

MARCELO MORENA

**Ecofisiologia do uso de nitrogênio em espécies  
arbóreas da Floresta Ombrófila Mista, Parque  
Estadual de Campos do Jordão, SP**

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

2015

MARCELO MORENA

**Ecofisiologia do uso de nitrogênio em espécies  
arbóreas da Floresta Ombrófila Mista, Parque  
Estadual de Campos do Jordão, SP**

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Marcelo Morena

M843e Ecofisiologia do uso de nitrogênio em espécies arbóreas da floresta ombrófila mista, Parque Estadual de Campos de Jordão, SP / Marcelo Morena – São Paulo, 2015  
82 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2015  
Bibliografia.

1. Mata Atlântica . 2. Nitrogênio . 3. Sucessão. I. Título

CDU: 582.526.422.2

*O homem é mortal por seus temores e imortal por seus desejos*

**Pitágoras**

## **Agradecimentos**

Especialmente a toda minha família, por todo apoio, incentivo e determinação em me ajudar nas horas mais necessárias. Se não fosse todo o desempenho e carinho deles como família, não chegaria até aqui.

Especialmente a minha namorada, Alessandra M. Souza por acreditar em mim e estar presente nestes dois anos de trabalho sempre a meu lado com um ótimo humor, carinho e dizendo sempre as coisas corretas quando necessário.

Ao Dr. Marcos P. M. Aidar por todo o conhecimento e experiência transmitidos, pelo esforço em ajudar e principalmente por acreditar no meu potencial para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Renato Belinello “Pézão” por todo auxílio no transporte e nas coletas realizadas para o trabalho e principalmente pelo ótimo humor durante as mesmas.

Ao Dr. Mauro A. Marabesi por toda a amizade e ajuda durante o desenvolvimento do trabalho e pelo bom humor durante toda essa ajuda.

À Dra. Aline A. Corette-Cavalari pela grande ajuda durante o desenvolvimento do experimento do frio.

A todos os funcionários do Parque Estadual de Campos do Jordão pelo apoio e extremo esforço para melhor comodidade durante a realização das coletas em campo.

Aos funcionários do núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica pelo auxílio nas tarefas realizadas nos laboratórios.

Especialmente aos amigos Fábio, Pedro, Celso, Marco, Filipe, Pepi, Vitor, Jana, Fernanda, Nídia, Bia, Fran, Heloisa, Jéssica, Thiago, Patrícia, Anderson por toda a amizade construída antes, durante e certamente após o período desse trabalho. Por toda ajuda e auxílio em experimentos, coletas, plantas regadas, desabafos, conselhos e principalmente bom humor e alegria no ambiente de trabalho e fora deste também.

Aos demais colegas do Instituto de Botânica de São Paulo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida.

À Pós-Graduação do Instituto de Botânica pela oportunidade oferecida.

A todos o meu muito obrigado.

## Sumário

Lista de figuras: .....	IV
Lista de tabelas: .....	VIII
Tabela de abreviações .....	IX
RESUMO .....	X
ABSTRACT .....	XII
1. Introdução .....	1
2. Objetivos .....	8
3. Material e Métodos .....	9
3.1. Área de Estudo .....	9
3.2. Seleção e categorização sucessional ecológica das espécies .....	10
3.3. Condições climáticas: temperatura e precipitação .....	11
3.4. Atividade potencial máxima da enzima nitrato redutase <i>in vivo</i> .....	13
3.5. Conteúdo de nitrato foliar .....	13
3.6. Determinação da razão isotópica do N e da razão C/N em amostras de folha.....	13
3.7. Análise de fluído do xilema .....	14
3.8. Análise da disponibilidade de nitrogênio do solo mineral <i>in situ</i> .....	14
3.9. Experimento de aclimatação ao frio.....	15
3.10. Forma de análise dos resultados.....	17
4. Resultados e discussão .....	18
4.1. Resultados gerais.....	18
4.2. Nitrogênio <i>in situ</i> .....	24
4.3. Caracterização de uso de nitrogênio com base nos grupos sucessionais .....	26
4.4. Análise de ordenação .....	34
4.5. Caracterização de uso de nitrogênio das espécies selecionadas.....	36
4.6. Experimento de aclimatação ao frio.....	52
5. Considerações finais.....	57
6. Referências Bibliográficas .....	59

## Lista de figuras:

**Figura 1.** Diagrama conceitual indicando as diferentes estratégias de uso de nitrogênio pelas plantas ao longo da sucessão florestal (Aidar et al., 2003).  $\delta^{15}\text{N}$  foliar (‰); conteúdo de N na seiva do xilema ( $\mu\text{mol mL}^{-1}$ ); atividade da enzima nitrato redutase – ANR (pkat g-1MF); conteúdo de N foliar (%); conteúdo de  $\text{NO}_3^-$  na seiva do xilema (%);  $\text{NO}_3^-$  - nitrato; Asn - asparagina; Arg- arginina; Gln - glutamina; outros, outros aminoácidos. Sucessão Inicial – 15 anos de regeneração; sucessão média – 25 anos e sucessão tardia – +36 anos de regeneração após abandono.....3

**Figura 2.** Contribuições do óxido nítrico (NO) e esfingolipídios para a tolerância ao frio nas plantas. O modelo demonstra dois contribuidores para a tolerância do estresse causado pelo frio, que provavelmente é o resultado da redução da mobilidade das membranas celulares que por sua vez é um sinal para a produção de ácido fosfatídico (Gupta et al. 2011).....7

**Figura 3A)** Localização do parque Estadual de Campos do Jordão no Estado de São Paulo; B) Localização do PECJ por imagem de satélite no município de Campos do Jordão (Foto: Sieglösch, *et al.* 2012).....9

**Figura 4.** À esquerda: parâmetros climáticos médios para o município de Campos do Jordão para o período 1995 - 2011: PPT – precipitação (mm); ETP – evapotranspiração potencial (mm); T – temperatura (oC). À direita: temperaturas médias máximas (Tmax, oC) e mínimas (CIIAGRO, 2014).....10

**Figura 5A.** Dados de precipitação (mm) e temperatura média (°C) durante o período de 06 de dezembro de 2012 a 02 de fevereiro de 2013, em destaque período de coleta de dados. B. Dados de precipitação (mm) e temperatura média (°C) durante o período de 24 de junho a 18 de agosto de 2013. A área em destaque representa os dias que foram realizados à coleta (CIIAGRO, 2014).....12

**Figura 6.** Temperatura e umidade do ambiente em que as plantas controle estavam submetidas durante agosto de 2014. (Estação Meteorológica do IAG-USP, 2014).....16

**Figura 7:** Nitrato e amônio in situ ( $\mu\text{g N g}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) no verão e inverno. Letras maiúsculas indicam significância para análises entre as concentrações de amônio e nitrato em uma mesma

estação para teste T. Letras minúsculas indicam significância para análises entre as concentrações de amônio e nitrato entre estações para teste T. Foram consideradas diferenças significativas para  $p < 0,05$ .....25

**Figura 8:** Conteúdo de nitrato foliar ( $\mu\text{mol.g PF}^{-1}$ ) por grupos ecológicos (Pioneira, Secundária inicial (S inicial), Leguminosas Secundárias iniciais (Si Leg) e Secundária tardia (S tardia)) no verão e inverno. Letras maiúsculas indicam significância para análises entre grupos ecológicos em uma mesma estação para teste de Tukey. Letras minúsculas indicam significância para análises entre estações para um mesmo grupo para teste T. Foram consideradas diferenças significativas para  $p < 0,05$ .....27

**Figura 9:** Atividade da enzima nitrato redutase foliar – ANR ( $\mu\text{kat.g PF}^{-1}$ ) por grupos ecológicos (Pioneira (P), Secundária inicial (Si), Leguminosas Secundárias Iniciais (Si Leg) e Secundária tardia (St)) no verão e inverno. Letras maiúsculas indicam significância para análises entre grupos ecológicos em uma mesma estação para teste de Tukey. Letras minúsculas indicam significância para análises entre estações para um mesmo grupo sucessional para teste T. Foram consideradas diferenças significativas para  $p < 0,05$ .....28

**Figura 10.** Conteúdo de nitrato na seiva do xilema ( $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ ) por grupos ecológicos (Pioneira (P), Secundária inicial (Si), Leguminosas Secundárias Iniciais (Si Leg) e Secundária tardia (St)) no verão e inverno. Letras maiúsculas indicam significância para análises entre grupos ecológicos em uma mesma estação para teste de Tukey. Letras minúsculas indicam significância para análises entre estações em um mesmo grupo para teste T. Foram consideradas diferenças significativas para  $p < 0,05$ .....29

**Figura 11.** Nitrogênio foliar total (%) por grupos ecológicos (Pioneira (P), Secundária inicial (Si), Leguminosas Secundárias Iniciais (Si Leg) e Secundária tardia (St)) no verão e inverno. Letras maiúsculas indicam significância para análises entre grupos ecológicos em uma mesma estação para teste de Tukey. Letras minúsculas indicam significância para análises entre estações em um mesmo grupo para teste T. Foram consideradas diferenças significativas para  $p < 0,05$ .....31

**Figura 12.** Razão C:N foliar por grupos ecológicos (Pioneira (P), Secundária inicial (Si), Secundária tardia (St)) no verão e inverno. Letras maiúsculas indicam significância para análises entre grupos ecológicos em uma mesma estação para teste de Tukey. Letras

minúsculas indicam significância para análises entre estações em um mesmo grupo para teste T. Foram consideradas diferenças significativas para  $p < 0,05$ .....31

**Figura 13.** Proporção de compostos nitrogenados de baixo peso molecular presentes da seiva do xilema nos indivíduos pertencentes a diferentes categorias sucessionais em duas estações do ano. Dentre as categorias sucessionais: St – Secundária tardia; SiLeg – Secundária inicial leguminosa; Si – Secundária Inicial e Pi – Pioneira; Aminoácidos:  $\text{NO}_3^-$  - Nitrato; ASN – Asparagina; GLN – Glutamina; ARG – Arginina; ASP – Aspartato; GLU – Glutamato; CIT – Citrulina; ORN – Ornitina e LYS – Lisina.....33

**Figura 14.** Ordenação (PCA) das 22 espécies estudadas na Floresta Ombrófila Mista de Campos do Jordão e suas diferentes estratégias de regeneração (Pi, Si e St), baseada nos valores de 11 variáveis avaliadas no inverno, sendo: Nt - % de N na folha, C:N – razão carbono/nitrogênio na folha, Ns - % de N na seiva do xilema sob a forma de nitrato, Nr – atividade da enzima nitrato redutase, Arg – % de N na seiva do xilema sob a forma de arginina, Asn – % de N na seiva do xilema sob a forma de asparagina, Glu - % de N na seiva do xilema sob forma de glutamato, Gln - % de N na seiva do xilema sob forma de glicina e  $\delta^{15}\text{N}$  – assinatura isotópica de  $^{15}\text{N}$  na folha.....35

**Figura 15.** Atividade fotossintética das plantas expostas ao tratamento pelo frio e das plantas controle. Os valores marcados com "\*" apresentam diferenças estatísticas significativas para teste T entre controle e tratamento. Foram consideradas diferenças significativas para  $p < 0,05$ .....52

**Figura 16.** Atividade da enzima nitrato redutase ( $\text{pKat.g PF}^{-1}$ ) ao longo dos dias de experimentação para indivíduos tratados (expostos ao frio) e indivíduos controle (não expostos ao frio). Os valores marcados com "\*" representam diferença estatística significativa para teste T entre controle e tratamento. Foram consideradas diferenças significativas para  $p < 0,05$ .....54

**Figura 17.** Unidas Arbitrárias de Fluorescência (UAF/g/m) de NO em plantas expostas ao frio ao longo dos dias de experimentação para indivíduos tratados (expostos ao frio) e indivíduos controle (não expostos ao frio). Os valores marcados com "\*" representam diferença estatística significativa para teste T entre controle e tratamento. Foram consideradas diferenças significativas para  $p < 0,05$ .....55

**Figura 18.** Correlação entre atividade da enzima nitrato redutase ( $\mu\text{kat g}^{-1}\text{PF}$ ) e emissão de NO (UAF) dos indivíduos controle e indivíduos tratamento. Ajuste de curva polinomial (NO – ANR) e coeficiente de correlação ( $R^2$ ).....56

## Lista de tabelas:

- Tabela 1:** Lista de espécies coletadas nas parcelas do Parque Estadual de Campos do Jordão, SP. Índice de Valor de Importância (IVI), Dominância Relativa (DoR); Número de indivíduos (N) e categoria sucessional (P = Pioneira, Si = Secundária Inicial e St = Secundária tardia).....11
- Tabela 2.** Parâmetros avaliados em campo para a espécie *Ocotea puberula*. Média e desvio padrão da atividade de nitrato redutase (ANR), Média e desvio padrão do nitrogênio total foliar (N<sub>tt</sub>), RS – Estratégia de regeneração.....15
- Tabela 3:** Média e desvio padrão da atividade de nitrato redutase (ANR), conteúdo de nitrato foliar (NO<sup>-3</sup> F), abundância natural de nitrogênio foliar ( $\delta^{15}\text{N}$ ), nitrogênio total foliar (N<sub>tt</sub>) e relação carbono: nitrogênio (C:N) das espécies arbóreas utilizadas no estudo por estação. Estratégia de regeneração (Rs): pioneira(P), secundária inicial (Si), secundária tardia (St).....20
- Tabela 4:** Média e desvio padrão do conteúdo de nitrato (NO<sup>-3</sup> S) e de aminoácidos totais (Aas S) na seiva do xilema das espécies arbóreas utilizadas no estudo por estação. E composição de aminoácidos presentes na seiva do xilema (Asn, Gln, Arg, Asp, Glu, Cit, Orn, Lys e outros) por espécies. Estratégia de regeneração (Rs): pioneira(P), secundária inicial (Si), secundária tardia (St).....22
- Tabela 5:** Classes de valores para os parâmetros analisados nas espécies arbóreas quanto ao uso de nitrato: ANR – atividade da enzima nitrato redutase foliar, NO<sup>3-</sup> Foliar – conteúdo de nitrato na folha, NO<sup>3-</sup> Seiva – conteúdo de nitrato na seiva do xilema,  $\delta^{15}\text{N}$  Foliar – abundância natural do nitrogênio estável na folha (<sup>15</sup>N), N<sub>tt</sub> Foliar – porcentagem de nitrogênio foliar total, C:N – razão do carbono: nitrogênio presente na folha.....36

## **Tabela de abreviações**

$\delta^{15}\text{N}$  – abundância natural do isótopo de nitrogênio estável

ASN – asparagina

ASP - aspartato

ARG – arginina

CIT - citrulina

C:N – carbono:nitrogênio

FOM – Floresta Ombrófila Mista

GLN – glutamina

GLU – glutamato

GOGAT - glutamina oxoglutarato aminotransferase

GS – glutamina sintetase

IVI – índice de valor de importância

LYS - lisina

N – nitrogênio

ORN - ornitina

ANR – atividade de nitrato redutase

NR – nitrato redutase

NiR – nitrito redutase

NO – óxido nítrico

P – espécies pioneiras

Si – espécies secundárias iniciais

Si Leg – espécies leguminosas secundárias iniciais

St – espécies secundárias tardias

## RESUMO

Os trabalhos fitossociológicos e florísticos realizados na Mata Atlântica foram muito intensificados durante a última década e indicam a diferenciação na composição de espécies e como consequência, levam também a variações nos padrões de regeneração, dispersão, estrutura e funcionamento das diferentes fisionomias florestais que compõem a Mata Atlântica. O estudo da sucessão florestal indica que as florestas compõem um mosaico de fisionomias associadas à regeneração da própria floresta: fases de clareira, de regeneração e madura. Estas fases apresentam características ambientais diferenciadas principalmente pela disponibilidade de luz no solo e são caracterizadas pela ocupação de espécies com características ecofisiológicas distintas que podem ser então consideradas como grupos funcionais em termos de estratégias de regeneração. Basicamente são classificadas em três grupos: espécies pioneiras, secundárias iniciais ou secundárias tardias. Estudos sobre a relação do uso de N e sucessão na Mata Atlântica iniciado em 2003 estabelecem que as espécies apresentam um *continuum* de estratégias do uso de nitrogênio de acordo com as guildas de regeneração numa área de floresta ombrófila densa. Recentemente foi observado que as espécies arbóreas da Floresta Ombrófila Densa Montana apresentaram alta atividade da NR no inverno em relação ao verão em todas as categorias sucessionais, divergindo da proposição do modelo de uso de nitrogênio que supõe maior atividade enzimática no verão quando há maior disponibilidade de nitrato no solo e nas espécies pioneiras que são especializadas na redução foliar de nitrato. O projeto teve como objetivo caracterizar a ecofisiologia do uso de nitrogênio nas espécies arbóreas dominantes na Floresta Ombrófila Mista no Parque Estadual de Campos do Jordão, SP. Foram selecionadas 22 espécies para o estudo, pertencentes a 15 famílias. Foram coletados três indivíduos por espécie para as seguintes análises: Atividade potencial da enzima nitrato redutase in vivo (ANR), conteúdo de nitrato foliar e nitrogênio total foliar, relação C:N e  $\delta^{15}\text{N}$  foliares, análise do conteúdo de nitrato e aminoácidos no xilema e análise da disponibilidade de nitrogênio do solo mineral in situ. Dentre as espécies coletadas, uma foi selecionada para a realização de um experimento de aclimação ao frio. As coletas foram realizadas durante as estações seca e úmida de 2013. Das espécies selecionadas, uma foi classificada como pioneira, 14 como secundárias iniciais e sete como secundárias tardias. Os resultados indicam que as espécies apresentam diferentes estratégias de uso de nitrogênio relacionadas com o grupo ecológico a que pertencem. As espécies pioneiras são caracterizadas pela maior assimilação de nitrato na folha o que está relacionado com a elevada atividade da enzima nitrato redutase foliar, elevado nitrogênio foliar e conteúdo de nitrato elevado na seiva, enquanto as espécies tardias apresentam baixa

atividade de nitrato redutase, um menor conteúdo de nitrogênio foliar, um menor conteúdo de nitrato no xilema e elevada relação C/N. As espécies secundárias iniciais formam o *continnum* entre os dois grupos anteriores, apresentando características ora semelhantes as pioneiras ora as secundárias tardias. No geral, apresentam baixa atividade da enzima nitrato redutase, reduzido conteúdo de nitrato no xilema, média relação C:N e como principal aminoácido transportador a asparagina (ASN). O conteúdo de nitrogênio no solo apresenta relação com a sazonalidade e com as concentrações de nitrato foliar encontradas, embora essa não ter demonstrado ser um bom indicador entre os grupos. O experimento de aclimação ao frio demonstrou que os indivíduos expostos ao frio apresentaram maior atividade da enzima nitrato redutase assim como maior emissão foliar de óxido nítrico do que as plantas controle sugerindo então que a alta atividade observada no inverno em espécies secundárias iniciais esteja relacionada a um mecanismo de aclimação ao frio e não nutricional. Os dados corroboram o modelo de uso de nitrogênio para as espécies arbóreas proposto em 2003, e demonstram que a alta atividade da enzima nitrato redutase em espécies secundárias iniciais no inverno está relacionada a aclimação ao frio.

**Palavras-chave:** nitrato redutase, sucessão ecológica, nitrato, óxido nítrico

## **ABSTRACT**

The phytosociological and floristic studies conducted in the Atlantic Forest have been extended during the last decade and indicate differentiation in species composition and consequently also lead to changes in patterns of regeneration, dispersion, structure and functioning of the different forest formations that composes the Atlantic Forest. The study of forest succession indicates that forests compose a mosaic of physiognomies associated with the regeneration of the forest itself: phases of gap, regeneration and mature. These phases are differentiated primarily by environmental characteristics of light availability in soil and are characterized by occupation of different species with distinct ecophysiological characteristics that may be regarded as functional groups in terms of regeneration strategies. Basically are classified in three groups: Pioneer species, early secondary and late secondary. Studies regarding the use of nitrogen and forest succession in the Atlantic Forest started in 2003 state that the species exhibit a continuum of strategies of nitrogen use in accordance with the regeneration guilds in an area of dense ombrophilous forest. Recently it was observed that the arboreal species of the Ombrophilous Dense Montana Forest presented high nitrate reductase activity in winter in relation to summer in all the guilds, disagreeing with the model proposition that implies higher enzyme activity in the summer when there is greater availability of nitrate in soil and higher activity of pioneer species which are specialized in leaf nitrate reduction. The project aims to characterize the ecophysiology of nitrogen use in dominant arboreal species in Mixed Ombrophilous Forest, State Park in Campos do Jordao, SP. In total, 22 species were selected for the study, belonging to 15 families for the following analysis. Potential activity of the enzyme nitrate reductase in vivo (ANR), leaf nitrate content and total leaf nitrogen, the C:N relation and foliar  $\delta^{15}\text{N}$ , content analysis of nitrate and aminoacids in the xylem and analysis of nitrogen availability in the mineral soil in situ. Among the species collected, one was selected for the execution of an experiment of cold acclimation. The samples were collected during the dry and wet seasons in 2013. From the selected species, one was classified as pioneer, 14 as early secondary and seven as late secondary. The results indicate that species have different strategies for use of nitrogen related to the ecological group they belong to. Pioneer species are characterized by higher nitrate assimilation in the leaf which is related to the high activity of the foliar enzyme nitrate reductase, high leaf nitrogen content and high nitrate in the sap, while the late secondary species have low nitrate reductase activity, a lower leaf nitrogen content, a lower content of nitrate in the xylem and a higher C: N relation. The early secondary species form a continuum between the two previous groups, sometimes with similar characteristics to pioneer species

and sometimes with late secondary. In general, early secondary exhibit low activity of the enzyme nitrate reductase, reduced nitrate content in the xylem, average C:N ratio and the main carrier of nitrogen is the asparagine (ASN) aminoacid. The nitrogen content in the soil is correlated with the seasonality and foliar concentrations of nitrate found, although this has not proven to be a good indicator between groups. The experiment of cold acclimation showed that individuals exposed to cold nights had higher activity of nitrate reductase as well as greater leaf emission of nitric oxide compared to control plants suggesting that most high activity observed in winter in early secondary species is related to a mechanism of cold acclimation and not nutritional. The data support the model of using nitrogen for the arboreal species proposed in 2003 and demonstrate that the high activity of nitrate reductase in early secondary species in winter is related to cold acclimation.

**Keywords:** nitrate reductase, ecological succession, nitrate, nitric oxide.

## 1. Introdução

O nitrogênio (N) é o quarto elemento com maior abundância nas plantas (Taiz & Zeiger, 2009) e o principal nutriente para produtividade e crescimento das plantas, essencialmente presente em importantes biomoléculas do metabolismo vegetal, como clorofila, proteínas, enzimas, ATP, NADH e NADPH (Harper, 1994). Além disto, é um elemento limitante em aspectos estruturais, funcionais e regulatórios na produção das populações vegetais (Rentsch *et. al.*, 2007).

O nitrogênio mineral pode ser assimilado pelas raízes diretamente do solo em duas principais formas: nitrato e amônio. O nitrato é avaliado como a principal forma (Aidar *et al.*, 2003; Stewart *et.al.*, 1993) porém existem evidências de que o amônio pode prevalecer em algumas situações (Stewart *et al.*, 1993; Nardoto & Bustamante, 2003). Além do N inorgânico, o N orgânico (aminoácidos, peptídeos e proteínas) também pode ser assimilado pelas plantas e é considerada uma fonte importante para as comunidades vegetais (Schmidt *et al.*, 1998, Näsholm *et al.*, 1998, Näsholm & Persson 2001, Näsholm *et al.*, 2009). O nitrogênio pode ser obtido através de relações simbióticas entre a planta e organismos fixadores de nitrogênio e essa obtenção pode ser ainda facilitada pela presença de micorrizas ou fungos micorrízicos arbusculares (Jesus *et.al.* 2005).

O nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) é a forma de nitrogênio encontrado em grandes quantidades em solos úmidos (Xu *et al.*, 2012), considerado, portanto, a principal fonte de nitrogênio mineral assimilado pelas plantas (Stewart *et.al.* 1993). Uma vez absorvido, é transportado via xilema para as folhas, onde pode então ser acumulado nos vacúolos ou até mesmo nas próprias raízes. O  $\text{NO}_3^-$  é assimilado pelas folhas e pode ser reduzido no citosol para nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) através da enzima nitrato redutase (NR). O nitrito formado sofrerá ação da enzima nitrito redutase (NiR) e será reduzido a amônio (Stitt & Krapp 1999). O amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) é então acionado em aminoácidos pelas enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamina oxoglutarato aminotransferase (GOGAT) (ou glutamato sintetase) gerando, respectivamente, glutamina e glutamato, compostos de suma importância para a formação de todos os outros aminoácidos a partir de reações de transaminação (Crawford, 1995).

A assimilação do nitrogênio também pode ocorrer na raiz (Bewley, 1981). Nessa situação, o  $\text{NO}_3^-$  é transportado ativamente e o  $\text{NH}_4^+$  passivamente ou por transportadores quando em baixas concentrações (Willians & Miller 2001).

Segundo Andrews (1986), quando há baixas na disponibilidade de  $\text{NO}_3^-$  no solo, a planta direciona sua absorção para as formas orgânicas de N, predominando, portanto,

aminoácidos no transporte pelo xilema. A composição desses aminoácidos torna-se um importante parâmetro para análise da fonte de nitrogênio utilizada assim como a dinâmica do metabolismo de N (Schmidt & Stewart, 1998). Por outro lado, a presença de  $\text{NO}_3^-$  na seiva do xilema, é um ótimo indicativo de assimilação e transporte pelas raízes, uma vez que este não é reciclado via floema, e caracteriza plantas com assimilação e redução de  $\text{NO}_3^-$  nas folhas (Stewart *et al.*, 1993).

Em algumas situações, o  $\text{NH}_4^+$  pode ser a fonte preferencial de nitrogênio para as plantas (Stewart, 1993) e por apresentar alta toxicidade sua assimilação é feita rapidamente para impedir a acumulação nos tecidos. Portanto, logo após sua absorção, deve ser rapidamente combinado com outros compostos para poder ser levado a seu destino final na planta (Schrader & Thomas, 2001).

Por ser um elemento chave na produção e estrutura das populações vegetais (Näsholm *et al.* 1998), a complexidade do ciclo de nitrogênio deve ser bem estudada, já que ele é regulado tanto por fatores bióticos (plantas e microrganismos) como por abióticos (temperatura e precipitação), como exemplo de Martinelli *et al.* (1999) que comparou florestas tropicais às temperadas e obteve dados de maior amplitude, circulação e enriquecimento de  $\delta^{15}\text{N}$  nas florestas mais próximas aos trópicos.

