S.; MacLean, J.A. & Pourtau, N.** 2006. The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* 57: 391-399.
- Zeeman, S.C.; Smith, S.M.& Smith, A.M.** 2004. The breakdown of starch in leaves. *New Phytologist* (Tansley review) 1-15.