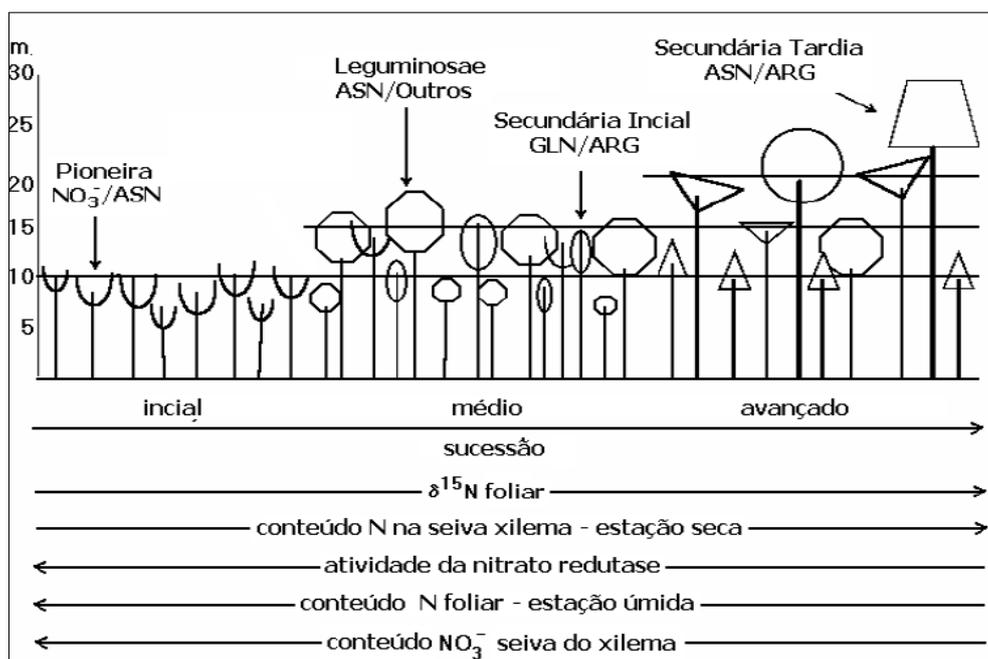
Floresta ombrófila densa, aberta e mista (floresta de araucária), florestas sazonais decíduas e semidecidual, campos de altitude, restinga e mangues são as diferentes fisionomias vegetais que formam o imenso domínio de formações vegetais tropicais conhecidos como Mata Atlântica (Joly *et al.*, 1999). Apresenta um alto grau de endemismo sendo o terceiro maior em número de espécies restritas em sua área (Mittermier *et al.*, 2004). Ocorre ao longo da costa atlântica e originalmente apresentava uma área de 1.315.460 km<sup>2</sup> dentro do território brasileiro, atingindo também áreas da Argentina e do Paraguai. Em território brasileiro, a Mata Atlântica, originalmente cobria 17 Estados, chegando a ocupar cerca de 15% de todo território nacional (Fundação SOS Mata Atlântica/INPE, 2009). Porém, toda essa dimensão e diversidade apresentada pela Mata Atlântica foram severamente reduzidas o que levou a inclusão deste bioma a lista dos 34 hotspots para conservação da biodiversidade (Myers *et al.*, 2000). Atualmente, encontra-se fragmentada e corresponde a cerca de 15% de sua cobertura inicial, localizados basicamente nas regiões Sul e Sudeste e restritas a áreas inapropriadas para a agricultura ou em Unidades de Conservação.

Com a intensificação de trabalhos fitossociológicos e florísticos realizados na Mata Atlântica, é possível em uma mesma fitofisionomia observar diferentes áreas compostas por distintas espécies e como consequência dessa distinção, ocorre variações nos padrões de regeneração, dispersão e estrutura da floresta (Oliveira Filho e Fontes, 2000; Nunes *et al.*,

2003). Tais padrões estão relacionados à incidência de luz no solo nestas florestas causada pela abertura de clareiras, fato que mantém a diversidade de espécies no ecossistema (Hubbell *et. al.*, 1999) além de apresentar nichos distintos de colonização, permitindo que espécies com diferentes estratégias possam coexistir (Tabarelli & Mantovani, 1999).

Portanto, as florestas compõem um mosaico de fisionomias associado à regeneração da própria floresta, dividido em fases com características ambientais distintas, fase de clareira, regeneração e madura (Whitmore, 1990). Essas fases são ocupadas por espécies com atributos ecofisiológicos diferenciados que podem então ser considerados grupos funcionais em termos de estratégias de regeneração. Esses grupos podem ser separados em espécies pioneiras, secundárias iniciais e secundárias tardias (Gandolfi, 1991; Godoy, 2007).

Essa divisão em grupos sucessionais foi relacionada com características do metabolismo de nitrogênio em trabalho realizado por Aidar *et. al.* (2003). Foi proposto um modelo de sucessão ecológica (Figura 1) baseado no uso de nitrogênio por espécies arbóreas tropicais (Figura 1), obtendo diferentes características para espécies pioneiras (P), secundárias iniciais (Si) e secundárias tardias (St).



**Figura 1.** Diagrama conceitual indicando as diferentes estratégias de uso de nitrogênio pelas plantas ao longo da sucessão florestal (Aidar *et al.*, 2003).  $\delta^{15}\text{N}$  foliar (‰); conteúdo de N na seiva do xilema ( $\mu\text{mol mL}^{-1}$ ); atividade da enzima nitrato redutase – ANR (pkat  $\text{g}^{-1}\text{MF}$ ); conteúdo de N foliar (%); conteúdo de  $\text{NO}_3^-$  na seiva do xilema (%);  $\text{NO}_3^-$  - nitrato; Asn - asparagina; Arg- arginina; Gln - glutamina; outros, outros aminoácidos. Sucessão Inicial – 15 anos de regeneração; sucessão média – 25 anos e sucessão tardia – +36 anos de regeneração após abandono.

O grupo de espécies arbóreas pioneiras ocorre preferencialmente nas clareiras ou bordas florestais, são intolerantes à sombra, dependendo da luz para germinação e desenvolvimento (Gandolfi, 2000). Apresentam alta atividade da enzima nitrato redutase foliar, elevado conteúdo total de nitrogênio foliar, nitrato e asparagina como principais transportadores na seiva (Aidar, *et. al.*, 2003) e uma alta taxa de colonização por micorrizas arbusculares (Aidar *et. al.*, 2004).

As espécies arbóreas secundárias tardias ocorrem preferencialmente em ambientes sombreados (Gandolfi, 2000), sendo independentes de luminosidade para processos germinativos e de desenvolvimento. Quanto ao metabolismo do nitrogênio, apresentam baixa atividade enzimática de nitrato redutase foliar, o que está relacionado com a baixa taxa assimilatória de nitrato nas folhas e baixo conteúdo total de nitrogênio. Apresentam reduzidas quantidades de nitrato na seiva e transporte realizado principalmente por asparagina e arginina (Aidar *et. al.*, 2003).

As espécies arbóreas consideradas secundárias iniciais ocorrem no sub-bosque, ausentes em áreas densamente sombreadas, portanto apresentam comportamento intermediário de dependência de luz (Gandolfi, 2000), formando, juntamente com os outros grupos, um *continuum* de respostas fisiológicas. A atividade enzimática de nitrato redutase é menor que a encontrada no grupo das pioneiras, porém maior que as secundárias tardias. Apresentam taxas de nitrato foliar, nitrogênio total e nitrato na seiva inferior ao grupo das pioneiras. O transporte é realizado principalmente por glutamina e arginina (Aidar *et. al.*, 2003).

O modelo de Aidar *et. al.* (2003) foi proposto, inicialmente, para Floresta Ombrófila Densa Montana sobre solos calcários, característica diferenciada do típico solo ácido que ocorre em áreas de Mata Atlântica. A partir deste ponto, outros trabalhos foram realizados em diferentes fitofisionomias de Mata Atlântica sobre solos ácidos e distróficos: Floresta de Restinga (Silva, dados não publicados), Floresta Ombrófila Densa de Terras Baixas (Campos, 2009), Floresta Ombrófila Densa Submontana e Floresta Estacional Semidecidual (Pereira-Silva, 2008), Floresta Ombrófila Densa (Silva, 2012), Floresta Ombrófila Densa Montana (Marchiori, 2012). Todos os trabalhos citados corroboraram o modelo proposto.

A Floresta Ombrófila Mista (FOM) ou Floresta de Araucárias é uma das fitofisionomias pertencentes à Mata Atlântica. São tipicamente da região sul do Brasil, porém apresenta manchas isoladas em regiões de maiores altitudes no sudeste do país, como no caso do Planalto de Campos do Jordão (Souza, 2008). É caracterizada pelas baixas temperaturas durante o inverno, com média mensal em julho de 9°C a 10°C e média mínima abaixo de 0°C. As baixas temperaturas observadas em regiões de FOM foi um importante fator seletivo

que levaram a adaptação das espécies ali encontradas a fim de sobreviverem a essas condições (Souza, 2006).

Na região de Campos do Jordão, registra-se um clima bastante úmido e com secas pouco pronunciadas ou inexistentes, proporcionando o clima ideal para o estabelecimento da *Araucaria angustifolia*, que passou a substituir a vegetação de campos de altitude e estabelecendo-se principalmente ao longo dos rios (Souza, 2006). As araucárias são espécies heliófitas e dominantes nos locais em que ocorrem. Outras famílias importantes na Floresta de Araucária são: Lauraceae, Myrtaceae, Aquifoliaceae, Podocarpaceae e Winteraceae (Souza, 2008), todas estas bem adaptadas ao frio, já que a floresta está sob condições extremas de temperatura.

Ribeiro (2013) determinou as estratégias de uso de N utilizadas pelas espécies arbóreas vegetais que compõem a Floresta Subtropical Úmida Montana localizada no Parque Nacional de Lamington - Queensland na Austrália. Neste trabalho observou-se uma grande similaridade de gêneros e famílias de espécies que ocorrem na Floresta Ombrófila Mista de Campos do Jordão, incluindo o gênero *Araucaria* e famílias como Lauraceae, Myrtaceae e Winteraceae. Os resultados apresentados sugerem que a utilização do N ao longo do gradiente sucessional e estrutural da floresta, onde há ocorrência de *Araucaria cunninghamii* (Araucariaceae), são semelhantes aos indicados no modelo de uso de N para a Mata Atlântica. Portanto, será possível a comparação da FOM de Campos do Jordão com outras áreas já estudadas, inclusive com a Floresta Subtropical Úmida Montana australiana, buscando a ampliação e validação do modelo de uso de nitrogênio em florestas tropicais.

Estudos realizados em regiões com invernos semelhantes ao de Campos do Jordão evidenciam alterações na atividade fotossintética das espécies arbóreas quando submetidas a baixas temperaturas (Van de Weg *et al.* 2012). O inverno frio da Floresta Ombrófila Mista, assim como em Florestas Ombrófilas Densas Montanas (Marchiori, 2012) pode afetar a capacidade fotossintética das espécies ali presentes, uma vez que as baixas temperaturas podem induzir a diferentes respostas bioquímicas e fisiológicas alterando o ciclo de redução do carbono no estroma, o uso de carboidratos, a fotofosforilação nas membranas dos tilacóides e o suprimento de CO<sub>2</sub> para o cloroplasto via estômato (Allen & Ort, 2001), sendo assim, uma excelente indicadora da instalação de estresse em plantas, especialmente por baixas temperaturas (Larcher, 1994).

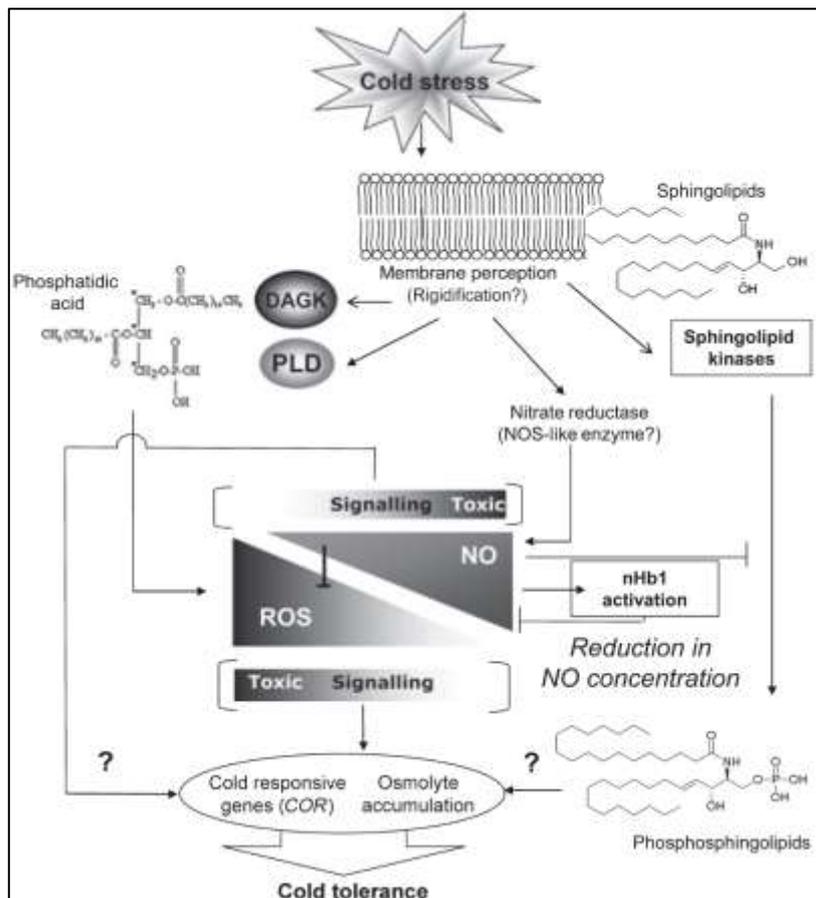
Recentemente foi observado que algumas espécies arbóreas da Floresta Ombrófila Densa Montana (Ribeiro, 2012; Marchiori 2012) apresentaram alta atividade da NR no inverno em relação ao verão em todas as categorias sucessionais, divergindo da proposição do modelo de uso de nitrogênio proposto por Aïdar *et al.* (2003) que supõe maior atividade da

enzima no verão quando há maior disponibilidade de nitrato no solo e nas espécies pioneiras que são especializadas na redução foliar de nitrato. Entretanto, é possível que esta alta atividade apresente função mais relacionada com a aclimação ao frio do que nutricional.

As baixas temperaturas podem impor estresse nas plantas de duas formas, pela desidratação de células e tecidos através do congelamento da água presente nas células ou então pelos efeitos do próprio frio, que acabam levando a viscosidade da membrana, retardo metabolismo e formação de radicais levando ao estresse oxidativo (Beck *et al.*, 2004). A habilidade das plantas em lidar com esse estresse é condicionado a respostas adaptativas apropriadas para precaver os efeitos deletérios causados pelo congelamento e redução do metabolismo celular. O remodelamento do metabolismo é uma das habilidades exibidas pelas plantas, isso ocorre através do acúmulo de compostos crioprotetores como a prolina e açúcares (Cook *et al.*, 2004, Kaplan *et al.*, 2004) e acaba levando a expressão de genes específicos ao estresse pelo frio (Cook *et al.*, 2004).

O óxido nítrico (NO) tem emergido como uma importante molécula sinalizadora que acaba mediando muitos processos fisiológicos e do desenvolvimento das plantas (Delledonne, 2005, Lamattina *et al.*, 2003). Muitos estudos vêm dando suporte ao envolvimento do óxido nítrico (NO) nos estresses abióticos em plantas (Besson-Bard, *et.al*, 2007, Neil *et.al.*, 2003), incluindo o estresse por baixas temperaturas, porém, até então, não havia nenhum estudo detalhado do envolvimento do NO com o estresse acarretado pelo frio e a aclimação para tolerância das plantas. Foi então que Zhao *et.al.* (2009) demonstrou que a aclimação ao frio provocou um aumento acentuado na produção de NO endógeno em folhas de *Arabidopsis*. Mais especificamente, identificou-se que a produção de NO induzido por aclimação ao frio, resultou da atividade de nitrato redutase reforçada.

A partir de então, a enzima nitrato redutase tem sido implicada na via para síntese de NO e recentemente foi demonstrado em *Arabidopsis thaliana* que sua atividade é estimulada quando a planta é exposta ao frio (Cantrel *et.al.*, 2011). O mecanismo de ação é iniciado com a percepção do frio através da redução da mobilidade da membrana celular, fato que resulta na produção de ácido fosfatídico e, simultaneamente, na síntese de NO pela enzima nitrato redutase (Figura 2). O óxido nítrico pode provocar ambos os efeitos positivos e negativos em células vegetais (Arasimowicz & Floryszak-Wieczorek, 2007), portanto o controle do excesso de NO, é realizado por hemoglobinas (Hb), as quais acumulam óxido nítrico no frio possibilitando a sinalização e tolerância através da remodelação dos genes COR, atribuídos as respostas ao frio (Gupta *et al.*, 2011).



**Figura 2.** Contribuições do óxido nítrico (NO) e esfingolípídios para a tolerância ao frio nas plantas. O modelo demonstra dois contribuidores para a tolerância do estresse causado pelo frio, que provavelmente é o resultado da redução da mobilidade das membranas celulares que por sua vez é um sinal para a produção de ácido fosfatídico (Gupta *et al.* 2011).

## 2. Objetivos

O projeto teve como objetivo caracterizar a ecofisiologia do uso de nitrogênio nas espécies arbóreas dominantes na Floresta Ombrófila Mista no Parque Estadual de Campos do Jordão, SP.

Os objetivos específicos são:

A - Determinar suas principais estratégias de uso de N através das características de aquisição, transporte, armazenamento e remobilização durante a estação seca e chuvosa;

B - Relacionar as estratégias de utilização de nitrogênio com as classes sucessionais das espécies arbóreas selecionadas;

C - Relacionar as alterações no uso de nitrogênio das espécies arbóreas entre as duas estações com a disponibilidade de nitrogênio no solo;

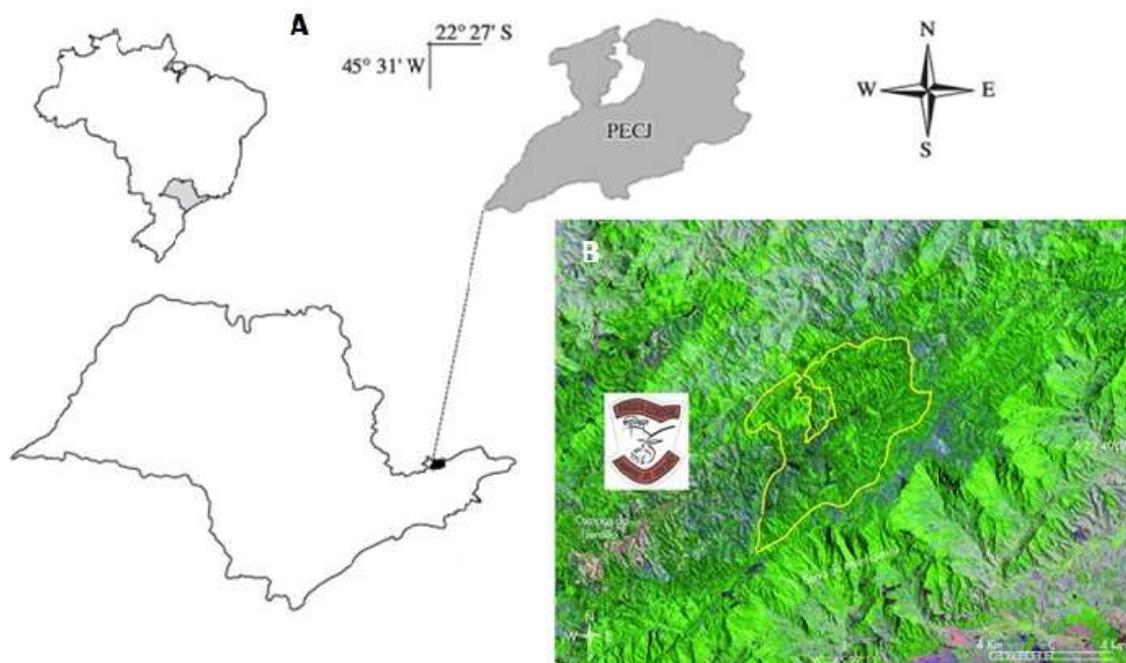
D - Caracterizar a atividade da enzima nitrato redutase e a emissão de NO em resposta a exposição ao frio através de experimento em casa de vegetação em espécie selecionada.

### 3. Material e Métodos

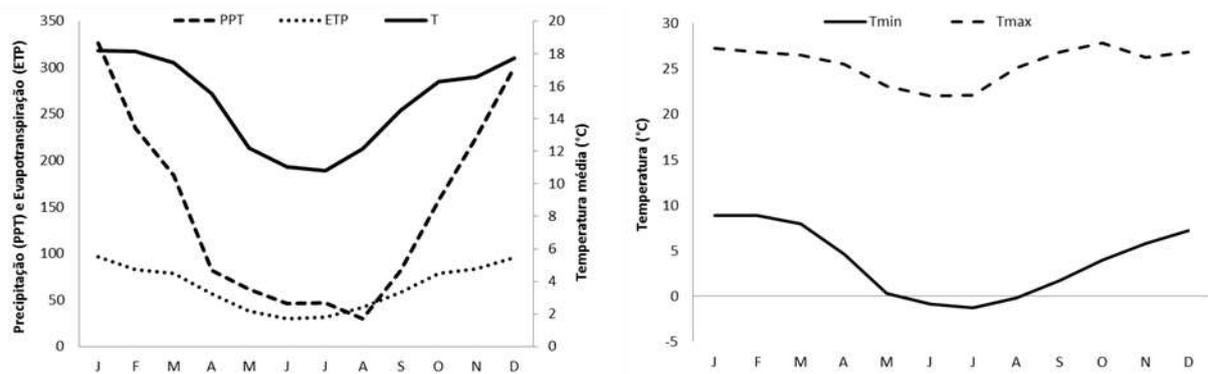
#### 3.1. Área de Estudo

A área de Floresta Ombrófila Mista situa-se no Parque Estadual de Campos do Jordão (PECJ), Campos do Jordão – SP, localizado no Planalto de Campos de Jordão – Serra da Mantiqueira, e recobre área de 8.172ha com altitudes máximas de 2.000m (Figura 3). O relevo é caracterizado por fortes declividades e o solo é classificado como Latossolo Vermelho Amarelo distrófico com textura argilosa. O clima regional é do tipo temperado brando sem estiagem (Cfb) (Koppen, 1948) com a incidência de geadas, sendo fevereiro o mês mais quente (22,5 °C) e maio - agosto os meses mais frios (média de 15°C).

A figura 4 apresenta os parâmetros meteorológicos em Campos do Jordão para o período de 1995 – 2011 e indica a ocorrência de temperaturas médias mínimas de 13°C em julho. O período chuvoso estende-se de outubro a março e julho-agosto os meses de estiagem, atingindo uma precipitação média anual de 1.891mm (CIIAGRO, 2014).



**Figura 3A)** Localização do parque Estadual de Campos do Jordão no Estado de São Paulo; **B)** Localização do PECJ por imagem de satélite no município de Campos do Jordão (Foto: Siegloch *et al.*, 2012).



**Figura 4.** À esquerda: parâmetros climáticos médios para o município de Campos do Jordão para o período 1995 - 2011: PPT – precipitação (mm); ETP – evapotranspiração potencial (mm); T – temperatura (°C). À direita: temperaturas médias máximas (Tmax, °C) e mínimas (Tmin, °C) (CIAGRO, 2014).

### 3.2. Seleção e categorização sucessional ecológica das espécies

As espécies dominantes na área de estudo foram selecionadas segundo sua importância na estruturação da formação vegetal embasada nos parâmetros fitossociológicos Índice de Valor de Importância (IVI) e Dominância Relativa (DoR). O levantamento fitossociológico foi realizado por Souza (2008). Também foram selecionadas espécies consideradas importantes com referência nos seguintes aspectos: espécies indicadoras de ambientes ou estratégias; espécies adequadas para comparações entre as áreas de estudo; famílias importantes e espécies já conhecidas anteriormente.

As espécies selecionadas foram classificadas em grupos sucessionais a partir de dados obtidos por consulta bibliográfica (Araujo *et al.* 2010, Carvalho, *et al.* 2006, Catharino, *et al.* 2006, Dias *et al.* 2010, Marmontel *et al.* 2013, Siminski, *et al.* 2011, Vaccaro, *et al.* 1999, Lima 2010, Polisel, *et al.* 2010, Gomes 2009, Drezza 2009, Pereira 2006, Reginato & Goldenberg, 2007, Souza *et al.* 2012, Scheer *et al.* 2009), e para a categorização sucessional, os procedimentos foram baseados em Gandolfi (2000) onde as espécies são categorizadas em três grupos (pioneiras, secundária inicial e secundária tardia).

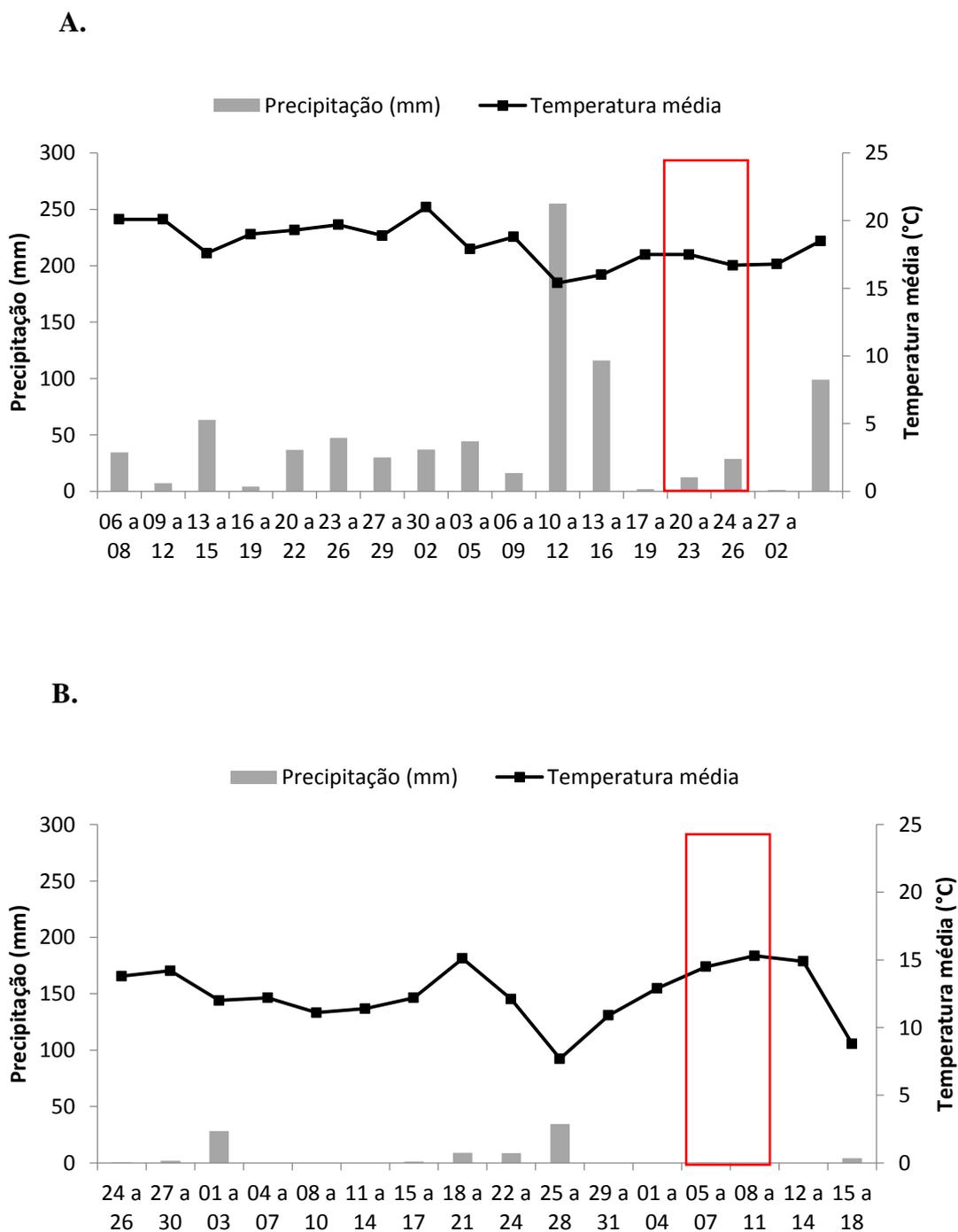
Na tabela 1 são apresentadas as espécies utilizadas no presente trabalho, assim como sua categoria nos grupos ecológicos e o número de indivíduos coletados para cada espécie. Foram coletados no mínimo três indivíduos por espécie com exceção para aquelas que apresentavam um número de indivíduos menor que três.

**Tabela 1:** Lista de espécies coletadas nas parcelas do Parque Estadual de Campos do Jordão, SP. Índice de Valor de Importância (IVI), Dominância Relativa (DoR); Número de indivíduos (N) e categoria sucessional (P = Pioneira, Si = Secundária Inicial e St = Secundária tardia).

Família	Espécie	Autor	IVI	DoR	N	CS
Solanaceae	<i>Solanum pseudoquina</i>	A.St.-Hil.	1,5	0,9	2	P
Annonaceae	<i>Rollinia rugulosa</i>	Schl.	9,9	1,4	3	Si
Asteraceae	<i>Piptocarpha regnellii</i>	(Sch. Bip.)	3,1	0,6	3	Si
Bignoniaceae	<i>Jacaranda puberula</i>	Cham.	5,1	0,9	3	Si
Dicksoiaceae	<i>Dicksonia sellowiana</i>	(Presl.) Hooker	3,7	0,9	3	Si
Fabaceae	<i>Mimosa scabrella</i>	Benth.	0,6	0,3	3	Si
Lauraceae	<i>Cinnamomum sellowiana</i>	(Nees & Mart) Kosterm	15,1	4,5	3	Si
Lauraceae	<i>Ocotea puberula</i>	(Rich.) Nees	1,3	0,1	3	Si
Myrsinaceae	<i>Rapanea ferruginea</i>	(Ruiz & Pav.) Mez.	1,9	0,4	3	Si
Myrsinaceae	<i>Rapanea umbellata</i>	(Mart.) Mez	14,8	4,3	3	Si
Myrtaceae	<i>Gomidesia sellowiana</i>	O. Berg	16,5	1,6	3	Si
Myrtaceae	<i>Myrcia laruotteana</i>	Cambess	8,2	1,6	3	Si
Myrtaceae	<i>Mirceugenia miersiana</i>	(O. Gardner) Lerg	37,8	8,7	5	Si
Rosaceae	<i>Prunus myrtifolia</i>	(L.) Urb	13,6	2,9	3	Si
Symplocaceae	<i>Symplocus falcata</i>	Brand.	8,6	0,7	4	Si
Aquifoliaceae	<i>Ilex microdonta</i>	Reissek	4	0,7	3	St
Aquifoliaceae	<i>Ilex taubertiana</i>	Loes	2,9	0,3	3	St
Aquifoliaceae	<i>Ilex theezans</i>	Mart.	1,2	0,1	3	St
Araucariaceae	<i>Araucaria angustifolia</i>	(Bertol) Kuntze	33,9	24	3	St
Lauraceae	<i>Ocotea dispersa</i>	(Nees) Mez	5,5	0,6	3	St
Podocarpaceae	<i>Podocarpus lambertii</i>	Klotz.	40,4	33	3	St
Winteraceae	<i>Drimys winterii</i>	Miers	18,2	2,9	3	St

### 3.3. Condições climáticas: temperatura e precipitação

As coletas de material vegetal foram realizadas no verão (20 a 24 de janeiro de 2013) e no inverno (5 a 9 de agosto de 2013). A temperatura durante a coleta no inverno apresentou média de 14,5°C e média mínima de 6,8°C, já a precipitação durante a coleta do material vegetal foi praticamente nula. Durante a coleta no verão, a temperatura média foi de 18,8°C e não choveu diferente do que ocorreu no restante do período chuvoso (Figura 5).



**Figura 5A.** Dados de precipitação (mm) e temperatura média (°C) durante o período de 06 de dezembro de 2012 a 02 de fevereiro de 2013, em destaque período de coleta de dados. **B.** Dados de precipitação (mm) e temperatura média (°C) durante o período de 24 de junho a 18 de agosto de 2013. A área em destaque representa os dias que foram realizados a coleta (CIAGRO, 2014).

### **3.4. Atividade potencial máxima da enzima nitrato redutase *in vivo***

Foram retiradas dos ramos no período matutino as folhas totalmente expandidas e foi separado o terço médio de cada folha e cortados em pequenos quadrados (0,1g de material fresco), pesados e transferidas para tubos de ensaio com solução de incubação contendo tampão fosfato ( $K_2HPO_4$  0,1 M, 100 mM  $KNO_3$ ) e 1-propanol 1% (v/v). A solução foi infiltrada sob vácuo, no escuro e os tubos então foram incubados por 1h a 30 C°.

Após esse tempo, 1mL da solução incubada foi transferido para outro tubo de ensaio contendo 1mL de ácido sulfanílico (1%) em ácido clorídrico 1N. Em seguida foi acrescentado 1mL de solução com corante NED ( $\alpha$ -naphthyl ethylenediamine dihydrochloric) 1%. Depois de 30 minutos as amostras foram analisadas em espectrofotômetro (540nm), de acordo com a metodologia de Stewart *et al.* (1986). Todas as amostras coletadas foram analisadas em duplicata.

### **3.5. Conteúdo de nitrato foliar**

Das folhas frescas coletadas uma parte também foi cortada (0,5g) e submetida a extração por metanol (1:5 w/v), mantidas a temperatura ambiente por 24h e congeladas após esse período a -20C°. Essas amostras foram analisadas posteriores de acordo com Cataldo *et al.* (1975), utilizando-se o princípio de nitração pelo ácido salicílico e dosagem por espectrofotometria. Uma alíquota do extrato (0,2 mL) reagiu com 0,8 mL da solução de ácido salicílico 5% em ácido sulfúrico. Após vinte minutos foram adicionados 19 mL de hidróxido de sódio 2N. Por último foi feita a leitura das amostras em duplicata em espectrofotômetro na absorvância de 410 nm.

### **3.6. Determinação da razão isotópica do N e da razão C/N em amostras de folha**

Parte das folhas coletadas dos ramos foram separadas e secas a 50° C. Depois de secas, foram moídas e analisadas através de analisador elementar (Carlo Erba, EA 1110, CHNS, CE Instruments) e espectrometria de massas para razões isotópicas (Delta Plus, ThermoQuest-Finnigan) do Laboratório de Ecologia Isotópica do CENA/ESALQ/USP. O resultado de  $\delta^{15}N$  (‰) foi expresso em relação ao nitrogênio atmosférico.

### **3.7. Análise de fluido do xilema**

Para a análise de aminoácidos e amônio as amostras de seiva foram descongeladas e centrifugadas por 5 minutos a 13 rpm. Posteriormente foi realizada a derivatização de acordo com o kit AccQ-Tag da Waters modificado. Foi adicionado 70 uL de tampão borato no vial seguido de 40 uL de amostra e 20 uL de 6 aminoquinolyl-N- hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC), a solução foi agitada por 10 segundos em um vortex e colocada a 55°C por 10 minutos em banho-maria.

A separação dos aminoácidos foi realizada com a coluna AccQ-Tag Ultra Column C18 a 60°C com os seguintes eluentes: A- AccQ.Tag Ultra Eluent A (10% em água), B- AccQ.Tag Ultra Eluent B (100%), em fluxo de 0,7 mL/minuto. O gradiente entre os dois eluentes foi realizado por dez minutos da seguinte forma: t=0 minutos, 99,9% A e 0,1% B; t=0,54 minutos, 99,9% A e 0,1% B; t=5,74 minutos, 90,9% A e 9,1%B; t=7,74 minutos, 78,8% A e 21,2% B; t=8,05 minutos, 10% A e 90% B; t=8,64 minutos, 10% A e 90% B; t=8,73 minutos, 99,9% A e 0,1% B; t=9,50 minutos, 99,9% A e 0,1% B. Os aminoácidos foram detectados em UV com comprimento de onda de excitação e absorbância a 260 nm e logo após a injeção a coluna era lavada com 200 uL de acetonitrila 95% em água e posteriormente com 600 uL acetonitrila 5% em água.

Para determinar a concentração dos aminoácidos presentes na amostra, foram utilizados padrões com concentrações de 2,5 a 100 pmol de amônia e dos seguintes aminoácidos: Ala- Alanina, Arg- Arginina, Asn- Asparagina, Asp- Aspartato, Cit- Citrulina, Cys- Cisteína, Gly- Glicina, Glu- Glutamato, Gln- Glutamina, H-Pro- Hidroxiprolina, His- Histidina, Ile- Ileucina, Leu- Leucina, Lys- Lisina, Met- Metionina, Orn- Ornitina, Phe- Fenilalanina, Pro- Prolina, Ser- Serina, Tyr- Tirosina, Thr- Treonina, Trp- Triptofano, Val- Valina.

### **3.8. Análise da disponibilidade de nitrogênio do solo mineral *in situ***

A coleta do material consistiu em 9 conjuntos de 3 sacos de nylon com 5 g de resina de troca iônica (Dowex® MR-3, Sigma) que foram enterrados a cinco centímetros abaixo da superfície do solo e mantidos nessas condições durante cinco dias. O local onde os conjuntos eram enterrados foi escolhido com base na distribuição das espécies na área de estudo. Após os cinco dias os sacos eram desenterrados e congelados até o momento da análise dos conteúdos de amônio e nitrato. Em laboratório, a resina de troca iônica coletada foi eluída em 100 ml de KCL 2N por quatro horas sob agitação. O conteúdo de nitrato e amônio em solução

foram determinados de acordo com as metodologias de Cataldo *et al.* (1975) e McCullough (1967), respectivamente. O método de análise de amônio consistiu em reagir uma alíquota da amostra com 5 mL do reagente 1 (fenol e nitroprussiato de sódio) e posteriormente adicionados 5 mL do segundo reagente (hipoclorito de sódio 4%, hidróxido de sódio e fosfato de sódio monobásico). Logo depois as amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (absorbância 625 nm). As amostras eram analisadas em duplicata para cada resina.

### 3.9. Experimento de aclimação ao frio

Seleção de espécies: Foi observado no período de inverno na FOM que várias espécies arbóreas apresentaram altas atividades de nitrato redutase, sugerindo que estas possam estar relacionadas à aclimação ao frio. Assim foi selecionada uma destas espécies que ocorrem na área de estudo para a realização de experimento para verificar a ação do frio sobre a atividade da enzima de nitrato redutase: *Ocotea puberula* (Reich.)Nees (Lauraceae, canela-guaicá) (Tabela 2). As mudas de plantas menores que 20 cm foram adquiridas no viveiro de mudas do Instituto Brasileiro de Florestas. Outras espécies com resultados semelhantes foram propostas para a utilização no experimento, no entanto, não foi possível encontrar mudas das mesmas, apenas da *Ocotea puberula*.

**Tabela 2.** Parâmetros avaliados em campo para a espécie *Ocotea puberula*. Média e desvio padrão da atividade de nitrato redutase (ANR), Média e desvio padrão do nitrogênio total foliar (Ntt), RS – Estratégia de regeneração.

RS	Família	Espécie	Estação	ANR $\mu\text{Kat.gPF}^{-1}$	Ntt %
Si	Lauraceae	<i>Ocotea puberula</i>	Inverno	467,2 ± 236,5	3,3 ± 0,2
			Verão	290,8 ± 240,3	2,8 ± 0,3

O desenho experimental consistiu na utilização de cinco plantas por tratamento e cinco plantas controle. As plantas submetidas a tratamento passavam o período diurno em casa de vegetação e o período noturno em exposição ao frio em câmara fria a 5°C. As plantas controle foram mantidas em casa de vegetação sob condições ambientais (Figura 6). O experimento foi realizado durante o período do inverno e as análises foram feitas após 1, 2, 4, 7 e 10 noites de

exposição ao frio, respectivamente nas datas 19/08/14, 20/08/14, 22/08/14, 25/10/14 e 28/10/14.

<b>Temperatura (Agosto/2014)</b>	
Média mensal (°C):	16,9°C
Média máxima mensal (°C):	24,4°C
Média mínima mensal (°C):	11,5°C
<b>Umidade Relativa (Agosto/2014)</b>	
Média mensal (%):	74,20%
Média mínima mensal (%):	45,80%

**Figura 6.** Temperatura e umidade do ambiente em que as plantas controle estavam submetidas durante agosto de 2014. (Estação Meteorológica do IAG-USP, 2014).

#### **Parâmetros avaliados:**

- Caracterização das trocas gasosas através de analisador de gás por infravermelho (LiCor - 6400). As medidas foram realizadas em folhas maduras em cinco indivíduos sob condições de tratamento (plantas submetidas a 5°C em câmara fria durante a noite) e cinco controles: curvas de resposta à luz mensais (A x RFA) para identificação da fotossíntese máxima (Amax), radiação fotossinteticamente ativa na saturação da fotossíntese (RFA<sub>sat</sub>) calculada a partir do ponto de saturação de luz (RFA<sub>sat</sub> é a radiação correspondente à A<sub>sat</sub> = 0,9 x Amax, A<sub>sat</sub> é a fotossíntese saturada), dinâmica da condutância estomática (gs), transpiração (E) e eficiência do uso da água (EUA = A/E), com uso de câmara de luz artificial e cilindro de CO<sub>2</sub> com concentração constante a 390 ppm.

- Atividade de nitrato redutase foliar: As folhas foram cortadas e transferidas para tubos de ensaio com solução de incubação contendo tampão fosfato (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M, 100 mM KNO<sub>3</sub>) e a atividade enzimática foi determinada de acordo com Stewart *et al.* (1986).

- A emissão de NO pelas folhas da espécie selecionada foi analisada utilizando o indicador fluorescente de 4,5-diaminofluorescein (DAF-2), seguindo o método de Seligman *et al.* (2008). Foram utilizadas 40mg de folhas que posteriormente foram incubadas no escuro em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2) contendo 50M DAF-2. Após 1h, as folhas foram descartadas e a solução resultante diluída cinco vezes em tampão fosfato. Os espectros de emissão de fluorescência entre 500 e 550 nm após excitação a 495 nm foram registrados em espectrofluorômetro da marca Hitachi modelo F-7000 no laboratório da Central Analítica Multiusuário da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) na unidade José de Filippi. As amostras foram analisadas em duplicatas para cada indivíduo.

### **3.10. Forma de análise dos resultados**

A análise de resultados foi feita após o agrupamento das espécies por estratégias de regeneração e também agrupadas pela estação do ano em que foram feitas as coletas. Após o agrupamento foram feitas comparações entre os grupos de regeneração para uma mesma estação do ano e comparações entre as estações para um mesmo grupo ecológico.

Primeiramente foi verificada a homogeneidade de variância e normalidade dos dados, através dos testes de Levene e Shapiro-Wilk, respectivamente. Após estes dois testes foram definidos qual estatística seria aplicada aos dados obtidos.

Para comparações entre grupos ecológicos em uma mesma estação de coleta, foram realizados o teste não paramétrico de Kruskal Wallis e o teste paramétrico de ANOVA. Respectivamente, após esses dois testes, foram utilizados o Kruskalmc e o teste de Tukey.

Para análise entre estações para um mesmo grupo foi realizado o teste T para as amostras pareadas quando paramétricos e o teste de Wilcoxon para dados não paramétricos.

As análises foram realizadas utilizando o software R (R Development Core Team 2011).

## **4. Resultados e discussão**

### **4.1. Resultados gerais**

Nas tabelas 3 e 4 apresentam-se os resultados da atividade potencial máxima da enzima nitrato redutase *in vivo*, conteúdo de nitrato foliar, razão isotópica do N estável, razão C/N e nitrogênio total foliar, conteúdo de aminoácidos e nitrato transportados na seiva. Os resultados são apresentados por espécie indicando à respectiva estratégia de regeneração e os parâmetros mencionados a cima. No tópico 4.3 será feita a discussão com base nos grupos ecológicos das plantas e no tópico 4.5 com base nas espécies e para famílias com mais de uma espécie.

Os resultados de nitrogênio *in situ* e do experimento em câmara fria, serão discutidos nos tópicos, 4.2 e 4.6 respectivamente.

**Tabela 3:** Média e desvio padrão da atividade de nitrato redutase (ANR), conteúdo de nitrato foliar ( $\text{NO}^{-3}$  F), abundância natural de nitrogênio foliar ( $\delta^{15}\text{N}$ ), nitrogênio total foliar (Ntt) e relação carbono: nitrogênio (C:N) das espécies arbóreas utilizadas no estudo por estação. Estratégia de regeneração (Rs): pioneira(P), secundária inicial (Si), secundária tardia (St).

RS	Família	Espécie	Estação	ANR	$\text{NO}^{-3}$ F	$\delta^{15}\text{N}$	Ntt	C:N
				$\rho\text{Kat.gPF}^{-1}$	$\mu\text{mol.g PF}^{-1}$	%	%	-
P	Solanaceae	<i>Solanum pseudoquina</i>	Inverno	351,9 ± 86,9	37 ± 4,9	1,9 ± 0,5	3,0 ± 1,81	17,2 ± 9,6
			Verão	775,2 ± 46,4	39,2 ± 4,6	1,6 ± 0,5	4,3 ± 0,7	10,5 ± 1,5
Si	Lauraceae	<i>Cinnamomum sellowiana</i>	Inverno	32,5 ± 11,9	39 ± 6,2	-2,9 ± 0,4	1,8 ± 0,2	29,6 ± 2,3
			Verão	28 ± 5,5	37,2 ± 4,2	-2,8 ± 0,1	1,6 ± 0,1	31,6 ± 2,5
Si	Dicksoniaceae	<i>Dicksonia sellowiana</i>	Inverno	52 ± 46,2	56,2 ± 7,1	-1,0 ± 0,6	2,0 ± 0,3	23,1 ± 3,1
			Verão	27,3 ± 14,4	47,9 ± 14,6	-1,0 ± 0,4	2,3 ± 0,3	20,4 ± 2,8
Si	Myrtaceae	<i>Gomidesia sellowiana</i>	Inverno	114,7 ± 45,1	32,9 ± 2,7	-3,3 ± 0,6	1,2 ± 0,1	39,5 ± 3,8
			Verão	96,6 ± 6,1	25,4 ± 2,3	-2,6 ± 0,3	1,2 ± 0,1	38,8 ± 1
Si	Bignoniaceae	<i>Jacaranda puberula</i>	Inverno	529,1 ± 167,7	102,2 ± 21	-1,4 ± 1	2,3 ± 0,4	21,2 ± 3,8
			Verão	663,8 ± 71	101,7 ± 20,9	0,4 ± 0,4	3,1 ± 0,5	16,1 ± 2,6
Si	Myrtaceae	<i>Mirceugenia miersiana</i>	Inverno	13,1 ± 12,9	58,4 ± 10,8	-0,5 ± 0,3	1,5 ± 0,2	31,7 ± 4,4
			Verão	71,1 ± 77,4	36,6 ± 5,2	-0,1 ± 0,3	1,5 ± 0,1	32,3 ± 2,7
Si	Myrtaceae	<i>Myrcia laruotteana</i>	Inverno	215,5 ± 164,7	85,1 ± 7,5	-0,5 ± 0,6	1,7 ± 0,1	26,1 ± 0,6
			Verão	270,2 ± 46,7	62,4 ± 2	0,2 ± 0,5	1,6 ± 0,1	27,8 ± 1,2
Si	Fabaceae	<i>Mimosa scabrella</i>	Inverno	193,4 ± 67,6	70,3 ± 7,9	0,5 ± 0,4	3,0 ± 0,4	16,3 ± 2,3
			Verão	10,9 ± 4,3	64,2 ± 4,9	0,2 ± 1,1	3,4 ± 0,2	14,2 ± 0,6
Si	Lauraceae	<i>Ocotea puberula</i>	Inverno	467,2 ± 236,5	45,2 ± 8,8	-0,5 ± 0,9	3,3 ± 0,2	16,1 ± 3,1
			Verão	290,8 ± 240,3	30,3 ± 3,2	-0,7 ± 0,9	2,8 ± 0,3	19,0 ± 4,6
Si	Asteraceae	<i>Piptocarpha regnelii</i>	Inverno	314,9 ± 217,7	34,5 ± 2,2	0,2 ± 0,2	1,6 ± 0,1	27,3 ± 1
			Verão	68,3 ± 31,7	35,2 ± 1,1	0,3 ± 0,6	1,5 ± 0,2	29,1 ± 3,6
Si	Rosaceae	<i>Prunus myrtifolia</i>	Inverno	111,7 ± 178,9	68,6 ± 7,1	-2,2 ± 0,8	1,9 ± 0,1	24,5 ± 1,4
			Verão	23,5 ± 25,5	67 ± 5,4	-1,1 ± 0,4	1,9 ± 0,2	24,6 ± 2,4

**Tabela 3.** (Continuação)

Si	Myrsinaceae	<i>Rapanea ferruginea</i>	Inverno	50,8 ± 31,2	58,5 ± 21	-1,1 ± 1,5	1,8 ± 0,2	27,0 ± 3,4
			Verão	43,2 ± 31	51,6 ± 13,5	-1,2 ± 1,8	2,0 ± 0,2	25,1 ± 2,6
Si	Myrsinaceae	<i>Rapanea umbellata</i>	Inverno	3 ± 1,9	87,6 ± 12,3	-2,1 ± 0,7	1,5 ± 0,2	33,6 ± 4,5
			Verão	19,9 ± 3,4	79,3 ± 15,5	-1,8 ± 0,5	1,6 ± 0,2	31,3 ± 3,5
Si	Annonaceae	<i>Rollinia rugulosa</i>	Inverno	761,3 ± 63,2	70,6 ± 8,7	-0,8 ± 0,5	2,7 ± 0,3	16,9 ± 1,9
			Verão	429,8 ± 62,7	64,7 ± 9,8	1,6 ± 0,7	2,9 ± 0,3	15,9 ± 1,5
Si	Symplocaceae	<i>Symplocus falcata</i>	Inverno	292,9 ± 42,1	65,5 ± 12,4	-1,4 ± 1,1	1,7 ± 0,1	27,2 ± 2,1
			Verão	83,2 ± 61,7	53,7 ± 13,3	-1,9 ± 0,4	1,7 ± 0,2	26,6 ± 2,8
St	Aquifoliaceae	<i>Ilex microdonta</i>	Inverno	37,4 ± 23,4	77,9 ± 22,7	-2,6 ± 1,2	1,7 ± 0,1	26,6 ± 2,4
			Verão	20,2 ± 11,5	93,1 ± 26,8	-1,1 ± 0,5	1,5 ± 0,4	34,8 ± 9,6
St	Aquifoliaceae	<i>Ilex taubertiana</i>	Inverno	23,3 ± 12,6	84 ± 32	-0,6 ± 0,5	1,5 ± 0,4	33,1 ± 11,1
			Verão	30,2 ± 13,4	82,5 ± 1,1	-0,9 ± 0,2	1,5 ± 0,4	34,8 ± 12,5
St	Aquifoliaceae	<i>Ilex theezans</i>	Inverno	61,8 ± 25,1	93,5 ± 12	-1,8 ± 0,8	1,1 ± 0,1	44,2 ± 3,6
			Verão	42,2 ± 8,9	95,2 ± 10,8	-1,6 ± 0,7	1,1 ± 0,1	45,2 ± 3,8
St	Araucariaceae	<i>Araucaria angustifolia</i>	Inverno	10,1 ± 5,5	59,1 ± 13,5	-1,3 ± 0,8	1,3 ± 0,1	37,2 ± 0,8
			Verão	24,2 ± 0,9	37,4 ± 13,1	-0,9 ± 0,4	1,4 ± 0,1	33,5 ± 2
St	Winteraceae	<i>Drimys winterii</i>	Inverno	1,8 ± 0,1	71 ± 26,2	-1,0 ± 0,7	1,5 ± 0,3	34,7 ± 9,5
			Verão	9,5 ± 5,5	61,3 ± 23,3	-1,0 ± 0,5	1,5 ± 0,2	33,1 ± 4,6
St	Lauraceae	<i>Ocotea dispersa</i>	Inverno	25 ± 14,1	69,4 ± 31,7	-1,2 ± 0,7	2,1 ± 1,2	25,4 ± 6
			Verão	14,1 ± 9,7	55,7 ± 26,6	-0,8 ± 0,1	1,9 ± 1,1	25,4 ± 9,1
St	Podocarpaceae	<i>Podocarpus lambertii</i>	Inverno	1,2 ± 2,1	89,7 ± 27,1	-1,2 ± 0,6	1,6 ± 0,1	29,5 ± 1,6
			Verão	16,8 ± 2,5	72,1 ± 5	-1,1 ± 0,5	1,5 ± 0,1	31,5 ± 0,3

**Tabela 4:** Média e desvio padrão do conteúdo de nitrato ( $\text{NO}_3^-$  S) e de aminoácidos totais (Aas S) na seiva do xilema das espécies arbóreas utilizadas no estudo por estação. E composição de aminoácidos presentes na seiva do xilema (Asn, Gln, Arg, Asp, Glu, Cit, Orn, Lys e outros) por espécies. Estratégia de regeneração (Rs): pioneira(P), secundária inicial (Si), secundária tardia (St).

RS	Família	Espécie	Estação	Conteúdo de nitrato e principais aminoácidos presentes na seiva do xilema (%)									
				$\text{NO}_3^-$	Asn	Gln	Arg	Asp	Glu	Cit	Orn	Lys	Outros
P	Solanaceae	<i>Solanum pseudoquina</i>	Inverno	14	3,71	0,3	0	2,6	1	8,6	0	0	69,7
			Verão	51	18,8	13,9	1,1	0,3	0	0	7,2	0	7,8
Si	Lauraceae	<i>Cinnamomum sellowiana</i>	Inverno	58,4	8,6	5,6	0	14,4	5,6	0	0	0	7,4
			Verão	58,6	21	1,5	0	0,7	0	0	0	7,4	10,8
Si	Myrtaceae	<i>Gomidesia sellowiana</i>	Inverno	37,8	1,7	5	10,1	16,4	17,2	0	1	0	10,8
			Verão	61,7	0,1	18,3	6,3	2,4	0	0	0	0	11,2
Si	Bignoniaceae	<i>Jacaranda puberula</i>	Inverno	58,7	0	8,6	0,6	4,1	0,1	22,8	0	0	5
			Verão	63,5	0	0	1,4	0	0	0	29,9	0	5,2
Si	Myrtaceae	<i>Mirceugenia miersiana</i>	Inverno	31,5	0,3	8,1	8,8	17,4	14,1	0	0	1	19,6
			Verão	75,9	0,1	0,7	8,9	3,8	0	0	0	0	10,7
Si	Myrtaceae	<i>Myrcia laruotteana</i>	Inverno	11	0	38,5	11,2	23,8	6,1	0	0	0	1,3
			Verão	58,5	0,6	25,4	3,3	5,5	0	0	0	0	12,2
Si	Fabaceae	<i>Mimosa scabrella</i>	Inverno	14,3	37,6	1	1,6	14,7	0	11,3	0	0	19,4
			Verão	33,9	11,7	0	0	8,6	0	0	22,2	0,5	23,1
Si	Lauraceae	<i>Ocotea puberula</i>	Inverno	12,2	57,4	0,3	0	19,3	1	0	0	0	9,6
			Verão	17,5	59,7	0,6	0	3,4	0	0	0	12,5	6,3
Si	Asteraceae	<i>Piptocarpha regnelii</i>	Inverno	26,3	7,1	0,7	0,3	18,6	0,9	6,8	0	0	39,3
			Verão	11,8	59,2	3,4	1	1,2	5,1	0	7,9	0	10,3
Si	Rosaceae	<i>Prunus myrtifolia</i>	Inverno	29,1	19,7	0,8	0	28,4	8,3	10,4	0	0	3,3
			Verão	8,5	32,6	3,3	4,2	31,5	3,6	0	8	0	0,2
Si	Myrsinaceae	<i>Rapanea ferruginea</i>	Inverno	35,8	0	53,5	1,1	0	4,2	0	0	1	4,5
			Verão	21,3	0,9	0	8,8	0	3,7	0	1,2	36,5	7,5

**Tabela 4.** (Continuação)

Si	Myrsinaceae	<i>Rapanea umbellata</i>	Inverno	43,3	0	16,9	2,3	0	22	0	0	0	15,6
			Verão	84,3	0,3	0	0	0	0	0	0	2,7	0
Si	Annonaceae	<i>Rollinia rugulosa</i>	Inverno	19,5	0	0	0	4,7	12,1	15,6	0	0	48,1
			Verão	34,9	0	1,6	0	4,1	12,5	0	23,6	0	23,4
Si	Symplocaceae	<i>Symplocus falcata</i>	Inverno	51,8	0	5,1	0	11,3	13,8	0	0	0	17,9
			Verão	37,4	0	3,2	12,6	0,2	8,8	0	19,4	0	18,4
St	Aquifoliaceae	<i>Ilex microdonta</i>	Inverno	45,3	17,8	11,9	0,6	0	17,9	0	0	0,1	6,4
			Verão	10,9	0,9	32,3	8,7	0,2	0	0	6,7	36,9	9,1
St	Aquifoliaceae	<i>Ilex taubertiana</i>	Inverno	23,9	16,3	9,2	1,1	0	8,5	0	22,5	0	18,4
			Verão	7,9	0,5	18,8	12,4	0	0,4	0	6,8	47,9	5,4
St	Aquifoliaceae	<i>Ilex theezans</i>	Inverno	55,6	0,3	20,6	0,8	0	8,9	0	0	0	13,8
			Verão	12,8	9,7	0	19,9	1,6	0	0	3,1	43,2	9,8
St	Araucariaceae	<i>Araucaria angustifolia</i>	Inverno	9,5	0,1	45	11,9	11	5	0	0	0	17,4
			Verão	26,3	0	0	54,8	0	0	0	0	0	18,8
St	Winteraceae	<i>Drimys winterii</i>	Inverno	15,1	0,1	35,8	10,1	6,3	0	27,4	0	0	5,1
			Verão	38,4	0,2	0	22,3	0	0	0	5,7	0	33,3
St	Lauraceae	<i>Ocotea dispersa</i>	Inverno	51,7	19,1	2	0	8,5	1,8	0	0	0	16,8
			Verão	37,8	37,9	4,6	0	5,1	0	0	0	0	14,6
St	Podocarpaceae	<i>Podocarpus lambertii</i>	Inverno	31,4	15,5	1,7	0	43,4	6,8	0	0	0	1,2
			Verão	13,4	12,9	0,4	0	37,1	0	0	19,6	0	16,6

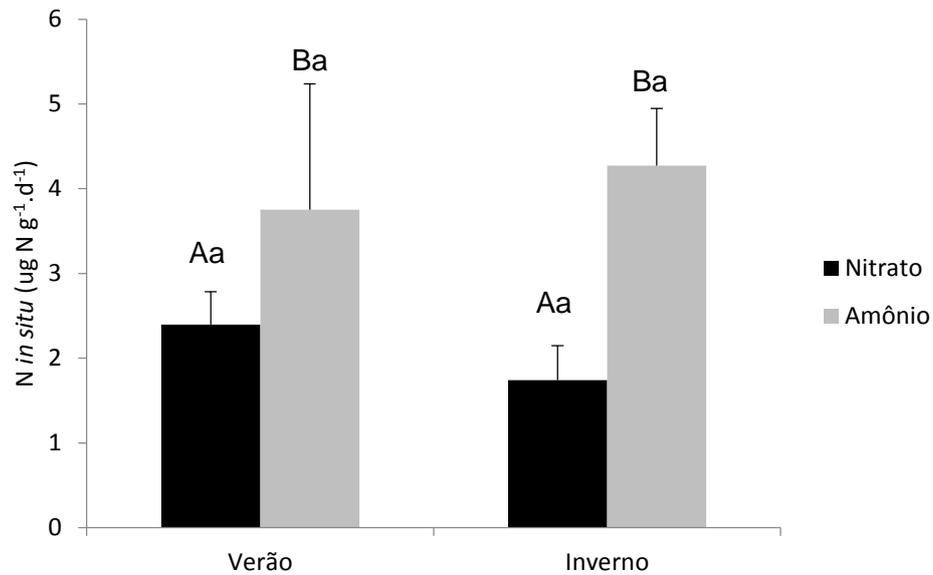
## 4.2. Nitrogênio *in situ*

Na avaliação de nitrogênio *in situ* observou-se uma maior quantidade de amônio disponível em relação ao nitrato em ambas as estações (Figura 7). Ressalta-se também que a quantidade de amônio no solo foi similar tanto no verão quanto no inverno ( $p > 0,05$ ), o mesmo para o nitrato, com uma leve tendência a maior concentração no solo durante o verão.

A maior concentração de amônio em relação ao nitrato em solos de mata atlântica, também foi observada em outros trabalhos em diferentes fisionomias (Campos, 2009, Pereira-Silva, 2009 e Silva, 2012). As baixas quantidades de nitrato foram relacionadas por Pereira-Silva (2011) com a rápida assimilação deste composto pelas plantas, além das frequentes perdas por lixiviação, uma vez que o nitrato torna-se muito móvel no solo.

A ausência ou baixos valores de precipitação durante os períodos de coleta e também nos períodos imediatamente anteriores a coleta (Figura 4A) podem ter contribuído para as baixas concentrações de nitrato encontradas, logo que, para ocorrer à adsorção dos íons presentes no solo pela resina, é necessária uma fase móvel. Além disto, como verificado em Pereira-Silva (2008), a falta de precipitação prejudica o processo de mineralização que leva em média duas semanas para ocorrer.

Por outro lado, o predomínio do íon amônio sobre o nitrato corroboram os resultados obtidos em Floresta Ombrófila Densa Submontana por Pereira-Silva (2008), onde acompanhou a disponibilidade de N mineral no solo durante oito semanas e observou um valor de amônio, em média, nove vezes superior à concentração de nitrato.



**Figura 7:** Nitrato e amônio in situ ( $\text{ug N/g}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) no verão e inverno. Letras maiúsculas indicam diferença para análises entre as concentrações de amônio e nitrato em uma mesma estação para teste T. Letras minúsculas indicam significância para análises entre as concentrações de amônio e nitrato entre estações para teste T. Foram consideradas diferenças significativas para  $p < 0,05$ .

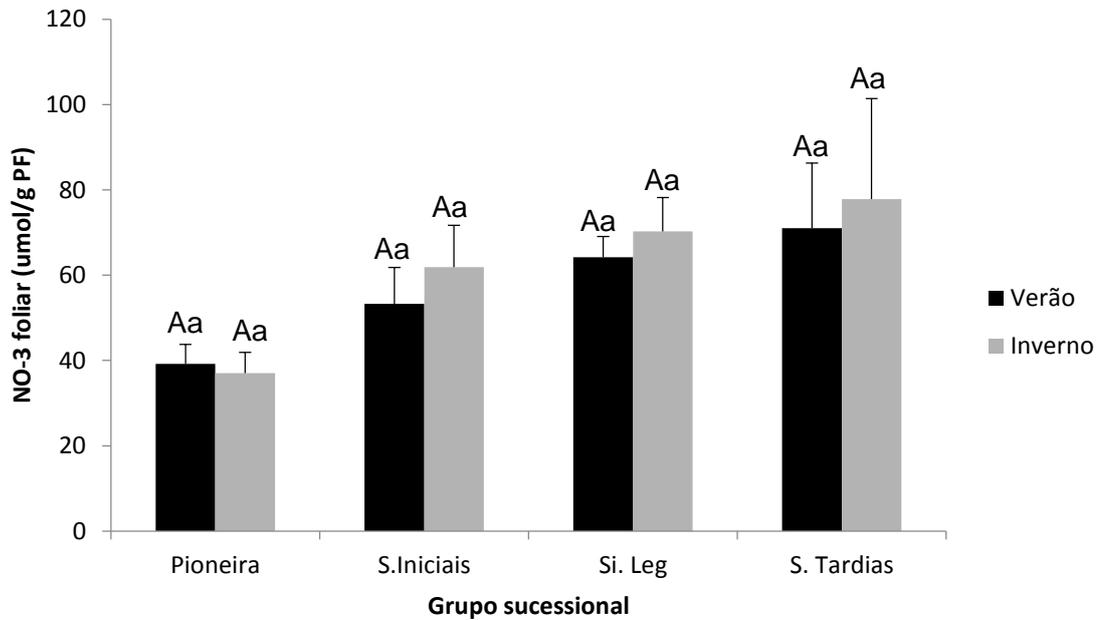
### 4.3. Caracterização de uso de nitrogênio com base nos grupos sucessionais

A caracterização das estratégias de uso de nitrogênio foi feita de acordo com a classificação das espécies com base na bibliografia citada. Serão apresentados os resultados para o grupo das pioneiras (P), secundárias tardias (St) e para secundárias iniciais foi feita uma divisão em secundárias iniciais não leguminosas (Si) e secundárias iniciais leguminosas (Si Leg), visto que espécies leguminosas demonstram comportamento diferenciado e característico quando comparadas as demais secundárias iniciais.

Para o conteúdo de nitrato foliar (Figura 8), não houve uma diferença significativa entre os grupos de regeneração nem entre estações para um mesmo grupo ( $p < 0,05$ ). Considerado então, um parâmetro pouco informativo para a comparação das estratégias de uso de nitrogênio.

As plantas pioneiras apresentaram a menor média de concentração de nitrato foliar comparada com os demais grupos ecológicos ( $39,2 \pm 4,6 \mu\text{mol.g PF}^{-1}$ , e  $37 \pm 4,9 \mu\text{mol.g PF}^{-1}$ ), divergindo do esperado. Porém tal fato pode estar ligado à intensa atividade da enzima nitrato redutase que rapidamente reduz o nitrato foliar em espécies pioneiras. Os resultados de ANR e nitrato na seiva serão discutidos logo abaixo.

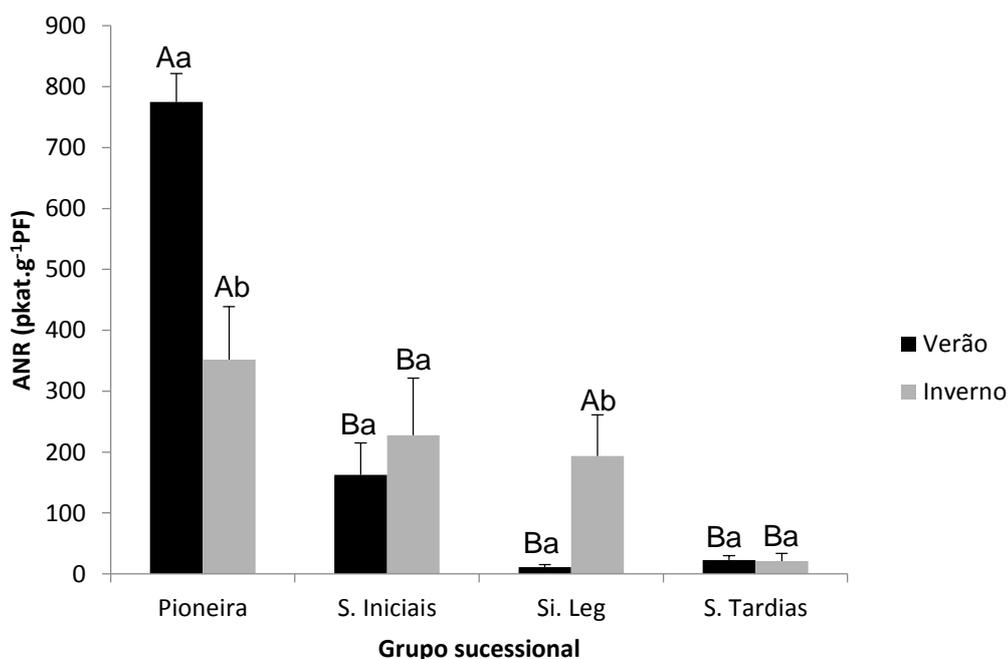
O grupo das secundárias tardias demonstrou maior acúmulo entre os grupos sucessionais. Apresentou maior concentração no inverno ( $72,73 \mu\text{mol. g PF}^{-1}$ ) do que no verão ( $55,06 \mu\text{mol. g PF}^{-1}$ ), porém sem diferença significativa ( $p < 0,05$ ). O grande acúmulo torna-se questionável, uma vez que o nitrato não é a principal forma nutricional de nitrogênio utilizado pelas secundárias tardias, portanto o alto acúmulo de nitrato no inverno pode relacionar-se com outras funções metabólicas para esse composto como a aclimação ao frio e também como osmorregulador na folha (Smirnoff *et. al*, 1984).



**Figura 8:** Conteúdo de nitrato foliar ( $\mu\text{mol.g PF}^{-1}$ ) por grupos ecológicos (Pioneira, Secundária inicial (S inicial), Leguminosas Secundárias iniciais (Si Leg) e Secundária tardia (S tardia)) no verão e inverno. Letras maiúsculas indicam significância para análises entre grupos ecológicos em uma mesma estação para teste de Tukey. Letras minúsculas indicam significância para análises entre estações para um mesmo grupo para teste T. Foram consideradas diferenças significativas para  $p < 0,05$ .

Diferente do esperado para espécies pioneiras, os maiores níveis de nitrato foliar das espécies secundárias iniciais e tardias não estão relacionadas à atividade da enzima nitrato redutase (ANR), uma vez que os resultados obtidos para esses grupos apresentam baixa atividade em relação quando comparadas à espécie pioneira. Entre os grupos ecológicos, houve diferença significativamente grande para a ANR da espécie pioneira sobre os demais em ambas as estações, com exceção para o grupo das secundárias iniciais leguminosas durante o inverno. Os demais grupos não apresentaram diferença entre si, a não ser uma leve tendência a maior atividade de secundárias iniciais sobre as tardias tanto no verão quanto no inverno (Figura 9).

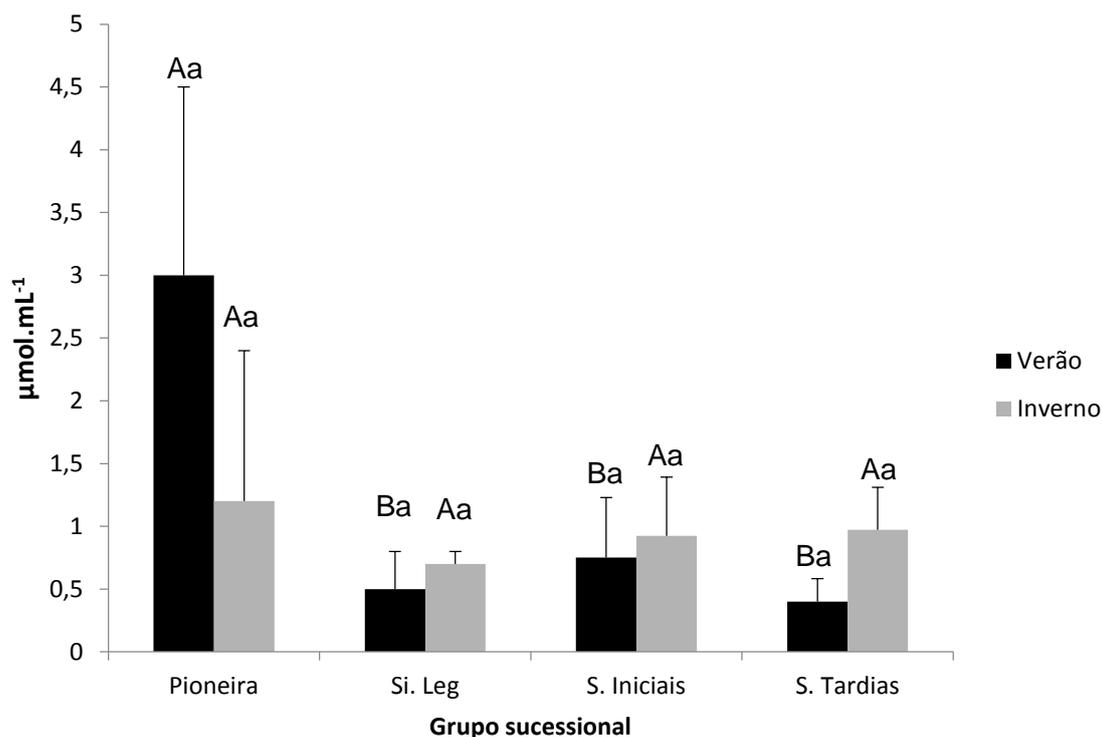
Os dados obtidos deixam evidentes as distintas estratégias de uso de nitrogênio entre os grupos ecológicos, especialmente na assimilação de nitrato foliar, quesito no qual espécies pioneiras são especialistas (Aidar, *et.al*, 2003). Já espécies tardias, provavelmente tem o amônio como fonte primária de nitrogênio, sendo assimilado pelas raízes, portanto baixa capacidade de assimilação de nitrato nas folhas (Smith & Rice 1983). Espécies tardias ainda fazem a reciclagem interna de nitrogênio, fato que será discutido abaixo.



**Figura 9:** Atividade da enzima nitrato redutase foliar – ANR ( $\text{pkat.g}^{-1}\text{PF}^{-1}$ ) por grupos ecológicos (Pioneira (P), Secundária inicial (Si), Leguminosas Secundárias Iniciais (Si Leg) e Secundária tardia (St)) no verão e inverno. Letras maiúsculas indicam significância para análises entre grupos ecológicos em uma mesma estação para teste de Tukey. Letras minúsculas indicam significância para análises entre estações para um mesmo grupo sucessional para teste T. Foram consideradas diferenças significativas para  $p < 0,05$ .

O conteúdo de nitrato presente na seiva (Figura 10) apresentou diferença significativa apenas na coleta realizada durante o verão, quando a espécie pioneira apresentou diferença entre os demais grupos sucessionais, porém, no inverno com a diminuição de nitrato no xilema das espécies pioneiras esta diferença não foi constatada, nem mesmo entre os demais grupos sucessionais.

Entre as estações de coleta para um mesmo grupo não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) só foi possível constatar um leve aumento de nitrato na seiva de espécies pioneiras durante o verão e para os demais grupos uma tendência a maior presença de nitrato na seiva durante o inverno.



**Figura 10.** Conteúdo de nitrato na seiva do xilema ( $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ ) por grupos ecológicos (Pioneira (P), Secundária inicial (Si), Leguminosas Secundárias Iniciais (Si Leg) e Secundária tardia (St)) no verão e inverno. Letras maiúsculas indicam significância para análises entre grupos ecológicos em uma mesma estação para teste de Tukey. Letras minúsculas indicam significância para análises entre estações em um mesmo grupo para teste T. Foram consideradas diferenças significativas para  $p < 0,05$ .

A alta concentração de nitrato na seiva observada na espécie pioneira no verão vão de acordo com o proposto no modelo de Aidar *et al.* (2003), que estabelece um gradiente da presença deste íon que vai de uma maior concentração para espécies pioneiras e diminuindo até baixas concentrações para espécies tardias.

No verão, a alta taxa pluviométrica juntamente com o acúmulo de matéria orgânica no solo proporciona um ambiente ideal para a mineralização e disponibilidade de nitrato no solo (Logde *et al.*, 1994). Tal fato torna-se de extrema importância para a maior absorção deste íon pelas plantas pioneiras, especialistas no transporte e utilização de nitrato (Aidar *et al.*, 2003). Portanto, apesar de não ser demonstrada diferença estatística, justifica-se o maior acúmulo de nitrato na estação chuvosa pela espécie pioneira, diferente dos demais grupos, tendenciosos a maior acúmulo no inverno.

Para os demais grupos, diferentes fatores podem influenciar a concentração de nutrientes na seiva destas plantas (Dambrine *et al.*, 1995) como, fenologia, disponibilidade de

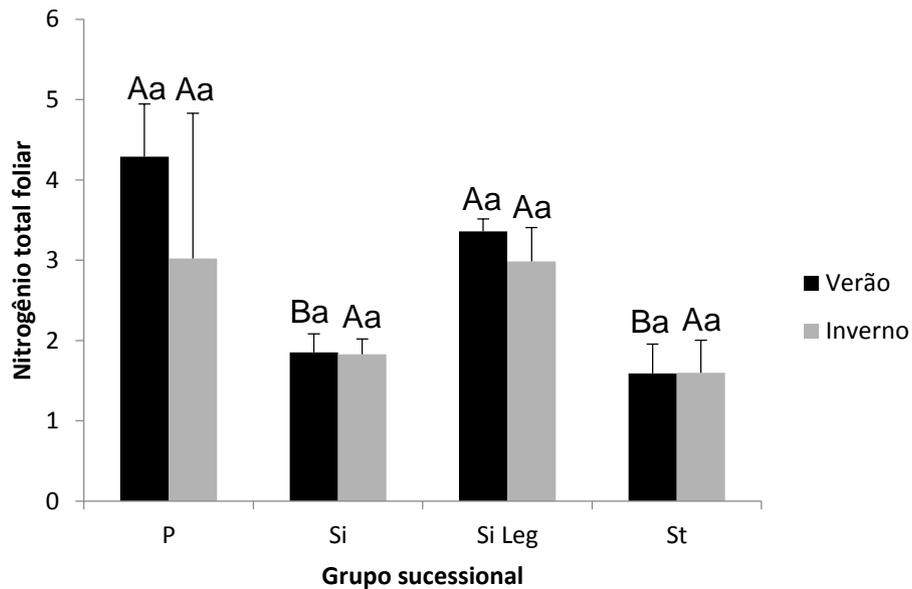
nutrientes e aumento e queda de temperaturas. As temperaturas durante a coleta na FOM de Campos do Jordão foram muito baixas, fato que reduz a taxa transpiratória das plantas exigindo, portanto, menor quantidade de água e mantendo a seiva menos diluída, aumentando, então, a taxa de concentração de moléculas, o que pode justificar a leve tendência ao aumento de nitrato na seiva de espécies secundárias iniciais não leguminosas, leguminosas e secundárias tardias (Ferguson *et al*, 1982).

O alto conteúdo de nitrato para a espécie pioneira no verão, também justifica a alta atividade de nitrato redutase observada, assim como o baixo conteúdo de nitrato foliar, uma vez que a enzima apresenta alto desempenho para estas espécies, o nitrato proveniente da seiva que chega às folhas é rapidamente utilizado pela enzima e acaba exibindo baixos valores para nitrato foliar.

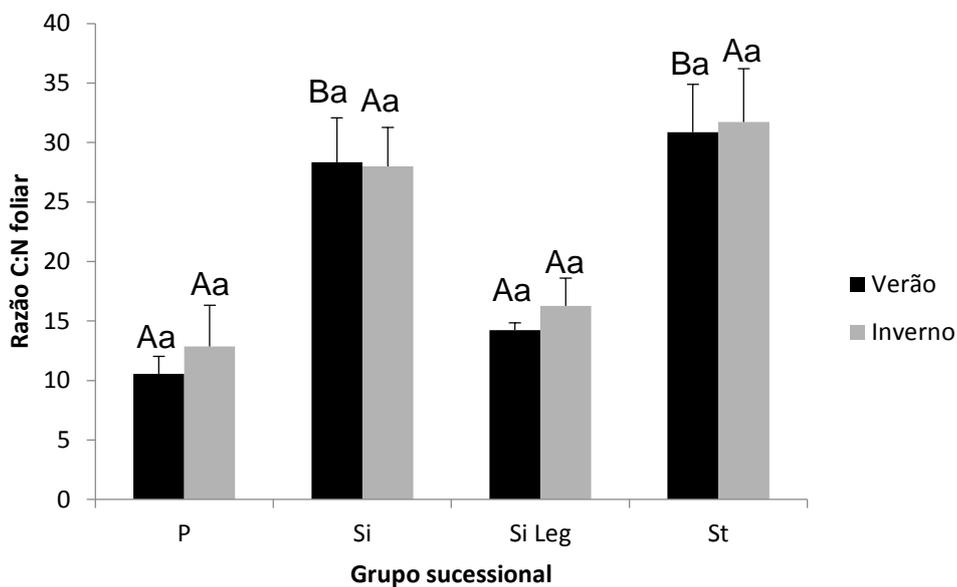
Para resultados de nitrogênio total foliar (NTF), a espécie pioneira diferenciou-se somente no verão de espécies secundárias iniciais e secundárias tardias. Não houve diferença entre grupos durante o inverno e também entre estações para um mesmo grupo (Figura 11).

As espécies secundárias tardias apresentaram a menor média de nitrogênio total foliar (média 1,6) em relação aos demais grupos, o que vai de acordo com o estabelecido no modelo de uso de nitrogênio de Aidar *et al* (2003). Os maiores valores de NTF foram observados em espécies pioneiras e secundárias iniciais leguminosas (médias 4,3 e 3,3 respectivamente).

Consequentemente, para grupos com maior NTF obtém-se uma pequena razão carbono:nitrogênio (C:N), uma vez que o acúmulo de nitrogênio passa a ser maior em proporção ao conteúdo total de carbono presente na folha. Os valores de C:N estão totalmente de acordo com os de NTF, uma vez que os grupos os quais apresentaram maior e menor NTF (Pioneiras e secundárias tardias, respectivamente) demonstraram justamente o inverso na proporção carbono: nitrogênio, apresentando também uma diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) para o teste de Tukey. (Figura 12).



**Figura 11.** Nitrogênio foliar total (%) por grupos ecológicos (Pioneira (P), Secundária inicial (Si), Leguminosas Secundárias Iniciais (Si Leg) e Secundária tardia (St)) no verão e inverno. Letras maiúsculas indicam significância para análises entre grupos ecológicos em uma mesma estação para teste de Tukey. Letras minúsculas indicam significância para análises entre estações em um mesmo grupo para teste T. Foram consideradas diferenças significativas para  $p < 0,05$ .

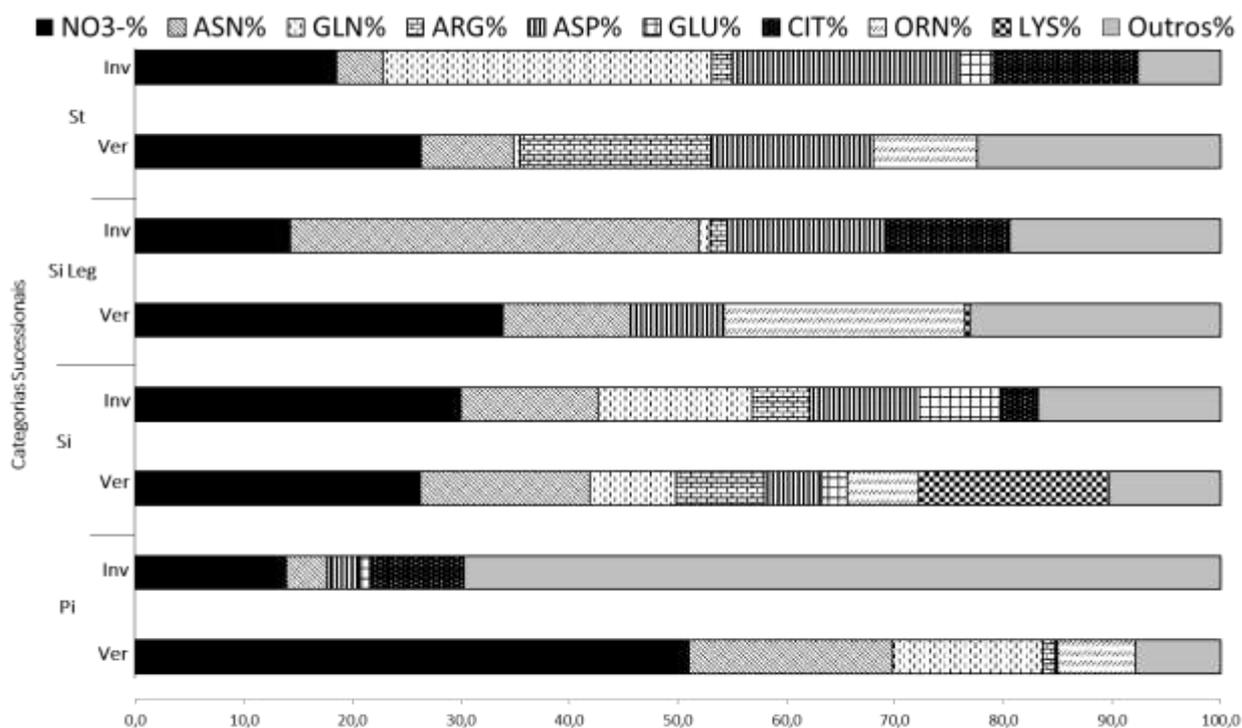


**Figura 12.** Razão C:N foliar por grupos ecológicos (Pioneira (P), Secundária inicial (Si), Secundária tardia (St)) no verão e inverno. Letras maiúsculas indicam significância para análises entre grupos ecológicos em uma mesma estação para teste de Tukey. Letras minúsculas indicam significância para análises entre estações em um mesmo grupo para teste T. Foram consideradas diferenças significativas para  $p < 0,05$ .

A proporção de compostos nitrogenados de baixo peso molecular encontrados em cada categoria sucessional (Figura 13), corroborou o modelo proposto por Aidar *et al.* (2003). Como dito anteriormente, As altas taxas de nitrato na seiva observada na espécie pioneira no verão vão de acordo com o proposto no modelo de Aidar et al. (2003), onde é estabelecido um gradiente da presença deste íon que vai de uma maior concentração para espécies pioneiras e menores concentrações em secundárias iniciais e menores ainda em secundárias tardias. Após a análise isolada de cada aminoácido, foi possível observar a diferença de St para SiLeg e P para asparagina, conteúdo de glutamina em Si Leg diferente dos demais grupos, a diferença de St para SiLeg e P para arginina, Pi e SiLeg diferentes quanto o conteúdo de ornitina e lisina apresentando diferença entre Si dos demais grupos. O aminoácido mais abundante foi a asparagina (ASN), que apresentou média de 21,3% em Pi, 19,2% em Si, 30,8% em SiLeg e 8,3% em St. Glutamina (GLN) apresentou a segunda maior concentração média com 14,4% em Pi, 15,4% em Si e 19% em St. O aspartato (ASP) foi melhor representado na seiva de SiLeg e St (15,1% e 23%, respectivamente) e ARG nas seiva de SiLeg (9%) e principalmente em St (13%). Ornitina (ORN) e lisina (LYS) foram basicamente exclusivos de SiLeg (33,6% - verão) e Si (22,9% - verão), respectivamente. O alto valor de 81% de “outros aminoácidos” para Pi no inverno se deve a alta quantidade de prolina (71,7%) encontrado na seiva de *Solanum pseudoquina*.

GLN e ASN atuam conjuntamente com GLU e ASP e são fundamentais na exportação e distribuição de N pela planta por serem precursores de famílias de aminoácidos proteicos e de importantes compostos nitrogenados, como a clorofila, ácidos nucleicos e poliaminas (Taiz & Zeiger, 2008).

A ARG é um importante aminoácido de reserva de N (Ribeiro, 2012) e, além disso, sua presença na seiva do xilema reflete um maior armazenamento interno e remobilização de nitrogênio no verão e armazenamento no inverno, caracterizando uma estratégia de reciclagem interna de nitrogênio (Aidar *et al.*, 2003, Couturier *et al.*, 2010, Müntz, 1998, Kolb & Evans, 2002). Tal fato é observado nas espécies secundárias tardias que apresentam as maiores taxas de ARG na seiva do xilema. Tal comportamento era esperado e está de acordo com os resultados obtidos em Aidar *et al.* (2003), Pereira-Silva (2008), Campos (2009), Marchiori (2012), Ribeiro (2012) e Silva (2012) para as plantas desta classe sucessional.

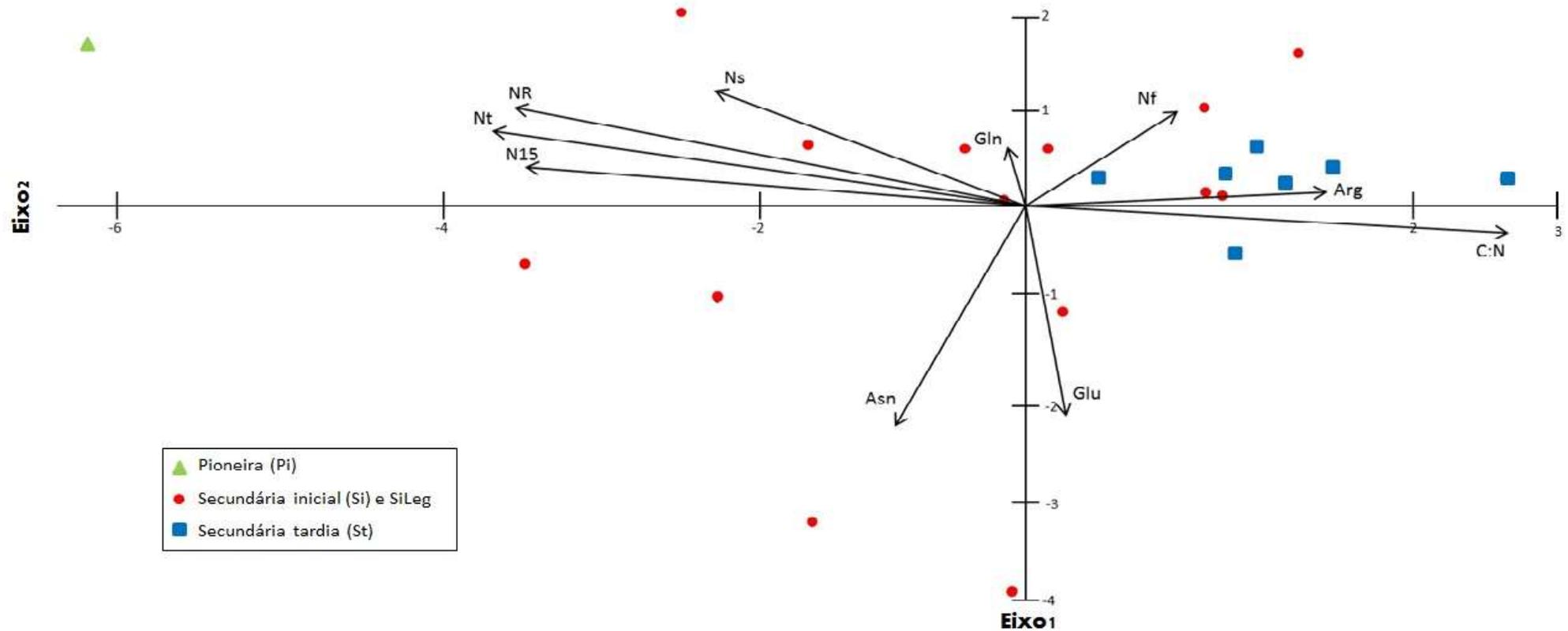


**Figura 13.** Proporção de compostos nitrogenados de baixo peso molecular presentes da seiva do xilema nos indivíduos pertencentes a diferentes categorias sucessionais em duas estações do ano. Dentre as categorias sucessionais: St – Secundária tardia; SiLeg – Secundária inicial leguminosa; Si – Secundária Inicial e Pi – Pioneira;  $\text{NO}_3^-$  - Nitrato Aminoácidos: ASN – Asparagina; GLN – Glutamina; ARG – Arginina; ASP – Aspartato; GLU – Glutamato; CIT – Citrulina; ORN – Ornitina e LYS – Lisina.

#### 4.4. Análise de ordenação

Foram selecionadas 11 variáveis de acordo com sua importância no metabolismo de uso do N para ordenar as espécies dentro das suas diferentes estratégias de regeneração, através de uma análise de componentes principais (“Principal Component Analysis” - PCA). A matriz de correlação da PCA foi computada a partir dos valores transformados em log10, para a estação do verão.

A análise dos resultados obtidos no verão (Figura 14) teve 45,76% da variância explicada e mostrou uma tendência à separação entre as classes de espécies definidas de acordo com a estratégia de regeneração, mais claramente entre as espécies Pi e St com relação ao primeiro eixo da PCA. Já as espécies secundárias iniciais apresentaram uma distribuição mais heterogênea quanto ao uso do N, com espécies se aproximando das Pi e outras mais próximas a St. No geral, as variáveis que melhor descrevem as espécies pioneiras no verão são ANR, Ntt e Ns. Por outro lado, as espécies secundárias tardias são melhor descritas pelas variáveis C:N e %ARG. Para espécies secundárias iniciais muitas são as variáveis que se mostram importantes (Ns, Nf, %GLN, %ASN, %GLN e C:N) caracterizando a heterogeneidade do grupo como mencionado anteriormente.



**Figura 14.** Ordenação (PCA) das 22 espécies estudadas na Floresta Ombrófila Mista de Campos do Jordão e suas diferentes estratégias de regeneração (Pi, Si e St), baseada nos valores de 11 variáveis avaliadas no inverno, sendo: Nt - % de N na folha, C:N – razão carbono/nitrogênio na folha, Ns - % de N na seiva do xilema sob a forma de nitrato, Nr – atividade da enzima nitrato redutase, Arg – % de N na seiva do xilema sob a forma de arginina, Asn – % de N na seiva do xilema sob a forma de asparagina, Glu - % de N na seiva do xilema sob forma de glutamato, Gln - % de N na seiva do xilema sob forma de glicina e  $\delta^{15}\text{N}$  – assinatura isotópica de  $^{15}\text{N}$  na folha.

#### 4.5. Caracterização de uso de nitrogênio das espécies selecionadas

Serão apresentadas as características de uso de nitrogênio para cada espécie selecionada no estudo. As espécies estão agrupadas por família e será caracterizada a presença e uso de nitrato na folha, forma de transporte de aminoácidos e nitrato via xilema, abundância natural de  $\delta^{15}\text{N}$  foliar, razão C:N foliar e N foliar total.

Em proposta para facilitar a comparação entre alguns parâmetros avaliados, as variáveis estudadas foram divididas em classes de acordo com a distribuição nos resultados obtidos (Tabela 5). A composição de aminoácidos e nitrato da seiva de cada espécie será expressa em porcentagem de acordo com a somatória de ambos.

**Tabela 5:** Classes de valores para os parâmetros analisados nas espécies arbóreas quanto ao uso de nitrato: ANR – atividade da enzima nitrato redutase foliar,  $\text{NO}_3^-$  Foliar – conteúdo de nitrato na folha,  $\text{NO}_3^-$  Seiva – conteúdo de nitrato na seiva do xilema,  $\delta^{15}\text{N}$  Foliar – abundância natural do nitrogênio estável na folha ( $^{15}\text{N}$ ),  $\text{N}_{\text{tt}}$  Foliar – porcentagem de nitrogênio foliar total, C:N – razão do carbono: nitrogênio presente na folha.

Variável	Unidade	Muito baixa	Baixa	Moderada	Alta	Muito alta
ANR	pKat.g PF <sup>-1</sup>	≤ 30	30 < x ≤ 50	50 < x ≤ 150	150 < x ≤ 300	> 300
$\text{NO}_3^-$ Foliar	μmol.g PF <sup>-1</sup>	≤ 20	20 < x ≤ 60	60 < x ≤ 90	90 < x ≤ 110	> 110
$\delta^{15}\text{N}$ Foliar	‰	≤ 1,0	1,0 < x ≤ 2,0	2,0 < x ≤ 3,0	3,0 < x ≤ 4,0	> 4,0
$\text{N}_{\text{tt}}$ Foliar	%	≤ 1,0	1 < x ≤ 2	2 < x ≤ 3	3 < x ≤ 4	> 4,0
C:N	-	≤ 10	10 < x ≤ 20	20 < x ≤ 30	30 < x ≤ 40	> 40

## Annonaceae

A espécie *Rollinia rugulosa* apresentou alta atividade da enzima nitrato redutase tanto no verão quanto no inverno, sendo que no período seco, demonstrou uma atividade bem superior ( $761,3 \pm 63,2$  pKat.g PF<sup>-1</sup>) que no período chuvoso ( $429,8 \pm 62,7$  pKat.g PF<sup>-1</sup>). O conteúdo de nitrato na folha, foi semelhante entre as duas estações ( $64,7 \pm 9,8$  μmol.g PF<sup>-1</sup> – verão e  $70,6 \pm 8,7$  μmol.g PF<sup>-1</sup> – inverno).

A taxa de nitrogênio total foliar apresentou valores altos, semelhante àqueles de espécies pioneiras e secundárias iniciais leguminosas ( $2,8 \pm 0,2$  – verão e  $2,6 \pm 0,3$  – inverno). Consequentemente, a razão C:N demonstrou baixos valores para ambas estações sendo  $15,9 \pm 1,4$  para o verão e  $16,9 \pm 1,8$  para o inverno e o δ<sup>15</sup>N apresentando moderada quantidade no verão ( $1,5 \pm 0,6\%$ ) e baixa para o inverno ( $-0,75 \pm 0,5\%$ ).

A porcentagem de nitrato transportado na seiva prevaleceu sobre os demais aminoácidos apresentando 19,5% do nitrogênio transportado no inverno e chegando a 34,9% no verão. Os principais aminoácidos na seiva responsáveis pelo transporte de nitrogênio foram a ornitina (ORN) no verão (23,6%) e a citrulina (CIT) no inverno (15,6%).

Quando avaliada apenas a ANR, a espécie *Rollinia rugulosa* não corresponderia à classificação indicada em bibliografia (Araujo *et al* 2010, Gomes, G.C. 2009) que seria de secundária inicial. Porém, as medianas taxas de nitrato foliar, porcentagem de nitrato na seiva e citrulina e ornitina realizando a maior parte do transporte por aminoácidos correspondem com o indicado em literatura.

Espécies secundárias iniciais formam o intervalo de respostas entre pioneiras e secundárias tardias no *continuum* demonstrado no modelo de uso de nitrogênio de Aidar, *et al* (2003), portanto espécies secundárias iniciais como *Rollinia rugulosa* em um primeiro momento podem apresentar características similares as espécies pioneiras como alta atividade de nitrato redutase durante ambas estações.

O que se torna atípico ao modelo de uso de nitrogênio é a alta atividade da enzima no inverno quando comparada ao verão em uma espécie secundária inicial. O mesmo foi observado por Marchiori (2012) e Ribeiro (2012) em Floresta Ombrófila Densa Montana e conclui-se que esta divergência ao modelo ocorreu em regiões com invernos rigorosos. Portanto, esta alta atividade pode estar mais relacionada com a aclimação ao frio do que nutricional como demonstrado por Zhao *et.al.* (2009) e Cantrel (2011) para *Arabidopsis thaliana*. As baixas temperaturas observadas no inverno da Floresta Ombrófila Mista é um fator que resulta na aclimação das espécies ali presentes, indicado por um aumento acentuado na produção de NO endógeno nas folhas (Gupta *et al.* 2011) destas espécies. Esta produção de NO ocorre via nitrato redutase, portanto, além da redução do nitrato a enzima

também atua em uma via alternativa para produção de NO que acaba levando a altos valores de atividade como o observado para *Rollinia rugulosa* no inverno ( $761,3 \pm 63,2$  pKat.g PF<sup>-1</sup>) e em outras espécies da FOM.

### **Aquifoliaceae**

*Ilex microdonta* apresentou atividade muito baixa de NR para o verão e uma baixa atividade para o inverno ( $20,2 \pm 11,5$  pKat.g PF<sup>-1</sup> – verão e  $37,4 \pm 23,4$  pKat.g PF<sup>-1</sup> - inverno). Apresentou altos níveis de nitrato foliar para o verão ( $93,1 \pm 26,8$  μmol.g PF<sup>-1</sup>) e quantidade moderada no inverno ( $77,9 \pm 22,8$  μmol.g PF<sup>-1</sup>). Quanto ao nitrogênio total foliar os valores para ambas estações foram baixos ( $1,5 \pm 0,4$  – verão e  $1,7 \pm 0,1$  – inverno) o que levou a valores medianos para a razão C:N, sendo que o verão apresentou um pequeno aumento e já passa a ser considerada uma razão ( $34,8 \pm 9,6$  – verão e  $26,6 \pm 2,4$  – inverno). Para o δ<sup>15</sup>N observaram-se resultados muito baixos em ambas as estações, chegando a apresentar valores negativos ( $-1,1 \pm 0,5\%$  – verão e  $-2,6 \pm 1,2\%$  – inverno).

No verão, os aminoácidos lisina (LYS) e glutamina (GLN) juntos somam 68,9% dos compostos nitrogenados de baixo peso molecular da seiva, sendo 36,9% de lisina e 32,3% de glutamina e logo em seguida encontramos o nitrato compondo 10,9% do total dos compostos. Já no inverno observa-se basicamente a ausência de LYS (0,1%) e os compostos encontram-se mais bem distribuídos, destacando-se 45,3% de nitrato, 17,8% de ASN, 11,9% de GLN e 17,9% de GLU.

*Ilex taubertiana* também apresentou valores muito baixos de atividade de nitrato redutase, tanto para o verão ( $30,2 \pm 13,4$  pKat.g PF<sup>-1</sup>) como para o inverno ( $23,3 \pm 12,6$  pKat.g PF<sup>-1</sup>). Para nitrato foliar demonstrou quantidade moderada em ambas estações sendo  $82,5 \pm 1,1$  μmol.g PF<sup>-1</sup> para o verão e  $84 \pm 32$  μmol.g PF<sup>-1</sup> para o inverno. A razão C:N foi alta tanto na estação seca quanto na chuvosa ( $34,8 \pm 12,5$  – verão e  $33,1 \pm 11,1$  – inverno) e consequentemente baixos valores de nitrogênio total foliar foram obtidos ( $1,5 \pm 0,4\%$  – verão e  $1,5 \pm 0,4\%$  – inverno) sendo muito similares aos observados para *I. microdonta*. O δ<sup>15</sup>N foliar foi muito baixo em ambas épocas do ano, chegando a apresentar, também, valores negativos ( $-0,9 \pm 0,2\%$  – verão e  $-0,6 \pm 0,5\%$  – inverno).

Entre os compostos nitrogenados de baixo valor molecular encontrados na seiva do verão encontram-se LYS (47,9%), GLN (18,8%) e ARG (12,4%) assim como o composto NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (7,9%), esses também encontrados nas demais espécies pertencentes a esta família. A seiva do inverno apresenta-se bem distribuída em sua composição apresentando principalmente NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (23,9%), ORN (22,5%), ASN (16,3%), GLN (9,2%) e GLU (8,5%).

*Ilex theezans* apresentou valores mais altos de NR em ambas estações quando comparada com as duas outras espécies da família Aquifoliaceae, contudo, apenas o valor do inverno ( $61,8 \pm 25,1$  pKat.g PF<sup>-1</sup>) chegou a ser moderado e o do verão, assim como nas outras espécies, apresentou-se baixo ( $42,2 \pm 8,9$  pKat.g PF<sup>-1</sup>). O nitrato foliar observado para essa espécie está entre os maiores valores observados em todas espécies estudadas, chegando a  $95,2 \pm 10,8$   $\mu$ mol.g PF<sup>-1</sup> no verão e  $93,5 \pm 12$   $\mu$ mol.g PF<sup>-1</sup> no inverno. Os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  e nitrogênio total foliar foram ambos muito baixos ( $-1,6 \pm 0,7\text{‰}$  – verão e  $-1,8 \pm 0,8\text{‰}$  – inverno;  $1,1 \pm 0,1\%$  - verão e  $1,1 \pm 0,1\%$  – inverno, respectivamente), conseqüentemente o resultado obtido para a razão C:N torna-se muito alto ( $45,2 \pm 3,8$  – verão e  $44,2 \pm 3,6$  – inverno), sendo o maior valor observado no estudo para esse parâmetro.

Os principais aminoácidos encontrados na seiva foram LYS e ARG no verão (43,2% e 19,9%, respectivamente) e NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, GLN e GLU no inverno (55,6%, 20,6% e 8,9%, respectivamente).

As três espécies de Aquifoliaceae apresentaram, no geral, baixas atividades de nitrato redutase, porém, uma concentração elevada de nitrato na seiva principalmente no inverno, fato que pode estar relacionado às baixas temperaturas da época do ano, que induzem a uma menor taxa transpiratória (Ferguson *et al.* 1982) das espécies vegetais e proporcionam uma maior concentração de nutrientes na seiva e conseqüentemente altos níveis de nitrato foliar. Portanto são atribuídas outras funções metabólicas para o NO<sub>3</sub><sup>-</sup> acumulado nas folhas destas espécies, tal como a osmorregulação (Smirnoff & Stewart, 1984).

Como consequência das altas porcentagens de nitrato na seiva, o conteúdo de nitrato foliar também foi muito elevado nas espécies de Aquifoliaceae. Além do papel nutricional, o nitrato desempenha outras funções e em algumas espécies pode aparecer em grandes quantidades já que também desempenha um papel como sinalizador envolvido na conexão do metabolismo do nitrogênio da planta (Stitt, 1999) e um importante soluto na regulação do turgor (Loudet *et al.*, 2002).

As composições de aminoácidos da seiva dessas espécies se apresentaram muito semelhantes, tanto no verão quanto no inverno. Houve no verão predomínio de LYS e GLN para todas as espécies e no inverno presença comum de GLN e GLU. A presença de GLN em ambas as estações e em todas as espécies pode indicar que parte do nitrogênio está sendo assimilado nas raízes uma vez que esse aminoácido é relacionado a transportes de longa distância e o primeiro a ser formado no processo de assimilação, portanto um transportador mais simples e rápido (Stewart *et al.*, 1980; Lea & Mifflin, 1980).

Todas as três espécies foram previamente classificadas como secundárias tardias (Reginato & Goldenberg, 2007, Souza *et al.* 2012, Scheer *et al.* 2009). Os dados obtidos para

estas espécies reforçam a classificação mencionada acima logo que no âmbito do modelo de uso de nitrogênio de Aidar *et al.* 2003 esta espécie se enquadra como secundária tardia principalmente pela baixa atividade de NR e também por apresentarem quantidades razoáveis de ARG na seiva do xilema.

### **Araucariaceae**

A espécie *Araucaria angustifolia* demonstrou atividade muito baixa da enzima nitrato redutase em ambas as estações estudadas ( $24,2 \pm 0,9$  pKat.g PF<sup>-1</sup> – verão e  $10,1 \pm 5,5$  pKat.g PF<sup>-1</sup> – inverno). A baixa porcentagem de nitrato presente na seiva no verão (26,3%) e muito baixa no inverno (9,5%) levou também a baixo conteúdo de nitrato foliar ( $37,4 \pm 13,1$  μmol.g PF<sup>-1</sup> - verão e  $59,1 \pm 13,5$  μmol.g PF<sup>-1</sup> – inverno). Além dos 26,3% de nitrato compondo sua seiva, *A. angustifolia* apresentou no verão 54,8% de ARG como principal aminoácido presente em sua seiva e, no inverno, como principal aminoácido o GLN com 45% do total de compostos nitrogenados de baixo peso molecular e logo em seguida a ARG com 11,9%.

Ainda apresentou baixo conteúdo de nitrogênio total foliar e consequentemente altos valores da razão C:N ( $1,4 \pm 0,1\%$ - verão e  $1,3 \pm 0,1\%$  - inverno;  $33,5 \pm 2$  – verão e  $37,2 \pm 0,8$  – inverno, respectivamente). Para δ<sup>15</sup>N os valores foram muito baixos no verão ( $-0,9 \pm 0,4\%$ ) e no inverno ( $-1,3 \pm 0,8\%$ ).

*Araucaria angustifolia* é classificada de acordo com a bibliografia consultada (Catharino *et al.* 2006 e Marmontel *et al.* 2013) como uma espécie secundária tardia e os dados obtidos nas análises apresentadas reforçam a classificação apontada anteriormente e indicam que a espécie é uma secundária tardia no âmbito do modelo de uso de nitrogênio, sendo as principais características as baixas atividades de NR e a preferência pelo transporte de nitrogênio na forma de ARG.

O gênero *Araucaria* já esteve presente em outro trabalho desenvolvido por Ribeiro (2013) em uma Floresta Subtropical Úmida no Parque Nacional de Lamington em Queensland na Austrália. Tal fato permite a comparação entre as duas espécies: *Araucaria angustifolia* e *Araucaria cunninghami*. A espécie australiana apresentou atividade de nitrato redutase baixa em ambas as estações ( $3,36 \pm 0,5$  pKat.g PF<sup>-1</sup> – verão e  $6,71 \pm 2,62$  pKat.g PF<sup>-1</sup> – inverno) e também um conteúdo de 28% de arginina na composição da seiva no inverno e 30% no verão, mostrando grande semelhança com o perfil obtido destes parâmetros para a espécie brasileira (ANR =  $24,2 \pm 0,9$  pKat.g PF<sup>-1</sup> – verão e  $10,1 \pm 5,5$  pKat.g PF<sup>-1</sup> – inverno; ARG = 54,8% - verão e 11,9% - inverno). Como observado por Canton *et al.* (2005), a arginina é comumente encontrada em grandes porções nas reservas das sementes de coníferas, e logo após a germinação continua a acumular esse aminoácido na plântula, sugerindo, que a

arginina represente uma importante fonte de nitrogênio para a biossíntese de outros compostos nitrogenados neste grupo de plantas.

### **Asteraceae**

*Piptocarpha regnelii* apresentou ANR moderada no verão ( $68,3 \pm 31,7$  pKat.g PF<sup>-1</sup>) e muito alta no inverno ( $314,9 \pm 217,7$  pKat.g PF<sup>-1</sup>) com uma grande variação entre os indivíduos. Quanto ao nitrato foliar, o conteúdo foi baixo em ambas as coletas ( $35,2 \pm 1,1$  μmol.g PF<sup>-1</sup> – verão e  $34,5 \pm 2,2$  μmol.g PF<sup>-1</sup> - inverno) assim como o nitrogênio total foliar ( $1,5 \pm 0,2\%$  - verão e  $1,6 \pm 0,1$  – inverno). A razão C:N foi moderada tanto no verão ( $29,1 \pm 3,6$ ) quanto no inverno ( $27,3 \pm 1$ ) e os valores de δ<sup>15</sup>N foram muito baixos ( $0,3 \pm 0,6\%$  – verão e  $0,2 \pm 0,2\%$  – inverno). A seiva de *P. regnelii* no verão foi composta principalmente por 59,2% de ASN e 11,8% de nitrato. Já no inverno houve uma grande heterogeneidade na composição da seiva, sendo 26,3% de nitrato, 18,6% de ASP, 7,1% de ASN e 6,8% de CIT.

Assim como a espécie da família Annonaceae, *P. regnelii* apresentou uma atividade muito alta de nitrato redutase no inverno em comparação ao verão, chegando a um número que não seria esperado para espécies secundárias iniciais (Catharino *et al.* 2006). Tal fato contradiz o proposto para este grupo sucessional no modelo de uso de nitrogênio (Aidar *et al.* 2003) e também a época do ano em que se observaria uma maior atividade. Assim como descrito na família Annonaceae, a alta ANR poderia ser atribuída às baixas temperaturas que ocorrem durante o inverno na FOM, como sugerido por Ribeiro (2012) em situação muito semelhante para espécies da Floresta Ombrófila Densa Montana.

### **Bignoniaceae**

A espécie *Jacaranda puberula* apresentou resultados muito altos para ANR tanto no verão quanto no inverno ( $663,8 \pm 71$  pKat.g PF<sup>-1</sup> – verão e  $529,1 \pm 167,7$  pKat.g PF<sup>-1</sup> – inverno) e uma quantidade alta de nitrato foliar ( $101,7 \pm 20,9$  μmol.g PF<sup>-1</sup> – verão e  $102,2 \pm 21$  μmol.g PF<sup>-1</sup>). Quanto ao nitrato foliar, o resultado para o verão foi alto ( $3,1 \pm 0,5\%$ ) e moderado no inverno ( $2,3 \pm 0,4\%$ ), como consequência o C:N foi baixo no verão ( $16,1 \pm 2,6$ ) e moderado no inverno ( $21,2 \pm 3,8$ ). O δ<sup>15</sup>N foi muito baixo em ambas as estações ( $0,4 \pm 0,4\%$  – verão e  $-1,4 \pm 1\%$  – inverno).

O nitrato foi o principal composto nitrogenado de baixo peso molecular presente na seiva do xilema no verão com 63,5% do total, em seguida ORN foi o principal aminoácido com 29,9%. No inverno a situação foi semelhante, 58,7% de nitrato e 22,8% de CIT.

A espécie *Jacaranda puberula* é classificada como secundária inicial pela literatura consultada (Carvalho *et al.* 2006; Catharino *et al.* 2006; Dias *et al.* 1998) e os resultados obtidos para ANR, nitrato foliar e composição da seiva, reforçam a classificação mencionada

a cima e indicam que, no âmbito do modelo de uso de nitrogênio, a espécie é secundária inicial, sendo que esta espécie, no espectro do modelo, se enquadraria mais próxima às espécies pioneiras. Algumas características ecológicas também posicionam *J. puberula* próxima as espécies pioneiras, como o hábito heliófilo e a ocupação destas em áreas de clareiras e bordas (Lorenzi, 1992).

### **Dicksoniaceae**

*Dicksonia sellowiana* apresentou resultados baixo no verão ( $27,4 \pm 14,4$  pKat.g PF<sup>-1</sup>) e moderado no inverno ( $52 \pm 46,2$  pKat.g PF<sup>-1</sup>). O nitrato foliar foi baixo para ambas as estações ( $47,9 \pm 14,6$  μmol.g PF<sup>-1</sup> – verão e  $56,2 \pm 7,19$  μmol.g PF<sup>-1</sup> – inverno) e o nitrogênio total foliar foi moderada no verão ( $2,2 \pm 0,3\%$ ) e baixa no inverno ( $1,9 \pm 0,2\%$ ) e consequentemente a razão C:N foi moderada nas duas estações ( $20,4 \pm 2,8$  – verão e  $23 \pm 3,1$  – inverno). O δ<sup>15</sup>N foi baixo ( $-1,01 \pm 0,57\%$  – verão e  $1 \pm 0,4\%$  – inverno).

Por ser uma espécie de pteridófito e possuir estruturas de vasos diferente das gimnospermas e angiospermas (Lorenzi, 1992), a coleta de seiva de *D. sellowiana* foi prejudicada e não foi possível estabelecer a quantificação de nitrato e aminoácidos desta espécie.

Classificada como secundária inicial na literatura (Catharino *et al.* 2006), os dados coletados para *D. sellowiana* como as moderadas quantidades de nitrato foliar e atividade de nitrato redutase, corroboram o proposto para espécies deste grupo ecológico por Aidar *et al.* (2003).

### **Fabaceae**

*Mimosa scabrella* apresentou uma grande diferença na atividade de nitrato redutase, sendo muito baixa no verão e alta no inverno ( $10,9 \pm 4,3$  pKat.g PF<sup>-1</sup> e  $193,4 \pm 67,6$  pKat.g PF<sup>-1</sup>, respectivamente) já o conteúdo de nitrato foliar foi moderado tanto no verão ( $64,2 \pm 4,9$  μmol.g PF<sup>-1</sup>) quanto no inverno ( $70,3 \pm 7,9$  μmol.g PF<sup>-1</sup>). Quanto ao nitrogênio total foliar os resultados foram altos no verão e inverno ( $3,4 \pm 0,2\%$  e  $3 \pm 0,4$ , respectivamente) e como consequência os valores de C:N foram baixos também para o verão ( $14,2 \pm 0,6$ ) e inverno ( $16,3 \pm 2,3$ ). O δ<sup>15</sup>N foi considerado muito baixo para ambas as estações, apresentando valores de  $0,2 \pm 1,1\%$  no verão e  $0,5 \pm 0,4\%$  no inverno.

A quantidade de nitrato transportado na seiva do xilema foi de 33,9% no verão e 14,3% no inverno. Quanto aos aminoácidos, os principais foram ASN (11,7% - verão e 37,6% - inverno), ASP (8,6% - verão e 14,7% - inverno) e particularmente ORN no verão (22%) e CIT no inverno (11,3%).

A Floresta Ombrófila Mista de Campos do Jordão apresenta apenas esta espécie de leguminosa, logo que, segundo Gentry (1988), esta família tende a decrescer de riqueza conforme o aumento de altitude, levando a pouca representatividade desta família em florestas tropicais montanas, devido a baixas temperaturas.

*Mimosa scabrella* é classificada como secundária inicial (Siminski *et al.* 2010) e diferente do esperado para plantas nesta categoria, apresentou uma intrigante e elevada atividade de nitrato redutase no inverno, principalmente quando colocada frente à ANR de verão. Tal fato já ocorreu em Floresta Ombrófila Densa Montana (Marchiori, 2012) onde espécies secundárias iniciais de leguminosas como *Inga lanceifolia* ( $41 \pm 26$  pKat.g PF<sup>-1</sup> - verão e  $300 \pm 56$  pKat.g PF<sup>-1</sup> - inverno), *Inga marginata* ( $297 \pm 139$  pKat.g PF<sup>-1</sup> e  $566 \pm 155$  pKat.g PF<sup>-1</sup>) e *Inga sessilis* ( $8 \pm 12$  pKat.g PF<sup>-1</sup> - verão e  $112 \pm 120$  pKat.g PF<sup>-1</sup> - inverno) apresentaram atividade de nitrato redutase superior no inverno que no verão, assim como a espécie da FOM. Como descrito por Gupta *et al.* (2011) é bem provável que estas espécies também utilizem do mecanismo de produção de NO via nitrato redutase para proteção à baixa temperatura, aumentando assim a quantificação da enzima durante a análise.

*Mimosa scabrella* apresenta um dos valores mais altos de nitrogênio total foliar, o que se enquadra com o fato de espécies leguminosas possuírem um estilo de vida que requer grandes quantidades de nitrogênio (McKey, 1994). Tal fato já foi observado em outras florestas tropicais e sub-tropicais (Roggy *et al.* 1999, Aidar *et al.* 2003 e Vitousek *et al.* 2002).

ASN e ASP foram os principais aminoácidos na seiva do xilema e também aparecem para espécies leguminosas iniciais em outros trabalhos (Marchiori, 2012; Silva, 2012). Segundo Aidar *et al.* (2003), as leguminosas secundárias iniciais apresentam como um dos principais aminoácidos transportados a ASN, semelhante ao padrão observado nas secundárias tardias.

## **Lauraceae**

*Cinnamomum sellowiana* apresentou atividade de nitrato redutase muito baixa no verão e baixa no inverno ( $28 \pm 5,5$  pKat.g PF<sup>-1</sup> – verão e  $32,5 \pm 11,9$  pKat.g PF<sup>-1</sup> – inverno). Na folha, a quantidade de nitrato não apresentou diferença para as estações demonstrando valores baixos ( $37,2 \pm 4,2$  μmol.g PF<sup>-1</sup> – verão e  $39 \pm 6,2$  μmol.g PF<sup>-1</sup> – inverno) e o nitrogênio total também foi baixo tanto para o verão ( $1,6 \pm 0,1\%$ ) quanto para o inverno ( $1,8 \pm 0,2$ ) e conseqüentemente levando a um valor alto na razão C:N para o verão ( $31,6 \pm 2,5$ ) e moderado no inverno ( $29,6 \pm 2,3$ ). O δ<sup>15</sup>N foi muito baixo em ambas as estações ( $-2,8 \pm 0,1\%$  – verão e  $-2,9 \pm 0,4\%$  – inverno).

A seiva do verão é composta principalmente por nitrato (58,6%) e asparagina (21%). A situação se repete no inverno para o nitrato (58,4%), há uma queda em asparagina (8,6%) e aparecem ASP com 14,4% e GLN e GLU com 5,6%.

*Ocotea puberula* mostra alta atividade da NR no verão com grande variabilidade entre os indivíduos ( $290,8 \pm 240,3$  pKat.g PF<sup>-1</sup>), no inverno a atividade passa a muito alta e assim como no verão demonstra uma variação entre os indivíduos ( $467,2 \pm 236,5$  pKat.g PF<sup>-1</sup>). Na folha os resultados para o conteúdo de nitrato foram baixos ( $30,3 \pm 3,2$  μmol.g PF<sup>-1</sup> – verão e  $45,2 \pm 8,8$  μmol.g PF<sup>-1</sup> – inverno) e para nitrogênio total foliar a quantidade observada foi moderada no verão ( $2,8 \pm 0,3\%$ ) e muito alta no inverno ( $3,3 \pm 0,2\%$ ). O balanço C:N apresentou valores baixos ( $19,0 \pm 4,6$  – verão e  $16,1 \pm 3,1$  – inverno) e o δ<sup>15</sup>N mostrou valores muito baixos ( $-0,7 \pm 0,9\%$  – verão e  $-0,7 \pm 0,9\%$  – inverno).

O principal aminoácido responsável pelo transporte de nitrogênio na seiva é o ASN com 59,7% do total no verão e 57,4% no inverno. Em seguida observa-se 17,5% e 12,2% de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> no verão e no inverno, respectivamente. No verão ainda foi observado 12,5% de LYS na seiva e no inverno 19,3% de ASP.

*Ocotea dispersa* apresentou atividade de nitrato redutase muito baixa nas duas estações ( $14,1 \pm 9,75$  pKat.g PF<sup>-1</sup> – verão e  $25 \pm 14,1$  pKat.g PF<sup>-1</sup> – inverno), quantidade baixa de nitrato foliar no verão havendo um pequeno aumento para o inverno levando a uma quantidade moderada ( $55,7 \pm 26,6$  μmol.g PF<sup>-1</sup> – verão e  $69,4 \pm 31,7$  μmol.g PF<sup>-1</sup> – inverno). Não houve diferença na taxa de nitrogênio total foliar para ambas as estações ( $1,9 \pm 1,1\%$  - verão e  $2,1 \pm 1,2$  - inverno) apresentando resultados baixos e por consequência valores moderados na relação C:N ( $25,4 \pm 9,1$  – verão e  $25,4 \pm 6$  – inverno). O δ<sup>15</sup>N demonstrou valores muito baixos ( $-0,8 \pm 0,1\%$  – verão e  $-1,2 \pm 0,7\%$  – inverno).

Os principais compostos nitrogenados de baixo peso molecular transportado pelo xilema de *O. dispersa* no verão foram NO<sub>3</sub><sup>-</sup>(37,8%), ASN(37,9%) e ASP (5,1%) apresentando situação bem similar a composição no inverno (NO<sub>3</sub><sup>-</sup> – 51,7%; ASN – 19,1% e ASP – 8,5%).

*Cinnamomum sellowiana* e *Ocotea dispersa* apresentaram características muito similares, como a grande quantidade de nitrato na seiva, baixo nitrogênio total foliar e baixa atividade da enzima nitrato redutase. *C. sellowiana* é classificada como secundária inicial (Drezza, 2009) e de acordo com os dados observados para a atividade moderada/baixa de NR e a presença tanto de ASN quanto de nitrato na seiva, esses corroborariam o proposto por Aidar *et al.* (2003) para espécies secundárias iniciais. Já os dados obtidos para atividade de NR, composição da seiva e nitrogênio total foliar para *Ocotea dispersa*, vão de acordo com o obtido em literatura (Catharino *et al.* 2006) e corroboram o proposto para espécies secundárias tardias. A única exceção é em relação ao conteúdo de arginina que não esteve

presente na seiva de *O. dispersa*, sendo que a mesma situação foi observada por Silva (2012) e Marchiori (2012).

A elevada atividade de nitrato redutase e as altas taxas de nitrogênio total foliar no inverno em relação ao verão para *Ocotea puberula* chamaram atenção. Classificada como secundária inicial pela literatura (Catharino *et al.* 2006; Siminski *et al.* 2011; Araujo *et al.* 2010), os dados obtidos acabariam divergindo do proposto em 2003 por Aidar *et al.*, porém a justificativa seria a mesma utilizada para outras espécies secundárias iniciais já descritas, como *Rollinia rugulosa* e *Mimosa scabrella*. Esta alta atividade observada no inverno teria relação à função relacionada com a aclimação ao frio do que nutricional e acabaria por elevar também o conteúdo total de nitrogênio foliar (Zhao *et al.* 2009; Cantrel, 2011; Gupta *et al.* 2011).

A família Lauraceae é a segunda família mais importante da FOM de Campos do Jordão (Souza, 2008) e também está presente na Floresta Subtropical Úmida de Queensland na Austrália. No trabalho realizado por Ribeiro (2013) a espécie de Lauraceae estudada (*Cryptocarya obovata*) apresenta ecofisiologia bem semelhante ao observado para *Ocotea dispersa* neste trabalho e em outros trabalhos realizados pelo grupo (Silva, 2012 e Marchiori 2012). Nota-se outra comparação intercontinental que deixa em evidência a semelhança das duas florestas presentes em continentes distintos e remonta a hipótese de que os dois continentes estiveram unidos no passado, já que a família Lauraceae esta entre as angiospermas basais mais antigas e segundo Chanderbali *et al.* (2001), foi constatada a presença de linhagens basais desta família no supercontinente Gondwana.

### **Myrsinaceae**

*Rapanea ferruginea* apresentou de baixa a moderada atividade de nitrato redutase ( $43,2 \pm 31$  pKat.g PF<sup>-1</sup> – verão e  $50,8 \pm 31,2$  pKat.g PF<sup>-1</sup> - inverno) um conteúdo baixo de nitrato foliar em ambas as estações ( $51,6 \pm 13,5$  μmol.g PF<sup>-1</sup> – verão e  $58,5 \pm 21$  μmol.g PF<sup>-1</sup>- inverno) assim como o nitrogênio total foliar ( $2,0 \pm 0,2\%$  - verão e  $1,8 \pm 0,2\%$  - inverno). A razão C:N foi moderada e o δ<sup>15</sup>N foi muito baixo ( $25,1 \pm 2,6$  – verão e  $27,0 \pm 3,4$  – inverno;  $-1,2 \pm 1,8\%$  – verão e  $-1,1 \pm 1,5\%$  – inverno).

Quanto à composição da seiva, foi observado que no verão, o principal responsável pelo transporte foi a LYS com 36,5% do total de compostos nitrogenados de baixo peso molecular, seguida por 21,3% de nitrato e 8,8% de ARG. Já no inverno, o principal composto foi a GLN com 53,5% seguido de 35,8% de nitrato.

*Rapanea umbellata* por sua vez, apresentou ANR muito baixa nas duas estações ( $19,9 \pm 3,4$  pKat.g PF<sup>-1</sup> – verão e  $3 \pm 1,9$  pKat.g PF<sup>-1</sup> - inverno), conteúdo de nitrato foliar moderado

próximo a alto também nas duas estações ( $79,3 \pm 15,5 \mu\text{mol.g PF}^{-1}$  – verão e  $87,6 \pm 12,3 \mu\text{mol.g PF}^{-1}$  – inverno) e um baixo conteúdo de nitrogênio total foliar ( $1,6 \pm 0,2\%$  - verão e  $1,5 \pm 0,2\%$  - inverno) com razão C:N alta ( $31,3 \pm 3,5$  – verão e  $33,6 \pm 4,5$  – inverno). Os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  foram muito baixos ( $-1,8 \pm 0,5\text{‰}$  – verão e  $-2,1 \pm 0,7\text{‰}$  – inverno).

A seiva apresentou pouca heterogeneidade, sendo o principal componente da seiva do xilema para ambas as estações o nitrato ( $84,3\%$  - verão e  $43,3\%$  - inverno). Apenas no inverno foi observado  $16,9\%$  de GLN.

Os dados obtidos para *R. ferruginea* corroboram o proposto para espécies secundárias iniciais no modelo de uso de nitrogênio. A grande heterogeneidade observada na seiva desta espécie é um ótimo exemplo para mostrar que algumas características de secundárias iniciais podem parecer ora ligadas a espécies pioneiras ( $\text{NO}_3^- = 21,3\%$  - verão e  $35,8\%$  - inverno) ora a tardias ( $\text{ARG} = 21,3\%$  - verão).

Ambas as espécies são classificadas como secundárias iniciais (Catharino *et al.* 2006; Vaccaro *et al.* 1999; Dias *et al.* 1998) e desempenham ANR, conteúdo total de nitrogênio foliar e nitrato na seiva esperado para esse grupo de espécies conforme Aidar *et al.* (2003).

Foi observada uma divergência no conteúdo de nitrato foliar e a ANR para *R. umbellata*, visto que, pelas grandes quantidades de nitrato foliar, esperava-se uma maior atividade de nitrato redutase, porém, o nitrato pode ser implicado em outras funções metabólicas, como por exemplo a regulação de turgor (Loudet *et al.* 2002), podendo levar ao acúmulo deste composto na folha.

## Myrtaceae

*Gomidesia sellowiana* teve moderada atividade de nitrato redutase em ambas as estações ( $96,6 \pm 6,1 \text{ pKat.g PF}^{-1}$  – verão e  $114,7 \pm 45,1 \text{ pKat.g PF}^{-1}$  - inverno) e quanto ao conteúdo de nitrato apresentou baixas quantidades para o verão ( $25,4 \pm 2,3 \mu\text{mol.g PF}^{-1}$ ) como para o inverno ( $32,9 \pm 2,7 \mu\text{mol.g PF}^{-1}$ ). O  $\delta^{15}\text{N}$  demonstrou valores muito baixos ( $-2,6 \pm 0,3\text{‰}$  – verão e  $-3,3 \pm 0,6\text{‰}$  - inverno) e o nitrogênio total foliar baixos resultados para as duas estações ( $1,2 \pm 0,1\%$  - verão e  $1,2 \pm 0,1\%$  - inverno). Já o C:N, opostamente ao nitrogênio foliar, apresentou valores altos para ambas as estações,  $38,8 \pm 1$  no verão e  $39,5 \pm 3,8$  no inverno.

A composição da seiva de *G. sellowiana* no verão foi composta, principalmente por  $\text{NO}_3^-$  ( $61,7\%$ ) e de GLN ( $18,3\%$ ), situação semelhante ao inverno, que apresentou  $37,8\%$  de  $\text{NO}_3^-$  e  $5\%$  de GLN, porém também foram quantificados  $10,1\%$  de ARG,  $17,22\%$  de GLU e  $16,4\%$  de ASP.

A ANR de *Mirceugenia miersiana* no verão e inverno foram diferentes, sendo moderada no verão ( $71,1 \pm 77,4$  pKat.g PF<sup>-1</sup>) porém com um alto desvio padrão, o que interfere na interpretação desse parâmetro para o verão. No inverno a atividade da enzima apresentou resultado muito baixo ( $13,1 \pm 12,9$  pKat.g PF<sup>-1</sup>). O conteúdo de nitrato foliar variou de moderado no verão ( $36,6 \pm 5,2$  μmol.g PF<sup>-1</sup>) a alto no inverno ( $58,4 \pm 10,8$  μmol.g PF<sup>-1</sup>). Segundo Smirnoff & Stewart (1984), a presença de nitrato na folha não está exclusivamente sujeita a redução pela enzima nitrato redutase, podendo estar apresentando outras funções metabólicas na planta.

*M. miersiana* apresentou resultados de δ<sup>15</sup>N, nitrogênio total foliar e C:N semelhante à espécie anterior, sendo esses, valores muito baixos, baixos e altos, respectivamente ( $-0,1 \pm 0,3\%$  – verão e  $-0,5 \pm 0,3\%$  – inverno;  $1,5 \pm 0,1\%$  - verão e  $1,5 \pm 0,2\%$  - inverno;  $32,3 \pm 2,7$  – verão e  $31,7 \pm 4,4$  - inverno).

A seiva de *M. miersiana*, apresentou 75,9% de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> no verão e uma diminuição a 31,5% no inverno. Os principais aminoácidos de transporte foram ASP (3,8% - verão e 17,4% - inverno) e ARG (8,9% - verão e 8,8% - inverno).

*Myrcia laruotteana*, diferente das espécies anteriores, apresentou alta atividade de nitrato redutase tanto no verão quanto no inverno ( $270,2 \pm 46,7$  pKat.g PF<sup>-1</sup> e  $215,5 \pm 164,7$  pKat.g PF<sup>-1</sup>, respectivamente). O conteúdo de nitrato foi moderado em ambas as estações e se mostrou um pouco maior no inverno ( $62,4 \pm 2$  μmol.g PF<sup>-1</sup> – verão e  $85,1 \pm 7,5$  μmol.g PF<sup>-1</sup> - inverno). O conteúdo de nitrogênio foliar foi baixo ( $1,6 \pm 0,1\%$  - verão e  $1,7 \pm 0,1$  – inverno), já a razão C:N apresentou resultados moderados ( $27,8 \pm 1,2$  – verão e  $26,1 \pm 0,6$  – inverno). O δ<sup>15</sup>N foi muito baixo no verão ( $0,2 \pm 0,5\%$ ) e no inverno ( $-0,5 \pm 0,6\%$ ).

A composição de compostos nitrogenados de baixo peso molecular de *M. laruotteana* foi semelhante as outras espécies de Myrtaceae, apresentando domínio de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> no verão (58,5%) e uma queda do mesmo no inverno (11%) e como principais aminoácidos transportadores GLN (25,4% - verão e 38,5% - inverno) e ASP (5,5% - verão e 23,8% - inverno).

Assim como em Silva (2012), Myrtaceae é uma das famílias que transportam grandes quantidades de nitrato na seiva, sendo essa, uma característica em comum para as três espécies apresentadas. Além do nitrato, GLN e ASP foram os principais transportadores de nitrogênio, seguidos por ARG, porém em menores quantidades.

As três espécies selecionadas são classificadas como secundárias iniciais (Catharino *et al.* 2006; Polisel *et al.* 2010; Pereira, 2006) e são um ótimo exemplo da heterogeneidade que tal grupo sucessional apresenta, exibindo resultados ora mais próximos as espécies pioneiras ora para secundárias tardias. Isso fica claro na quantidade de ARG (10,1%) observada em *G.*

*sellowiana* no inverno e a alta atividade de nitrato redutase observada para *M. laruotteana* em ambas as estações ( $270,2 \pm 46,7$  pKat.g PF<sup>-1</sup> - verão e  $215,5 \pm 164,7$  pKat.g PF<sup>-1</sup> – inverno).

Como em Pereira-Silva (2008) e Silva (2012) observou-se um reduzido conteúdo de nitrogênio foliar, sendo uma das famílias com menor conteúdo dentre todas estudadas e o  $\delta^{15}\text{N}$  não se mostrou um importante marcador entre espécies e no geral, os valores foram baixos.

Myrtaceae é uma das famílias mais importantes de florestas ombrófilas (Souza & Lorenzi 2005) e aparece em outros trabalhos desenvolvidos pelo grupo (Pereira-Silva 2008, Campos 2009, Marchiori 2012, Silva 2012, Ribeiro 2012) inclusive é uma das famílias presentes na Floresta Subtropical Úmida de Queensland na Austrália e uma das principais que compõem a floresta australiana, deixando outra evidência da grande semelhança entre as florestas ombrófilas brasileiras, em especial a FOM.

### **Podocarpaceae**

*Podocarpus lambertii* apresentou atividade de NR muito baixa tanto no verão ( $16,8 \pm 2,5$  pKat.g PF<sup>-1</sup>) quanto no inverno ( $1,2 \pm 2,1$  pKat.g PF<sup>-1</sup>), moderada quantidade quanto ao nitrato presente na folha ( $72,1 \pm 5$   $\mu\text{mol.g PF}^{-1}$  – verão e  $89,7 \pm 27,1$   $\mu\text{mol.g PF}^{-1}$  – inverno) e baixa taxa de nitrogênio total foliar em ambas as estações ( $1,5 \pm 0,1\%$  - verão e  $1,6 \pm 0,1$  – inverno). Como consequência dos baixos valores de nitrogênio total foliar, a razão C:N foi de moderada no inverno ( $29,5 \pm 1,6$ ) a alta no verão ( $31,5 \pm 0,3$ ) e o  $\delta^{15}\text{N}$  foi muito baixo com valores abaixo de zero ( $-1,1 \pm 0,5\%$  – verão e  $-1,2 \pm 0,6\%$  – inverno).

A composição da seiva exibiu maiores taxas para  $\text{NO}_3^-$ , ASN e ASP em ambas as estações (13,4% - verão e 31,4% - inverno; 12,9% - verão e 15,5% - inverno; 37,1% - verão e 43,4% - inverno, respectivamente) e isoladamente foi observado 19,6% de ORN no verão.

A quantidade de nitrato encontrada na seiva tanto no inverno quanto no verão, corresponde às moderadas quantidades encontradas nas folhas, sendo que no inverno quando houve uma maior concentração de  $\text{NO}_3^-$  na folha isso foi refletido na seiva. Sendo uma planta secundária tardia (Catharino *et al.* 2006; Araujo *et al.* 2010; Lorenzi 1992), e seguindo o proposto no modelo de uso de nitrogênio (Aidar, *et al.* 2003), o nitrato não seria a principal forma nutricional de nitrogênio para *P. lambertii*, porém, segundo Smirnoff & Stewart (1984) a captação e mobilização de nitrato nas folhas poderia estar relacionado com a osmorregulação na própria folha.

A ARG é um importante aminoácido indicador em espécies secundárias tardias e apesar de não estar presente em *P. lambertii*, a presença de ORN no verão pode sugerir a preferência pelo transporte de arginina por essa espécie, uma vez que ORN faz parte da

síntese de arginina (Kerbaudy, 2012). A baixíssima atividade de nitrato redutase observada em ambas às estações, corrobora o proposto para espécies secundárias tardias.

## Rosaceae

A espécie *Prunus myrtifolia* exibiu atividade muito baixa de nitrato redutase no verão ( $23,5 \pm 25,5$  pKat.g PF<sup>-1</sup>) e uma elevação no inverno levando a níveis moderados de atividade ( $111,7 \pm 178,9$  pKat.g PF<sup>-1</sup>), porém com uma alta variabilidade entre os indivíduos, já o conteúdo de nitrato foliar foi moderado ( $67 \pm 5,4$  μmol.g PF<sup>-1</sup> – verão e  $68,6 \pm 7,1$  μmol.g PF<sup>-1</sup> – inverno) e o nitrogênio total foliar baixo ( $1,9 \pm 0,2\%$  - verão e  $1,9 \pm 0,1$  – inverno). Como consequência a razão C:N apresentou números moderados ( $24,6 \pm 2,4$  – verão e  $24,5 \pm 1,4$  – inverno). Já o δ<sup>15</sup>N foi muito baixo ( $-1,1 \pm 0,4\%$  – verão e  $-2,2 \pm 0,8\%$  – inverno).

O conteúdo de nitrato na seiva foi de 8,5% no verão e 29,1% no inverno do total dos compostos nitrogenados de baixo peso molecular. Os dois principais aminoácidos foram a ASN e o ASP (32,6% - verão e 19,7% - inverno; 31,5% - verão e 28,4% - inverno, respectivamente).

A elevada atividade no inverno é discutível, uma vez que o desvio padrão observado ultrapassa a média dos indivíduos desta espécie. De qualquer forma, o observado para a espécie secundária inicial *P. myrtifolia* (Catharino *et al.* 2006; Araujo *et al.* 2010) estaria de acordo com o ressaltado nas demais espécies de secundárias iniciais, a aclimação ao frio.

Por outro lado, as médias concentrações de nitrato e nitrogênio total reforçam a classificação apontada anteriormente e indicam que a espécie é uma secundária inicial no âmbito do modelo de uso de nitrogênio.

## Solanaceae

*Solanum pseudoquina* exibiu valores muito altos de ANR tanto no verão ( $775,2 \pm 46,4$  pKat.g PF<sup>-1</sup>) como no inverno ( $351,9 \pm 86,9$  pKat.g PF<sup>-1</sup>) e resultados baixos para nitrato foliar ( $39,2 \pm 4,6$  μmol.g PF<sup>-1</sup> – verão e  $37 \pm 4,9$  μmol.g PF<sup>-1</sup> – inverno). O nitrogênio total foliar foi muito alto no verão ( $4,3 \pm 0,7\%$ ) e alto no inverno ( $3,0 \pm 1,81$ ) e como consequência a razão C:N foi baixa para ambas estações ( $10,5 \pm 1,5$  – verão e  $17,2 \pm 9,6$  – inverno). O δ<sup>15</sup>N foi baixo ( $1,6 \pm 0,5\%$  – verão e  $1,9 \pm 0,5\%$  – inverno).

Quanto à composição da seiva, *S. pseudoquina* apresentou como forma preferencial de transporte de N o nitrato (51% - verão e 14% - inverno) seguido por ASN (18,8% - verão e 3,7% - inverno) e GLN (13,9% - verão e 0,3% - inverno).

*Solanum pseudoquina* é a única espécie pioneira (Lima, 2012; Araujo *et al.*, 2010; Drezza, 2009) no estudo, uma vez que a riqueza observada nessa área é baixa (Souza, 2008) e

também por ser uma floresta em ótimo estado de conservação, a dominância do dossel por espécies mais altas acaba sombreando e comprometendo a regeneração de espécies dependentes de alta luminosidade, fazendo com que o desenvolvimento de espécies pioneiras dependa de distúrbios como a abertura de clareiras (Backes, 1973).

Os dados obtidos corroboram o constatado para espécies pioneiras por Aidar *et al.* (2003), devido, principalmente, a alta atividade da enzima nitrato redutase, grande presença de nitrato na seiva e tendo ASN como principal aminoácido transportador.

### Winteraceae

*Drimys winterii* apresentou baixa ANR em ambas as estações ( $9,5 \pm 5,5$  pKat.g PF<sup>-1</sup> – verão e  $1,8 \pm 1,7$  pKat.g PF<sup>-1</sup> – inver<sub>no</sub>), moderado conteúdo de nitrato foliar, ( $61,3 \pm 23,3$  μmol.g PF<sup>-1</sup> – verão e  $71 \pm 26,2$  μmol.g PF<sup>-1</sup> – inverno) totalidade baixa de nitrogênio na folha nas duas estações ( $1,5 \pm 0,2\%$  - verão e  $1,5 \pm 0,3\%$  - inverno) e conseqüentemente alto C:N ( $33,1 \pm 4,6$  – verão e  $34,7 \pm 9,5$  – inverno). Quanto ao δ<sup>15</sup>N, os resultados obtidos foram muito baixos no verão ( $-1,0 \pm 0,5\%$ ) e no inverno ( $-1,0 \pm 0,7\%$ ).

Nitrato e ARG foram os únicos compostos nitrogenados de baixo peso molecular que apareceram na seiva de *D. winterii* em ambas estações ( $\text{NO}_3^- = 38,4\%$  - verão e  $15,1\%$  - inverno; ARG =  $22,3\%$  - verão e  $10,1\%$  - inverno). Apenas no inverno foi observada uma porcentagem de  $35,8\%$  de GLN e  $27,4\%$  de CIT e no verão  $5,7\%$  de ORN.

A baixa atividade da enzima nitrato redutase e os níveis de arginina encontrados na seiva do xilema desta espécie reforçam a classificação de *D. winterii* como uma planta secundária tardia (Marmontel *et al.* 2013) combinando com as características estabelecidas para espécies deste grupo no modelo de uso de nitrogênio de Aidar *et al.* (2003). Assim como retratado na espécie de Podocarpaceae, a presença de ORN no verão em *D. winterii* também acusa a preferência pelo transporte de arginina, logo que ORN é um precursor de arginina (Kerbaui, 2012). Vale ressaltar que a mesma espécie foi estudada na Floresta Ombrófila Densa Montana do Parque Estadual da Serra do Mar (Ribeiro, 2012) e apresentou ecofisiologia extremamente semelhante ao observado na FOM de Campos do Jordão.

Como constatado em Souza (2008), *Drimys winterii* é uma importante espécie formadora do dossel na FOM de Campos de Jordão e a presença da regeneração destas espécies nesta floresta indica que a mesma encontra-se em bom estado de conservação (Hartshorn, 1980).

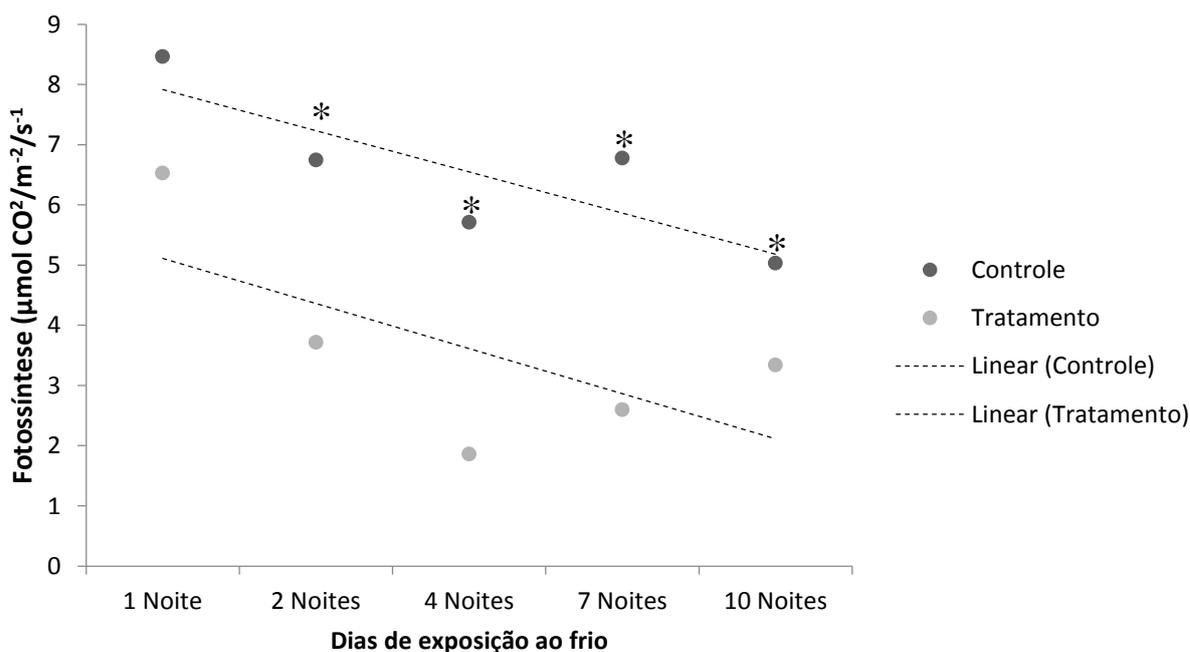
A família Winteraceae é considerada a família de angiosperma mais primitiva encontrada atualmente sendo que a maioria das espécies ocorrem na Austrália (Feild *et al.*,

2000), porém atingem grandes extensões na América do Sul, indo desde o México à Argentina (Every, 2009). Apesar da incerteza da origem das Winteraceae, Feild *et al* (2000) constata que esta família torna-se mais uma evidência do supercontinente Gondwana, logo que o descobrimento de fósseis em diferentes continentes evidencia a ocorrência da família nas antigas florestas encontradas no supercontinente.

#### 4.6. Experimento de aclimação ao frio

As plantas submetidas ao tratamento noturno de baixas temperaturas apresentaram diferença nos três parâmetros avaliados no experimento quando colocadas em comparação com os indivíduos controle.

Um dos fatores cruciais que determina a sobrevivência e distribuição das plantas no planeta é a temperatura sendo a fotossíntese um parâmetro extremamente sensível a mudanças da mesma (Gupta *et al.* 2011). A fotossíntese é um importante tópico para abordagens bioquímicas a fisiologia das plantas sendo um importante indicador para caracterizações de estados de estresse e limitações funcionais impostas por fatores ambientais (Larcher, 1995). Isso pode ser observado nos resultados obtidos para trocas gasosas (Figura 15) onde as plantas submetidas ao frio apresentaram uma alta redução na fotossíntese ao longo do período de exposição, chegando à depressão fotossintética de 71,4% da primeira noite de tratamento para a quarta noite de tratamento.



**Figura 15.** Atividade fotossintética das plantas expostas ao tratamento pelo frio e das plantas controle. Os valores marcados com "\*" apresentam diferenças estatísticas significativas para teste T entre controle e tratamento. Foram consideradas diferenças significativas para  $p < 0,05$ .

As baixas temperaturas podem causar a redução da taxa fotossintética por fatores físicos como o fechamento de stômatos ou fatores bioquímicos tais como, inibição da biossíntese de clorofilas (Hodgins & Van Huystee, 1989), perda na cadeia de transporte de elétrons ou em enzimas solúveis na fase bioquímica da fotossíntese (Grantz, 1989).

A figura 15 mostra a tendência a redução cada vez maior da fotossíntese em um ambiente estressado pelo frio, sendo que esta inibição não é a única consequência esperada para este tratamento, mas também translocação mais lenta de carboidratos, menor respiração, inibição do metabolismo de proteínas, geração de espécies reativas de oxigênio, crescimento lento e murcha foliar (Machado *et al.* 2013).

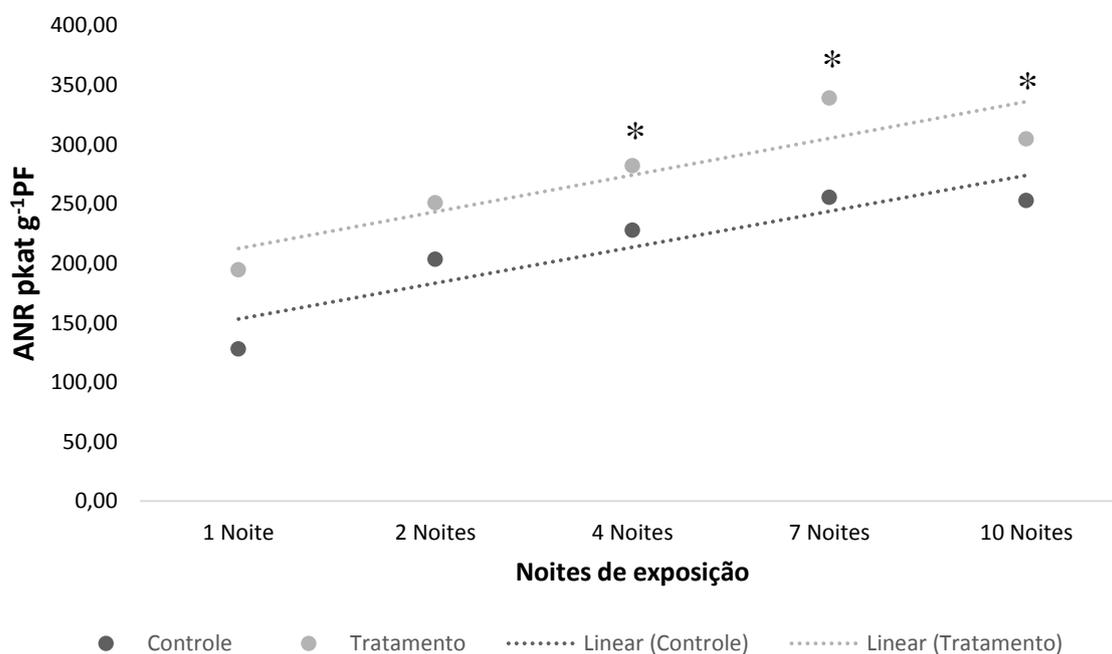
A resposta ao estresse fotossintético causado pelas baixas temperaturas ocorre geralmente em um intervalo de tempo de segundos até dias, resultando em um declínio no desempenho do processo fotossintético. Dentro de alguns dias esse declínio leva ao disparo de mecanismos de aclimatação que implicam em mudanças bioquímicas no metabolismo e levam a diferentes efeitos por toda a planta, como taxa de crescimento e sensibilidade ambiental reduzidas, buscando estabilizar o quadro de estresse (Lambers, 2008).

Como observado nos tópicos anteriores, algumas espécies secundárias iniciais da FOM apresentaram uma maior atividade de nitrato redutase no inverno do que no verão, fato não previsto pelo modelo de uso de nitrogênio de Aidar *et al.* (2013) e que também ocorreu em outros dois trabalhos realizados pelo grupo em locais com invernos rigorosos (Marchiori, 2012; Ribeiro, 2012).

O experimento testou o descrito em Cantrel *et al.* (2011) para *Arabidopsis thaliana*, onde é demonstrado que a enzima nitrato redutase tem sido implicada na via para síntese de NO e que sua atividade é estimulada quando a planta é exposta ao frio. Portanto, devido a alta atividade observada em campo durante o inverno ( $467,2 \pm 236,5$  pKat.g PF<sup>-1</sup>), a espécie *Ocotea puberula* foi selecionada para o experimento.

Os resultados apontam uma maior atividade da enzima nitrato redutase nas plantas expostas ao frio em todas as noites de exposição (Figura 16). Na primeira noite o grupo controle demonstrou uma atividade de  $127,96 \pm 17,1$  pKat.g PF<sup>-1</sup> confrontando com  $194,54 \pm 34,9$  pKat.g PF<sup>-1</sup> do grupo tratamento. Na noite seguinte tanto o tratamento quanto o controle tiveram aumento na atividade enzimática ( $203,47 \pm 50,3$  pKat.g PF<sup>-1</sup> – controle e  $250,97 \pm 64,1$  pKat.g PF<sup>-1</sup> – tratamento), sendo que o grupo tratamento demonstrou um aumento em aproximadamente 30% do observado no dia anterior. Na quarta noite de exposição o grupo tratamento ( $282,13 \pm 42,1$  pKat.g PF<sup>-1</sup>) continuou apresentando uma maior atividade que o grupo controle ( $227,92 \pm 16,7$  pKat.g PF<sup>-1</sup>), sendo esses resultados estatisticamente diferentes para teste T ( $p < 0,05$ ). No sétimo dia de exposição os resultados observados continuaram sendo estatisticamente diferentes entre si para teste T ( $p < 0,05$ ), sendo que o grupo tratamento apresentou  $339,21 \pm 35,3$  pKat.g PF<sup>-1</sup> e o grupo controle  $250,42 \pm 77,06$  pKat.g PF<sup>-1</sup>. No décimo dia de exposição e último dia de análises, o grupo tratamento apresentou uma leve

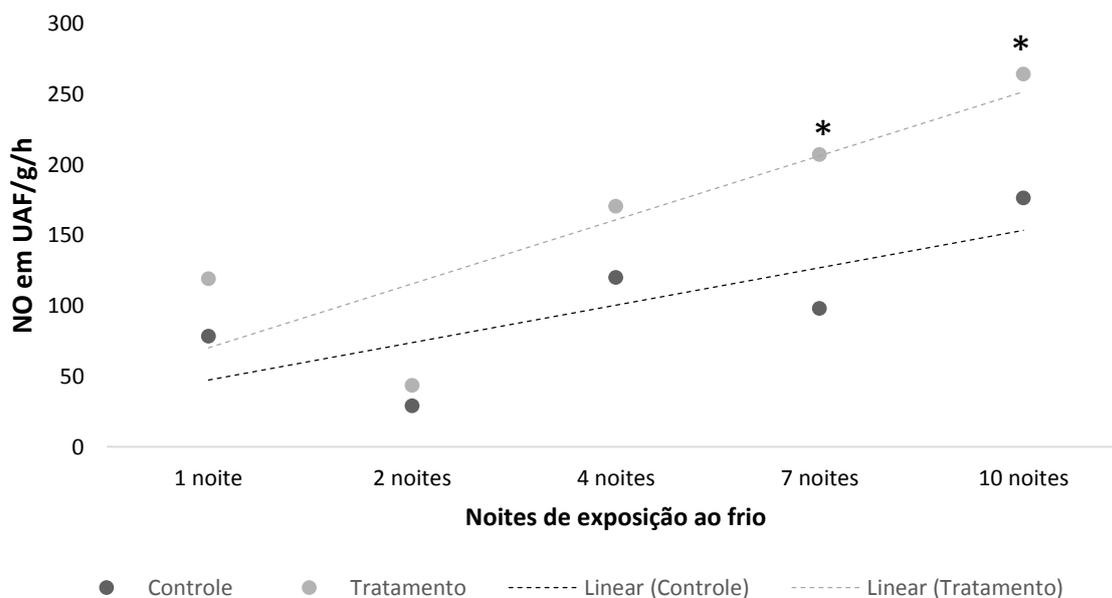
diminuição da atividade ( $304,77 \pm 35,3 \text{ pKat.g PF}^{-1}$ ) porém continuou superior e com diferença estatística que o grupo controle ( $253,01 \pm 36,8 \text{ pKat.g PF}^{-1}$ ).



**Figura 16.** Atividade da enzima nitrato redutase ( $\text{pKat.g PF}^{-1}$ ) ao longo dos dias de experimentação para indivíduos tratados (expostos ao frio) e indivíduos controle (não expostos ao frio). Os valores marcados com “\*” representam diferença estatística significativa para teste T entre controle e tratamento. Foram consideradas diferenças significativas para  $p < 0,05$ .

É possível observar, portanto, que a atividade de enzima nitrato redutase tende a aumentar quando as plantas são expostas a baixas temperaturas. Isso devido à percepção do frio através da redução da mobilidade da membrana celular, fato que pode resultar na produção de ácido fosfatídico e, simultaneamente, na síntese de NO pela enzima nitrato redutase (Gupta *et al.* 2011).

Para complementar a hipótese de que a enzima nitrato redutase estaria implicando na via de produção de NO, os níveis de NO foram medidos nas primeiras horas logo após a exposição (Cantrel *et al.*, 2008) das plantas ao frio nos mesmos dias de exposição em que foram feitas as quantificações da enzima nitrato redutase (Figura 17).

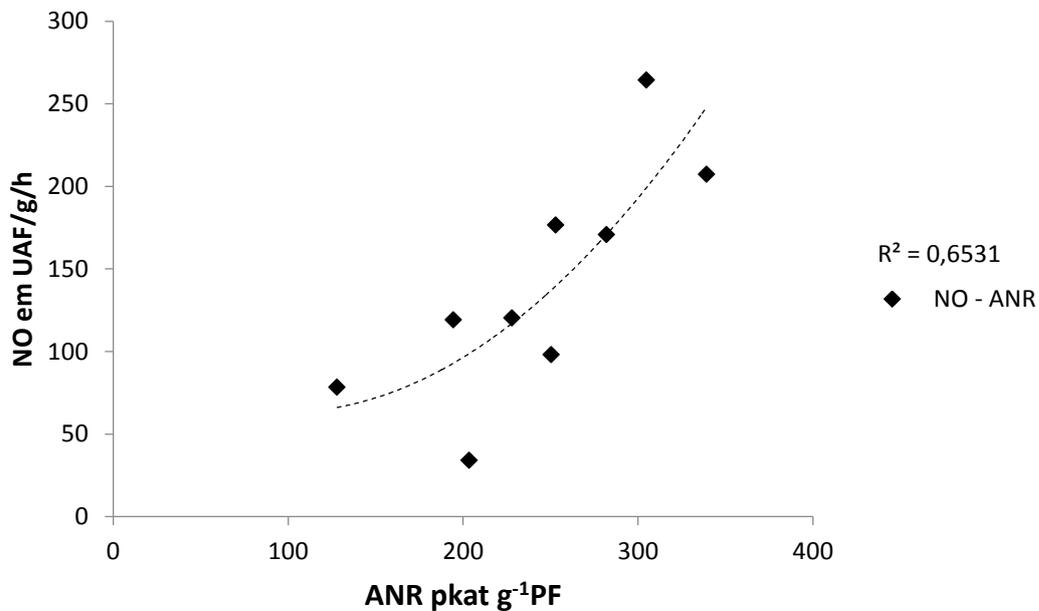


**Figura 17.** Unidas Arbitrárias de Fluorescência (UAF/g/m) de NO em plantas expostas ao frio ao longo dos dias de experimentação para indivíduos tratados (expostos ao frio) e indivíduos controle (não expostos ao frio). Os valores marcados com “\*” representam diferença estatística significativa para teste T entre controle e tratamento. Foram consideradas diferenças significativas para  $p < 0,05$ .

É possível observar um aumento na produção de NO conforme as plantas ficaram mais tempo expostas ao frio, principalmente entre o 4º e 10º dias de tratamento, o que sugere uma relação com a atividade elevada de nitrato redutase entre esses mesmos dias de tratamento.

Óxido nítrico é uma pequena molécula gasosa que participa de uma série de respostas as plantas sob condições bióticas e abióticas de estresse (Besson-Bard *et al.*, 2008; Neil *et al.*, 2008), sendo que alguns estudos afirmam que a enzima nitrato redutase é uma das fontes de produção de NO em resposta ao frio (Corpas *et al.*, 2008).

Gupta *et al* (2011) afirma que são possíveis duas vias de contribuição do óxido nítrico para a tolerância ao frio das plantas, sendo uma a interação de espécies reativas de oxigênio (ROS) com o NO. Para essa interação, as espécies reativas de oxigênio são geradas a partir da ativação via ácido fosfatídico e o óxido nítrico a partir da enzima nitrato redutase. A figura 18 evidencia esse aumento de NO conjuntamente com NR, demonstrando ocorrer o descrito por Gupta *et al* (2011).



**Figura 18.** Correlação entre atividade da enzima nitrato redutase (pkat g<sup>-1</sup>PF) e emissão de NO (UAF) dos indivíduos controle e indivíduos tratamento. Ajuste de curva polinomial (NO – ANR) e coeficiente de correlação (R<sup>2</sup>).

A figura 18 demonstra a correlação (R<sup>2</sup> = 0,6531) no aumento da atividade enzimática com a produção de óxido nítrico. As linhas de tendência demonstram um aumento contínuo de ambos os parâmetros. Com a correlação dos dois parâmetros, torna-se verdadeiro o observado não só na Floresta Ombrófila Mista como na Floresta Ombrófila Densa Montana (Marchiori, 2012 e Riberio, 2012), onde a maior ANR observada no inverno em relação ao verão seria devido a uma via alternativa na produção de NO pela enzima nitrato redutase, destinada à aclimação ao frio do que para fins nutricionais. Tal situação foi o mesmo observado por Zhao *et al.* (2009) e Cantrel *et al.* (2011) para indivíduos mutantes da espécie herbácea *Arabidopsis thaliana*, e agora pode-se afirmar que o mesmo ocorre para algumas das espécies arbóreas de ambas florestas citadas acima.

## 5. Considerações finais

1. O presente estudo corrobora a validade do modelo proposto por Aidar *et al.* (2003). Os diferentes grupos sucessionais de espécies da Floresta Ombrófila Mista, no geral, apresentaram diferentes características quanto à assimilação, transporte e armazenamento de nitrogênio. As espécies demonstraram seguir um continuum de estratégias de uso de nitrogênio.
  - Para a espécie pioneira, foi observada uma maior atividade de nitrato redutase na folha, altos níveis de nitrogênio foliar e o transporte sendo realizado preferencialmente por nitrato e o aminoácido asparagina na seiva do xilema.
  - Espécies secundárias iniciais no geral apresentaram médios a baixos valores de nitrato foliar e de nitrogênio total na folha. Também apresentaram grande plasticidade na atividade de nitrato redutase que vai de alta a baixa. Foi observada grande variedade de compostos de baixo peso molecular na seiva do xilema, sendo que asparagina e glutamina apareceram em média em maiores quantidades. Características muito semelhantes também foram observadas em outros trabalhos do grupo (Marchiori, 2012; Silva, 2012; Ribeiro, 2012).
  - Espécies secundárias tardias demonstraram atividade baixa de nitrato redutase, baixa concentração de nitrato foliar e nitrogênio total e alta razão C:N. Como principais transportadores na seiva do xilema o nitrato, asparagina e principalmente a arginina, um importante marcador que evidencia uma distinta estratégia de assimilação de N neste grupo sucessional.
  - Os dados apresentados de atividade da enzima nitrato redutase, conteúdo de nitrato na seiva do xilema e na folha no geral foram maiores no verão, portanto exibiram relação com o conteúdo de nitrato do solo, que no verão apresentou maior disponibilidade do que no inverno.
2. Os resultados obtidos na Floresta Ombrófila Mista, a última fisionomia a ser estudada quanto ao uso de N na Mata Atlântica, validam o modelo para a FOM e indicam que o mesmo é válido em toda a fisionomia do domínio atlântico.
3. O  $\delta^{15}\text{N}$ , assim como em Silva (2012), Marchiori (2012) e Ribeiro (2012), não demonstrou ser uma variável informativa de grande valia na determinação das estratégias de uso de N pelas espécies dentro dos grupos sucessionais ponderados.
4. O estudo possibilitou a comparação intercontinental entre espécies da América do Sul (Brasil) e espécies da Oceania (Austrália). A comparação quanto ao comportamento das espécies das florestas Ombrófila Mista brasileira e Subtropical Úmida australiana quanto

ao uso de N demonstrou um alto nível de semelhança entre famílias e até mesmo gênero de espécies marcantes de ambas as florestas. A validade do modelo de uso de nitrogênio e a semelhança observada em ambas às formações florestais evidenciam que não só a composição atual, mas também o funcionamento das florestas tropicais brasileiras e australianas têm origens comuns, logo que ambas tem suas raízes no Cretáceo no supercontinente da Gondwana.

5. Algumas espécies apresentaram altas atividades de nitrato redutase no inverno comparado com o verão. Tal fato foi explicado pelo experimento realizado em câmara fria, onde foi demonstrado que a alta atividade da enzima nitrato redutase no inverno esta relacionada a um mecanismo de aclimatação ao frio e não função nutricional. As plantas submetidas à exposição ao frio demonstraram um aumento na produção de NO, via enzima nitrato redutase. A produção de NO, juntamente com outros compostos irão sinalizar a planta a necessidade da modulação gênica para a tolerância a baixas temperaturas (Gupta *et al.*, 2011). Ainda, a baixa temperatura demonstrou ser um fator de estresse para as plantas quanto às trocas gasosas, já que as plantas expostas ao frio demonstraram uma alta depressão fotossintética. A inibição fotossintética pode levar a uma cascata de consequências negativas para planta, tais como redução da respiração e geração de espécies reativas de oxigênio (Machado *et al.* 2013).

## 6. Referências Bibliográficas

- Aidar, M.P.M., Carrenho, R. & Joly, C.A.** 2004. Mycorrhizal colonization in an Atlantic forest chronosequence – Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira (PETAR), SP. *Biota Neotropica* 4(2).
- Aidar, M.P.M., Schmidt, S., Moss, G., Stewart, G.R. & Joly, C. A.** 2003. Nitrogen use strategies of Neotropical rainforest trees in threatened Atlantic Forest. *Plant Cell and Environment* 26: 389-399.
- Allen, D.J.; Ort, D.R.** Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends in Plant Science*, London, v. 6, p. 36-42, 2001.
- Andrews, M.** 1986. The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. *Plant Cell and Environment* 9: 511-519.
- Arasimowicz, M., Floryszak-Wieczorek, J.** Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. 2007. *Plant Science*. V(172). Issue 5. P876-887.
- Araujo, M.M.; Chami, L.; Longhi, S.J.; Avila, A.L.; Brena, D.A.** 2010. Análise de agrupamento em remanescente de floresta ombrófila mista. *Ciência Florestal*. Santa Maria. 20(1) p 1 – 18.
- Backes, A.** 1973. Contribuição ao conhecimento da ecologia da mata de Araucaria. Tese de doutorado. Instituto de Biosciências, Universidade de São Paulo. 235p.
- Beck, E.H., Heim, R., Hansen, J.** 2004. Plant resistance to cold stress: Mechanisms and environmental signals triggering frost hardening and dehardening. *Jornal of Bioscience*. V(29). Issue 4. P 449-459.
- Besson-Bard A, Pugin A, Wendehenne D.** 2007. New insight into nitric oxide signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* 59: 21–39.
- Bewley, J.T.** 1981. *Nitrogen and Carbon Metabolism*. Springer, Holanda.
- Campos, M.M.S.** 2009. Ecofisiologia do uso de nitrogênio em espécies arbóreas da floresta ombrófila densa das terras baixas, Ubatuba, SP. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo.
- Cantón, F.R., Suárez, M.F., Cánovas, F.M.** 2005. Molecular aspects of nitrogen mobilization and recycling in trees. *Photosynthesis Research* 83: 265-278.
- Cantrel, C., Vazquez, T., Puyaubert, J., Rezé, N., Lesch, M., Kaiser, W.M., Dutilleul, C., Guillas, I., Zachowski, A., Boudouin, E.** 2011. Nitric oxide participates in cold-responsive phosphosphingolipid formation and gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 189: 415-427.

- Carvalho, F.A.; Nascimento, M.T.; Braga, J.M.A.** 2006. Composição e riqueza florística do componente arbóreo da Floresta Atlântica submontana na região de Imbaçã, Município de Silva Jardim, RJ. *Acta botânica brasileira*. 20(3): 727-740.
- Cataldo, D.A., Haroon, M., Schrader, L.E. & Youngs, V.L.** 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 6:71-80.
- Catharino, E.L.M., Bernacci, L.C., Franco, G.A.D.C., Durigan, G. and Metzger, J.P.** 2006. Tree species composition and diversity of the Morro Grande Forest Reserve, Cotia, SP, Brazil. *Biota Neotrop.* vol. 6 no. 2
- Chanderbali, A.S., van der Werff, H., Renner, S.S.** 2001. Phylogeny and Historical Biogeography of Lauraceae: Evidence from the Chloroplast and Nuclear Genomes. *Annals of The Missouri Botanical Garden*. Vol. 88, n 1. Pp 104-134.
- CIIAGRO online.** 2014. Centro integrado de informações agrometeorológicas. In: <http://www.ciiagro.sp.gov.br/ciiagroonline>.
- Cook D, Fowler S, Fiehn O, Thomashow MF.** 2004. A prominent role for CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 101: 15243–15248.
- Corpas FJ, Palma JM, Sandalio LM, Valderrama R, Barroso JB, Del Rio LA.** 2008. Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions. *Plant and Cell Physiology* 49: 1711–1722.
- Couturier, J., Doidy, J., Guinet, F., Wipf, D., Blaudez, D., Chalot.** 2010. Glutamine, arginine and the amino acid transporter Pt-CAT11 play important roles during senescence in poplar. *Annals of Botany* 105: 1159-1169.
- Crawford, N.M. & Glass, A.D.M.** 1998. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science* 3(10): 389-395.
- Dambrine, E., Martin, F., Carisey, N., Granier, A., Hällgren, J. & Bishop, K.** 1995. Xylem sap composition: a tool for investigating mineral uptake and cycling in adult spruce. *Plant and Soil* 168-169: 233-241.
- Delledonne M.** NO news is good news for plants. 2005. *Current Opinion in Plant Biology*. 8:390-396.
- Dias, M.C.; Vieira, A.O.S.; Nakajima, J.N.; Pimenta, J.A.; Lobo, P.C.** 1998. Composição florística e fitossociologia do componente arbóreo das florestas ciliares do rio Iapó, na bacia do rio Tibagi, Tibagi, PR. *Revista Brasileira de Botânica*. 21(2)

- Drezza, T.R.** 2009. Estudo de duas metodologias de supressão de *Pinus elliottii* Engelm. Em áreas de preservação permanente com base na avaliação da regeneração natural. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná. 105p.
- Estação meteorológica do IAG – USP.** 2014. In: <http://www.estacao.iag.usp.br/index.php>. Acesso em: 04/03/2015.
- Every, J.L.R.** 2009. Neotropical Winteraceae. In: Milliken, W., Klitgård, B. & Baracat, A. (2009 onwards), Neotropikey - Interactive key and information resources for flowering plants of the Neotropics.
- Feild, T.S., Zwieniecki, M.A., Holbrook, N.M.** 2000. Winteraceae Evolution: An Ecophysiological Perspective. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. v87 n(3) p 323-334.
- Ferguson, A.R., Eiseman, J.A. & Leonard, J.A.** 1982. Xylem sap from *Actinidia chinensis*: seasonal changes in composition. *Annals of Botany* 51:823-833.
- Gandolfi, S.** 1991. Estudos florísticos e fitossociológicos de uma floresta residual na área do Aeroporto Internacional de São Paulo, município de Guarulhos. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- Gandolfi, S.** 2000. História natural de uma floresta estacional semidecidual no município de Campinas (São Paulo, Brasil). Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- Gentry, A. H.** 1988. Tree species richness of upper Amazonian forests. *Proc. Natl. Academy Science* 85, pp. 156 – 159.
- Godoy, J. R. L.** 2007. Ecofisiologia do estabelecimento de leguminosas arbóreas da Mata Atlântica, pertencentes a diferentes grupos funcionais, sob atmosfera enriquecida com CO<sub>2</sub>: uma abordagem sucessional. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica de São Paulo, 114 p.
- Gomes, G.C.** 2009. Composição e aspectos ecológicos da flora arbustivoarbórea nativa da Serra dos tapes. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em sistemas de Produção Agrícola Familiar. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 72p.
- Grantz, D.A.** 1989. Effect of cool temperatures on photosynthesis and stomatal conductance in field grown sugarcane in Hawaii. *Field Crops Research*, 22: 143-155.
- Gupta, K.J., Hinch, D.K., Mur, L.A.J.** 2011. NO way to treat a cold. *New Phytologist* 189: 360-363.
- Harper, J.E.** 1994. Nitrogen metabolismo. In: Boote, K.J.; Bennett, J.M.; Sinclair, T.R.; eds. *Physiology and determination of crop yield*. Madison ASA/CSSA/SSSA, pp. 285-302.

- Hartshorn, G.S.** 1980. Neotropical forest dynamics. *Biotropica*, Washington v20, p. 23-30.
- Hodgins, R.R.W. & Öquist, G.** 1989. Porphyrin metabolism in chillstressed seedlings of scots pine (*Pinus sylvestris*) *Physiologia Plantarum.*, 77: 620-624.
- Hubbell, S.P., Foster, R.B., O'Brien, S.T., Harms, E., Condit, R., Wechsler, B., Wright, S.J., Loo de Lao, S.** 1999. Light-Gap Disturbances, Recruitment Limitation, and Tree Diversity in a Neotropical Forest. *Science* 283: 554-557.
- Jesus, E.C.; Schiavo, J.A.; Faria, S.M.** 2005. Dependência de micorrizas para a nodulação de leguminosas arbóreas tropicais. Viçosa, MG. *Revista Árvore* n4(29): 545-552.
- Joly, C.A., Aidar, M.P. M., Klink, C.A., Mcgraph, D.G., Moreira, A.G., Moutinho, P., Nepstad, D.C., Oliveira, A.A., Pott, A., Sampaio, E.V.S.B.** 1999. Evolution of the Brazilian phytogeography classification systems: implications for biodiversity conservation. *Ciência e Cultura* 51(5/6): 331-348.
- Kaplan F, Kopka J, Haskell DW, Zhao W, Schiller KC, Gatzke N, Sung YD, Guy CL.** 2004. Exploring the temperature-stress metabolome of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 136: 4159–4168.
- Kerbaudy, G.B.** *Fisiologia Vegetal*. 2012. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2ed.
- Kolb, K. J., Evans, R. D.** 2002. Implications of leaf nitrogen recycling on the nitrogen isotope composition of deciduous plant tissues. *New Phytologist* 156: 57-64.
- Köppen, W.** 1948. *Climatologia: com um estúdio de los climas de la tierra*. Climatology. Laboratory of Climatology, New Gersey. 104p.
- Lamattina L, García-Mata C, Graziano M, Pagnussat, G.** Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. 2003. *Annual Review of Plant Biology*. 54:109-136.
- Lambers, H., Chapin, F.S., Pons, T.** 2008. *Plant Physiological Ecology*. 2ª Edição. Editora Springer, 604p.
- Larcher, W.** 1994. *Ecofisiologia Vegetal*. Rima, São Paulo.
- Larcher, W.** 1995. *Ecophysiology of Photosynthesis*. Springer Study Edition. v100 pp 261-277.
- Lea, P.J. & Miflin, B.J.** 1980. Transport and metabolism of asparagine and other nitrogen compounds within the plant. In: *The Biochemistry of Plants*, Stumpf, P.K. & Conn, E.E. (eds.), Academic Press, New York, pp. 596-607.
- Lima, M.E.L.** 2010. Avaliação da estrutura do componente arbóreo de um fragmento de Floresta Ombrófila Densa Montana do Parque Natural Municipal Nascentes de Paranapiacaba, Santo André, São Paulo, Brasil. Dissertação de mestrado. Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente.

- Lodge, D.J.; MacDowell, W.H. & Mc Swiney, C.P.** 1994. The importance of nutrient pulses in tropical forests. *Trends in Ecology and Evolution* 9(10):384-387.
- Lorenzi, H.** Árvores brasileiras 2ª ed. 1992. Instituto Plantarum. São Paulo.
- Loudet, O., Chaillou, S., Krapp, A. & Daniel-Vedele, F.** 2003. Quantitative trait loci analysis of water and anion contents in interaction with nitrogen availability in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 163: 711–722.
- Machado, D.F.S.P., Lagôa, A.M.M.A., Ribeiro, R.V., Marchiori, P.E.R., Machado, R.S., Machado, E.C.** 2013. Baixa temperatura noturna e deficiência hídrica na fotossíntese de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Vol 48, n5.
- Marchiori, N.M.** 2012. Aspectos funcionais da Floresta Ombrófila Densa Montana, Parque Estadual Serra do Mar: estrutura, biomassa aérea, uso de nitrogênio e fotossíntese. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 112p.
- Marmontel, C.V.F.; Rodrigues, V.A.; Martins, T.; Starzynski, R.; Carvalho, J.L.** 2013. Caracterização da vegetação secundária do bioma Mata Atlântica com base em sua posição na paisagem. *Uberlândia. Bioscience. J.* 29(6) p 2042 – 2052.
- Martinelli, L.A., Piccolo, M.C., Townsend, A.R., Vitousek, P.M., Cuevas, E., Mcdowell, W., Robertson, G.P., Santos, O.C. & Treseder, K.** 1999. Nitrogen stable isotopic composition of leaves and soil: Tropical versus temperate forests. *Biogeochemistry* 46: 45-65.
- McCullough, H.** 1967. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clinica Chimica Acta* 17:297-304.
- McKey, D.** 1994. Legumes and nitrogen: the evolutionary ecology of nitrogen-demanding lifestyle. In *Advances in Legume Systematics 5: The Nitrogen Factor* (Sprent, J.J. & McKey, D. eds), Royal Botanic Gardens.
- Mittermeier, R.A., Gil, P.R., Hoffman, M., Pilgrim, J., Brooks, T., Mittermeier, C.G., Lamoureaux, J. & Fonseca, G.A.B.** 2004. Hotspots revisited. Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. Cemex, Mexico, pp. 392.
- Muntz, K.** 1998. Deposition of storage proteins. *Plant Molecular Biology* 38: 77-79.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G. A. B. & Kent, J.** 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 852-858.
- Nardoto, G.B. & Bustamante, M.M.C.** 2003. Effects of fire on soil nitrogen dynamics and microbial biomass in savannas of Central Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 38: 955-962.
- Näsholm, T. & Persson, J.** 2001. Plant acquisition of organic nitrogen in boreal forests. *Physiologia Plantarum* 111:419-426.

- Näsholm, T., Ekblad, A., Nordin, A., Giesler, R., Högberg, M. & Högberg, P.** 1998. Boreal forest plants take up organic nitrogen. *Nature* 392:914-916.
- Näsholm, T., Kielland K. & Ganeteg, U.** 2009. Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytologist* 182(1):3848.
- Neil, S.J., Desikan, R., Hancock, J.T.** 2003. Nitric oxide signaling in plants. *New Phytologist* 159: 11-35.
- Nunes, Y.R.F., Mendonça, A.V.R., Botezelli, L., Machado, E.L.M. & Oliveira-Filho, A.T.** 2003. Variações da fisionomia, diversidade e composição de guildas da comunidade arbórea em um fragmento de floresta semidecidual em lavras, MG. *Acta Botanica Brasílica* 17 (2): 213-229.
- Oliveira-Filho, A.T. & Fontes, M.L.P.** 2000. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in southeastern Brazil and the influence of climate. *Biotropica* 32:793-810.
- Pereira, I.M.** 2006. Estudo da vegetação remanescente como subsídio à recomposição de áreas ciliares nas cabeceiras do Rio Grande, Minas Gerais. Tese de doutorado. Universidade Federal de Lavras. 261p.
- Pereira-Silva, E.F.L.** 2008. Estratégias ecofisiológicas no uso de nitrogênio em espécies arbóreas de floresta ombrófila densa submontana e estacional semidecidual, SP. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Polisel, R.T.; Franco, G.A.D.C.** 2010. Comparação florística e estrutural entre dois trechos de Floresta Ombrófila Densa em diferentes estádios sucessionais, Juquitiba, SP, Brasil. *Hoehnea* 37(4): 691-718, 2 fig., 8 tab.
- Reginato, M., Goldenberg, R.** 2007. Análise florística, estrutural e fitogeográfica da vegetação em região de transição entre as Florestas Ombrófilas Mista e Densa Montana, praquara, paraná, Brasil. *Hoehnea*. 34(3): 349-364.
- Rentsch, D.; Schmidt, S. & Tegeder, M.** 2007. Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants. *FEBS Letters* 581:2281-228.
- Ribeiro, S.L.C.** 2013. Economia de Nitrogênio em Árvores Tropicais. Universidade Estadual de Campinas, Campinas. Tese de doutorado Biologia Vegetal. 172p.
- Roggy, J.C., Prevost, M.F., Gourbiere, F., Casabianca, H., Garbaye, J., Domenach, A.M.** 1999. Leaf natural N-15 abundance and total N concentration as potential indicators of plant N nutrition in legumes and pioneer species in a rain forest of French Guiana. *Oecologia*, New York, v. 120, n. 2, p. 171-182.
- 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: 403-41.
- Schmidt, S.** 1998. Transport, storage and mobilization of nitrogen by trees and shrubs in the wet/dry tropics of northern Australia. *Tree Physiology* 18:403-410.
- Schrader, K.R.; Thomas, R.J.** 2001. Nitrate uptake, reduction and transport in the whole plant. *In:* Bewley, J.D. (ed). Nitrogen and carbon metabolism. Developments in plant and soil Science, v.3.
- Seligman, K., Saviani, E.E., Oliveira, H.C., Pinto Maglio, C.A.F., Salgado, I.** 2008. Floral transition and nitric oxide emission during flower development in *Arabidopsis thaliana* is affected in nitrate reductase-deficient plants. *Plant and cell Physiology* 49: 1112-1121.
- Scheer, M.B., Mocoichinski, A.Y.** 2009. Florística vascular da Floresta Ombrófila Densa Altomontana de quatro serras no Paraná. *Biota Neotropica*. Vol9, no.2.
- Siegloch, A.E., Froehlich, C.G., Spies, M.R.** 2012. Diversidade de Ephemeroptera (Insecta) da Serra da Mantiqueira e Serra do Mar, região Sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*. Vol 56, n4.
- Silva, J.G.** 2012. Ecofisiologia do uso de nitrogênio em espécies arbóreas da Floresta Ombrófila Densa, Caraguatatuba, SP. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo. 88p.
- Siminski, A.; Fantini, A.C.; Guries, R.P.; Ruschel, A.R.; Reis, M. S.** 2011. Secondary Forest Succession in the Mata Atlântica, Brazil: Floristic and Phytosociological Trends. *International Scholarly Research Network*. 19p.
- Smirnoff, N., Todd, P. & Stewart, G.R.** 1984. The occurrence of nitrate reduction in the leaves of woody plants. *Annals of Botany* 54: 363–374.
- Smith, J.L. & Rice, E.L.** 1983. Differences in nitrate reductase activity between species of different stages in old-field succession. *Oecologia* 57:43-48.
- SOS Mata Atlântica/INPE.** 2009. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica, período 2005-2008.
- Souza R.P.M.** 2008. Estrutura da comunidade arbórea de trechos de florestas de Araucária no Estado de São Paulo, Brasil. Tese de Mestrado, ESALQ, Universidade de São Paulo. 101p.
- Souza, M.I.F.** 2006. Análise da diversidade genética de populações de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze utilizando marcador AFLP. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 97p.
- Souza, R.P.M., Souza, V.C., Polisel, R.T., Ivanauskas, N.M.** 2012. Estrutura e aspectos da regeneração natural de Floresta Ombrófila Mista no Parque Estadual de Campos do

- Jordão, SP, Brasil. *Hoehnea*. 39(3): 387-407.
- Souza, V.C. & Lorenzi, H.** 2005. *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias em Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Instituto Plantarum, São Paulo.
- Stewart G.R., Pate J.S. & Unkovich M.** 1993. Characteristics of inorganic nitrogen assimilation of plants in fire-prone Mediterranean type vegetation. *Plant, Cell and Environment* 16: 351-363.
- Stewart G.R., Popp M., Holzapfel I., Stewart J.I. & Dickie-Eskew A.** 1986. Localization of nitrate reduction in ferns and its relationship to environment and physiological characteristics. *New Phytologist* 104: 373-384.
- Stewart, G.R; Mann, A.F. & Fentem, P.A.** 1980. Enzymes of glutamate formation: Glutamate Dehydrogenase, Glutamine Synthetase, and Glutamate Synthase. In: *The Biochemistry of plants*, Stumpf, P.K. & Conn, E.E. (eds.), Academic Press, New York, pp. 271-320.
- Stitt, M. & Krapp, A.** 1999. The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant, Cell and Environment* 22: 583-621.
- Stitt, M.** 1999. Nitrate regulation of metabolism and growth. *Current Opinion in Plant Biology* 2(3): 178-186.
- Tabarelli, M., Mantovani, W. & Peres, C.A.** 1999. Effects of habitat fragmentation on plant guild structure in the montane Atlantic forest of southeastern Brazil. *Biological Conservation* 91:119-127.
- Taiz, L. & Zeiger, E.** 2009. *Fisiologia Vegetal*. Artmed, Porto Alegre.
- Vaccaro, S.; Longhi, S.J.; Brena, D.A.** 1999. Floristic composition aspects and forests successional categories of three subseres in a deciduous seasonal forest, in the district of Santa Tereza, RS. *Ciência Florestal*, v.9, n.1.
- Van de Weg, M.J., Meir, P., Grace, J. & Ramos, G.D.** 2012. Photosynthetic parameters, dark respiration and leaf traits in the canopy of a Peruvian tropical montane cloud forest. *Oecologia* 168:23-34.
- Vitousek, P.M., Cassman, K.; Cleveland, C., Crews, T., Field, C.B., Gimm, N.B., Howarth, R.W., Marino, R., Martinelli, L., Rastetter, E.B., Sprent, J.I.** 2002. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry*, Dordrecht, v. 57, n. 1, p. 1-45.
- Whitmore, T.C.** 1990. *An introduction to the tropical rain forests*. Clarendon Press, Oxford.
- Williams, L.E. & Miller, A.J.** 2001. Transporters responsible for the uptake and partitioning

of nitrogenous solutes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52:659-688.

**Xu, G., Fan, X. & Miller, A.J.** 2012. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annual Review of Plant Biology* 63:253-182.

**Zhao, M.G., Chen, L., Zhang, L.L., Zhang, W.H.** 2009. Nitric reductase-dependent nitric oxide production is involved in cold acclimation and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 151(2): 755-767.